

包括的なゲノムワイドRNAiスクリーニングと免疫沈降-質量分析によるショウジョウバエTollシグナル伝達経路の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-07-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00058890

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



氏名	加藤 弘之
学位の種類	博士(創薬科学)
学位記番号	医薬保博甲 260 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	包括的なゲノムワイド RNAi スクリーニングと免疫沈降-質量分析によるショウジョウバエ Toll シグナル伝達経路の解析
論文審査委員	主査 倉石 貴透 副査 松永 司 副査 鈴木 亮 副査 中西 義信 副査 伊従 光洋

学位論文要旨

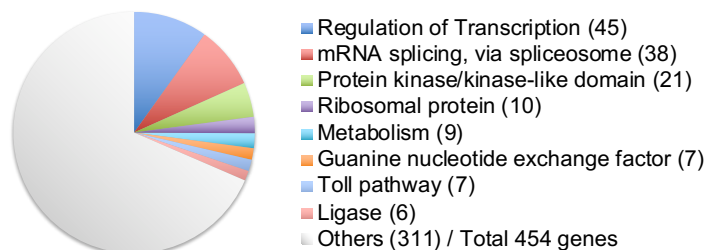
Abstract

The *Drosophila* Toll pathway is involved in embryonic development, innate immunity, and cell-cell interactions. However, compared to the mammalian Toll-like receptor innate immune pathway, its intracellular signaling mechanisms are not fully understood. The collaborators have previously performed a series of *ex vivo* genome-wide RNAi screenings to identify genes required for the activation of the Toll pathway. In this study, an additional genome-wide RNAi screening was conducted using the overexpression of Tube, an adapter molecule in the Toll pathway, and a co-immunoprecipitation assay was conducted to identify components present in the dMyd88-Tube complex. Based on the results of these assays, a bioinformatic analysis was conducted that resulted in describing candidate molecules and post-translational modifications that could be involved in *Drosophila* Toll signaling.

本論

ショウジョウバエの Toll 経路は、病原体や組織傷害に対する自然免疫応答をはじめ、胚発生、細胞間相互作用等重要な生理的プロセスに関与している。しかしながら、主に病原体を認識する哺乳動物の Toll 様受容体の自然免疫経路と比較して、多様な応答性を有するショウジョウバエ Toll 受容体のシグナル伝達因子とその制御機構は完全には解明されていない。本研究では、共同研究者らにより報告されている一連の *ex vivo* での包括的なゲノムワイド RNAi スクリーニングをさらに進めて、Toll 経路に関わる新規の遺伝子の同定を行い、その全貌を解明することを目指した。

共同研究者らはショウジョウバエの Toll 経路に関わるこれまでに明らかにされていない因子を同定するために、*ex vivo*でのゲノムワイド RNAi スクリーニングを実施し、その結果を報告している。これは、Toll アダプタータンパク質ショウジョウバエ Myd88 (*Drosophila* Myd88 ; dMyd88) , 下流のプロテインキナーゼ Pelle, NF- κ B ホモログ Dif のいずれかを過剰発現させるか、あるいは哺乳類 NF- κ B 阻害因子 I κ B のショウジョウバエホモログである Cactus をノックダウンさせた DL1 細胞 (ショウジョウバエの後期胚由来の血球系接着細胞) を用いて、*ex vivo*で RNAi スクリーニングにより、網羅的に各遺伝子発現の抑制が Toll 経路のシグナル伝達に与える影響を解析するものである。本研究においては、この網羅的 RNAi スクリーニングを完結させるために、残る IRAK ホモログである Tube の過剰発現により Toll 経路を活性化させた DL1 細胞を用いて RNAi スクリーニングを実施することとした。Tube 遺伝子を単独で過剰発現させただけでは Toll 経路は十分に活性化しないが、dMyd88 と Tube を共発現することによって、Tube を起点としたシグナル伝達因子複合体 Myddosome 下流のシグナル伝達経路を活性化できることがわかってきた。そこで本研究においては、Tube と dMyd88 を共過剰発現させた DL1 細胞を用いて RNAi スクリーニングを実施した。その結果、計 454 の候補遺伝子が同定された。これらを機能分類したとこ

