

論文内容要旨

Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to
estimate loss- or gain-of-function variants

(網羅的アラニンスキャンニングを用いた STAT1 変
異の機能喪失または機能獲得の評価)

The Journal of Allergy and Clinical Immunology,
in press.

主指導教員：主指導教員：小林 正夫 教授
(統合健康科学部門 小児科学)

副指導教員：瀧原 義宏 教授
(原爆放射線医科学研究所 幹細胞機能学)

副指導教員：川口 浩史 准教授
(統合健康科学部門 小児科学)

香川 礼子

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

論文内容要旨

Alanine scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate loss- or gain-of-function variants.

網羅的アラニンスキャンニングを用いた STAT1 変異の機能喪失または機能獲得の評価

STAT1 は、インターフェロン- α/β 、- γ (IFN- α/β 、- γ) などのシグナル伝達に必須の転写因子であり、IFN- γ 刺激によりホモ二量体 gamma-activating factor (GAF) を形成する。GAF は interferon-gamma activated sequence (GAS) に結合することで転写を活性、細胞内寄生菌の排除に重要な役割を果たしている。STAT1 遺伝子の機能獲得型 (gain of function, GOF) 変異は慢性粘膜皮膚カンジダ症 (CMCD) を、機能喪失型 (loss of function, LOF) 変異は、メンデル遺伝型マイコバクテリウム易感染症 (MSMD) を発症する。GOF 変異は STAT1 の coiled-coil ドメイン (CCD)、DNA 結合ドメイン (DBD) に集中するが、LOF 変異は STAT1 の全長に散在する。CMCD と MSMD は異なる表現型の原発性免疫不全症に分類されるが、一部の患者では臨床像の重複がみられ、新規 STAT1 変異には質的評価が必要である。

本研究では STAT1 の CCD/DBD に網羅的に合計 342 種類のアラニン置換体を作製、IFN- γ 刺激に伴う IRF1 転写活性を測定することで、STAT1 変異の病的意義を評価するための参照データベースを作成した。野生型 STAT1 と比較し、転写活性が 1.6 倍以上のアラニン置換体を GOF、0.3 倍未満を LOF と仮定した。その結果、CCD のアラニン置換体のうち 34.7% (61/176) が GOF、2.2% (4/176) が LOF、DBD のアラニン置換体のうち 30.1% (50/166) が GOF、15.7% (26/166) が LOF と判断された。CCD/DBD に存在する既知の病的変異 (LOF 変異 4 個、GOF 変異 74 個) と、データベースの一致率を検討したところ、既知の LOF 変異は 100%(4/4)、GOF 変異は 78.1%(58/74)であった。CCD/DBD に存在する 39 の正常多型との一致率は 71.1%(28/39)であった。この結果は、アミノ酸置換が分子構造に及ぼす影響を予測するコンピューターアルゴリズムと比較して、陽性一致率は若干低下したが、陰性一致率は有意に高く、アラニン置換体を用いた STAT1 変異参照データベースの高い信頼性が検証された。

STAT1 は通常状態では不活性型の二量体 (antiparallel dimer) を形成し、IFN- γ 刺激で Tyr701 (Y701) がリン酸化し活性型二量体 (parallel dimer) に構造変化する。今回、網羅的アラニンスキャンニングにて得た結果を、antiparallel か parallel dimer に反映させ局在を検討すると、GOF 変異は antiparallel dimer の二分子間接合面に集中していた。このことから、GOF 変異は不活性型である antiparallel dimer の形成障害に関与することが推測された。

網羅的アラニンスキャンニングにて、CCD において LOF 変異となった 4 変異のうち 2 変異を

(E157K、G250E) を 3 家系 8 症例に同定した。機能解析の結果、両変異は LOF 変異であり、IFN- γ 刺激に伴う STAT1 のリン酸化、核移行、GAS 配列への結合、GAS 転写活性化の障害を認めた。E157K 変異は LOF 変異であるが antiparallel dimer の接合面に存在することから、molecular operating environment (MOE)を用いたタンパク質構造解析を行った。E157K 変異は相手分子の E394 と水素結合を形成し、不活性型である antiparallel dimer を安定化することで、LOF になると推測された。E157K、E394K、E157K + E394K 変異体を作製し、其々の機能解析を行うと E157K 変異、E394K 変異は LOF を、E157K + E394K 変異は GOF を示した。MOE を用いた *in silico* 解析でも、E394K 変異は相手分子の E157 と水素結合を形成し antiparallel dimer を安定化するが、E157K + E394K 変異は K157 と K394 の側鎖間の電荷的反発が生じ antiparallel dimer を不安定化することが推測された。これらの結果から、antiparallel dimer を安定化させる変異は LOF に、不安定化させる変異は GOF となることが示唆された。

網羅的アラニンスキャンニングを用いたデータベースから、CCD/DBD に存在する 70%以上の STAT1 遺伝子変異の病的意義を適切に評価できた。このようなデータベースを他の責任遺伝子においても確立できれば、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析の副産物である病的意義不明のアミノ酸置換の評価や、病的変異の絞り込みに有用と考えられる。