九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Studies on intracellular protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer

佐々木, 理

https://doi.org/10.15017/1806835

出版情報：九州大学, 2016, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

（様式３）

氏　　名　：佐々木　理

論 文 名　：Studies on intracellular protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer
（生物発光共鳴エネルギー転移を用いた細胞内タンパク質間相互作用の研究）

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

本論文は 2 部構成からなる。

第 1 部

RNA ウイルスは、宿主細胞内においてウイルスの複製機構の構成要素となる dsRNA や、宿主細胞の免疫応答機構を抑制するための阻害タンパク質を放出し、宿主細胞内で増幅を図る。一方、宿主細胞では、細胞内分子センサーRIG-I により、ウイルス由来の dsRNA を認識し、さらにその複合体がミトコンドリア外膜上に存在するアダプタータンパク質 MAVS と結合する。その結果、最終的にウイルス複製抑制因子 IFN-β の発現誘導を始めとする自然免疫応答を引き起こすことが知られている。これまでに免疫沈降法などの *in vitro* 系の実験手法によって、MAVS がホモ複合体を形成することが推測されてきた。しかし、この状態はウイルス感染時にみられる一過性の遷移状態であることから、既存の実験手法によって、生細胞内でその過程を検出することは困難であった。そこで、本研究において、生細胞内における MAVS の膜上での複合体形成メカニズムを解析するため、生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) を用いた実験を行った。

まず、N 末端に発光タンパク質 Rluc タグおよび蛍光タンパク質 Venus タグを付与した組換え MAVS を HEK293 細胞において過剰発現させ、自然免疫応答を阻害しないことを reporter assay を用いて確認した。その後、BRET saturation assay によって、MAVS が生細胞内でミトコンドリア外膜上において多量体を形成することを明らかにした。次に、MAVS の多量体形成をさらに詳細に解析するため、BiFC-BRET saturation assay を行った結果、MAVS が少なくとも 3 量体以上の多量体を形成する可能性が示唆された。また、C 型肝炎ウイルス由来のプロテアーゼ Ns3/4A やミトコンドリア外膜タンパク質 Mitofusin 2 は、*in vitro* 系の実験によって MAVS の多量体化を阻害する因子であることが知られている。そこで、同様の BRET を用いた解析により、これらの阻害因子が生細胞内において、それぞれ異なる様式で MAVS の多量体化を阻害することを明らかにした。以上の結果から、ミトコンドリア外膜上における MAVS の複合体形成メカニズムを生細胞内において明らかにした。

第 2 部

マウスのシステインプロテアーゼ caspase-11 およびそのヒトホモログである caspase-4 は、グラム陰性細菌の表層成分であるリポ多糖と、細胞内で CARD ドメインを介して直接結合して自己触媒的活性化に至る。その結果、necrosis 様の細胞死の一つである pyroptosis を引き起こすことが近年明らかとなっている。しかし、リポ多糖上における詳細な自己触媒的活性化のメカニズムは不明な点が多い。一方、カブトガニ顆粒細胞由来のリポ多糖感受性セリンプロテアーゼ前駆体である factor C は、リポ多糖上で分子間相互作用によって自己触媒的活性化をすることが報告されている。このことから、caspase-4/11 もリポ多糖上において factor C と類似した分子間相互作用による自己触媒的活性化をすることが推測される。そこで本研究では、細胞内での caspase-4/11 のリポ多糖上における

分子間相互作用のメカニズムを明らかにするため、生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) を用いた解析法により、その機能解析を行った。

まず、糖鎖修飾変異株 HEK293S 細胞に対して、C 末端に発光タンパク質 Rluc タグおよび蛍光タンパク質 Venus タグを付与した組換え caspase-11 を恒常発現させた。その後、electroporation 法を用いて *E.coli* 由来のリポ多糖を細胞内に導入し、pyroptosis が起きることを確認した。その後、Rluc および Venus タグを付与したプロテアーゼ活性欠損変異体 caspase-4/11 の恒常発現した細胞を作製し、BRET saturation assay を行ったところ、リポ多糖の濃度が 0.01 μg/ml において飽和値を示す飽和曲線を得た。このことから、細胞内に導入されたリポ多糖上において、組換え caspase-11 は複合体を形成することが示唆された。次に、caspase-4/11 が 3 量体以上の多量体を形成している可能性を調べるため、リポ多糖を導入後、BiFC-BRET saturation assay を行ったところ、飽和曲線の形成は見られなかった。この結果から、caspase-4/11 がリポ多糖上において、2 量体を形成する、あるいはタグ同士の配向性が合わない形での多量体形成をする、という 2 つの可能性が示唆された。さらに、CARD ドメインにおいて、リポ多糖との結合に重要な 19 番目の Lys 残基を Glu 残基に変異させた同様の組換え caspase-4/11 を恒常発現した細胞を作製し、BRET saturation assay を行ったところ、飽和曲線の形成がみられなかった。また、6 本の脂肪鎖を有する *E.coli* 由来のリポ多糖に対して、5 本の脂肪鎖を有する *Rhodobacter sphaeroides* 由来のリポ多糖を用いて BRET saturation assay を行い、飽和値が減濁した飽和曲線を得た。これらの結果から、caspase-4/11 のリポ多糖を介した細胞内での複合体形成において、リポ多糖の分子構造や caspase-4/11 の CARD ドメインが、重要な役割を持っていることが明らかとなった。以上のことから、本研究において、caspase-4/11 のリポ多糖上における分子間相互作用のメカニズムを、生細胞内における局在情報を反映した形で初めて解析することが出来た。