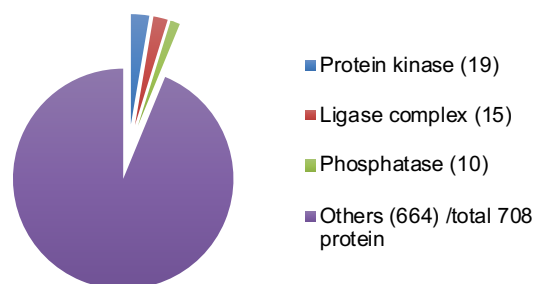


ろ、プロテインキナーゼあるいはキナーゼ様ドメインを含むタンパクの遺伝子が 21, Toll 経路に関わる既知の遺伝子が 7つ, ユビキチンリガーゼ関連の遺伝子が 6つ同定された。この結果は、Toll 経路におけるこれら機能因子の重要性を

示しているものと考えられた。

Fig. 1 ゲノムワイド RNAi スクリーニングにより同定された候補遺伝子の機能分類

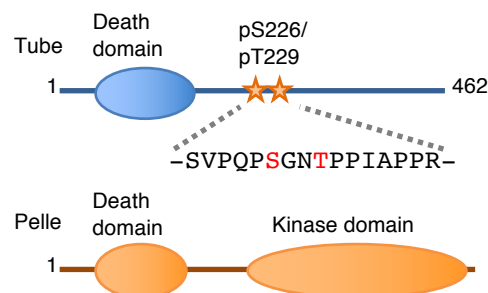
次に、Myddosome から Cactus に至るまでの未知シグナル伝達分子が、dMyd88-
Tube と一過性の複合体を形成するとの仮説のもと、Myddosome の共免疫沈降-
ショットガン質量分析を実施し、シグナル伝達に関わるタンパク質を網羅的に
同定した。その結果、計 708 のタンパクが同定された。多くのタンパクはいわゆる
ハウスキーピング関連のタンパクあるいは細胞内存在量が多いタンパクと思
われたが、そのような中、19 のタンパクキナーゼ関連タンパク、15 のユビキチ



ン化/SUMO 化関連のタンパクリガーゼ、10 のフォスファターゼが同定された。

Fig. 2 共免疫沈降-ショットガン質量分析にて同定されたタンパクの機能分類

さらに、複合体に含まれる因子の翻訳後修飾（リン酸化、ユビキチン化、SUMO
[small ubiquitin-like modifier] 化) についても検討した。その結果、Myddosome と
共免疫沈降するタンパク中に 68 のリン酸化ペプチドが確認されたが、その中に、
Tube の 226 番目のセリンと 229 番目のトレオニンがリン酸化されたペプチド断



片が同定された。

Fig. 3 Tube および Pelle タンパクの構造模式図

このリン酸化部位の配列を基にモチーフ解析を行ったところ、この2つのリン酸化部位はともに polo キナーゼによりリン酸化される可能性があること示された。 polo キナーゼは RNAi スクリーニングならびに共免疫沈降-質量分析の両方で同定されたことより、 polo キナーゼが Tube のリン酸化をもたらしており、このリン酸化が Toll 経路のシグナル伝達において重要な役割を担っているものと考えられた。さらに、ユビキチン化/SUMO 化を受けたペプチドの解析により 104 のユビキチン化/SUMO 化ペプチドが同定されたが、その中に polo キナーゼの 455 番目のリジンが SUMO 化されたペプチドが同定された。この 455 番目のリジンはリン酸化ペプチド結合ドメインに存在することより、本 SUMO 化が N 末端側にあるセリン/トレオニン プロテインキナーゼ活性に深く関わっていることが推測された。

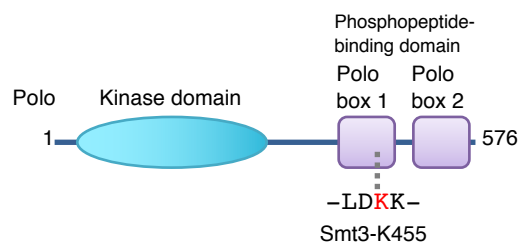
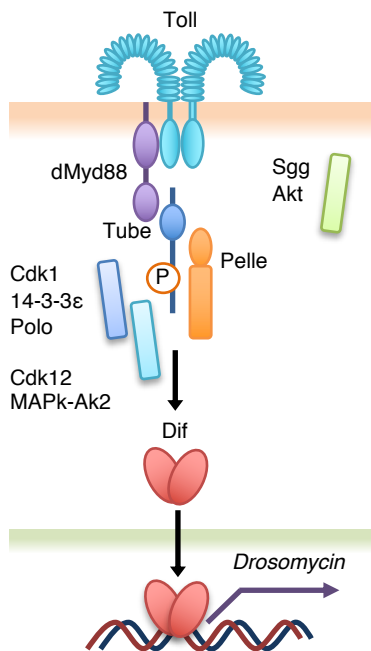


