

## 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

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)		
論文調査委員	主査	九州大学	職名 教授 氏名 川畑 俊一郎
	副査	九州大学	職名 教授 氏名 石原 健
	副査	九州大学	職名 准教授 氏名 小柴 琢己

### 論文審査の結果の要旨

本論文は2部構成からなる。宿主細胞は、細胞内分子センサー (RIG-I) により、感染ウイルスの dsRNA を認識し、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 と結合することで、IFN- $\beta$  の発現を誘導することが知られており、これまで免疫沈降法などの *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。第1部では、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) を用いた実験を行い、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。さらに、BiFC-BRET saturation assay を行い、MAVS が少なくとも3量体以上の多量体を形成することを示した。また、C型肝炎ウイルスのプロテアーゼ Ns3/4A やミトコンドリア外膜タンパク質 Mitofusin 2 が MAVS の多量体化を阻害することを明らかにした。

一方、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 N-末端の CARD ドメインを介して直接結合して自己触媒的に活性化し、necrosis 様の pyroptosis を引き起こすと考えられている。そこで、第2部では、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、BRET を用いた解析法により、その機能解析を行った。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  $\mu\text{g/ml}$  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。また、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。さらに、アシル化の異なるリポ多糖により、細胞内での caspase-4/11 の相互作用が異なることも明らかにした。

以上の結果は、分子間相互作用を細胞内においてリアルタイムに解析した研究であり、自然免疫学分野において価値ある業績であると認められる。よって、本研究者は博士 (理学) の学位を受ける資格があるものと認める。