Fig. 4 Polo タンパクの構造模式図

これまでに共同研究者らにより、Sherpa が dMyd88 をユビキチン化することにより Tube を細胞膜上にリクルート、これにより polo によりリン酸化を受ける可能性が示唆されている。一方、Sherpa は dMyd88 をユビキチン化するとともに未知のターゲットを SUMO 化することが分かっていた。今回 polo キナーゼが

SUMO 化されていることが確認されたことから、これが Sherpa により成されている可能性があると考えられる。すなわち、Sherpa は dMyd88 をユビキチン化することにより Tube をリクルートし、Myddosome 複合体の形成を促進するとともに polo キナーゼを SUMO 化することにより、polo を活性化、活性化された polo が Tube をリン酸化することにより Toll シグナルを強力に活性化し、下流にそのシグナルを伝達するという仮説を提唱したい。さらに、hyd, eff, lig 等のタンパクリガーゼ関連因子が Toll 経路に関与していることが示唆されたことより、Sherpa 以外にもユビキチン化、SUMO 化が関与しており、それが Toll 経路のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが示唆されていると考えられた。

最後に、これらの実験結果を併せたバイオインフォマティク解析を行った。ゲノムワイド RNAi スクリーニングの結果は、Toll 経路のシグナル伝達における関与の程度を反映しているものと仮定し、一方、Myddosome との共免疫沈降-質量分析において得られたシグナルが強い場合には Myddosome の近位で、シグナル



が弱い場合には Myddosome から比較的遠位で Toll 経路のシグナル伝達に関与しているものと仮定した。特にキナーゼ関連遺伝子に注目して Toll 経路への関与、その役割について検討を行った。その結果、Cdk1, 14-3-3ε, Polo は Myddosome 近傍で Toll 経路に関与しており、Cdk12, MAPK-Ak2 は Myddosome より下流で Toll 経路に関与し、Sgg, Akt は Myddosome 近傍で、異なる経路に関与しているものと推定された。

Fig. 5 本研究により同定されたプロテ

インキナーゼ関連因子を含めた Toll 経

路のシグナル伝達の推定模式図

以上、包括的ゲノムワイド RNAi スクリーニング解析の結果と、Myddosome 複合体の共免役沈降-質量分析の結果を併せてバイオインフォマティクス解析を行い、Toll 経路、特に dMyd88 と Tube の下流に関与する可能性のある遺伝子を同定した。加えて、Toll 経路に関与すると考えられるキナーゼ関連遺伝子、さらには翻訳後修飾を同定し Toll 経路に関わる因子とその制御機構に関して新たな仮説を提唱するに至った。

本研究で提示した仮説について、今後生化学的解析、遺伝学的な解析を含めた *in vivo* 解析等により、さらなる検討が実施されることが望まれる。

審査結果の要旨

加藤弘之氏から提出された学位論文について、上記5名の審査委員による査読後、2019年2月14日に口頭発表会が行われた。同日の最終審査委員会で審議した結果、以下のとおり判定した。自然免疫系は微生物感染に対する生体防御反応として重要であるが、その活性化を導くシグナル伝達機構はまだ充分明らかになっていない。加藤氏が所属する研究室では、ショウジョウバエ自然免疫経路である Toll 経路の新規因子を探索するため、これまでにいくつかのゲノムワイド RNAi スクリーニングを実施し、新規制御因子の同定を報告している。本研究では一連のスクリーニングをさらに進め、加えて Toll 経路因子の複合体プロテーム解析を実施し、Toll 経路に関わる新規遺伝子の同定を試みた。加藤氏らにより新たに得られたデータに加えて、これまでに報告していたスクリーニングデータを用いて包括的にバイオインフォマティクス分析を行い、Toll シグナル伝達経路に関与するプロテインキナーゼ等の候補分子、さらには Toll シグナル伝達制御に関与すると考えられる翻訳後修飾を同定することに成功した。本研究により、自然免疫シグナリングの制御機構に関して新たな仮説を提唱するに至り、その成果は哺乳類自然免疫系の新規制御機構をも示唆する成果であると評価され、博士（創薬科学）の学位に値すると判定した。