

審査の結果の要旨

氏名 三谷 祐貴子

本研究は免疫系、造血系などにおいて、主要な細胞間シグナル伝達を担うサイトカイン間におけるクロストークについて、細胞膜という場に注目して、インターフェロン (IFN) $-\alpha/\beta$ 、 $-\gamma$ およびインターロイキン (IL) -6 を例に解析したものであり、下記の結果を得ている。

- (1) IFN- α/β レセプターのサブユニットの一つである IFNAR1 を欠損したマウス胎児線維芽細胞 (AR1^{-/-} MEFs) においては、野生型 MEFs と比較して、IFN- γ による抗ウイルス作用、IFN- γ および IL-6 による Stats の DNA 結合能が低下していた。AR1^{-/-} マウス由来の脾臓細胞においても IFN- γ および IL-6 による Stats の DNA 結合能の低下が観察された。さらに、AR1^{-/-} MEFs においては、野生型 MEFs と比較して、IFN- γ 処理による IFN 誘導遺伝子 (IRF-1 および 2', 5' OAS) および IL-6 処理による IL-6 誘導遺伝子 (IRF-1 および junB) の発現誘導も低下していた。これらのことから、IFNAR1 欠損細胞においては IFN- γ および IL-6 に対する応答性が低下していることを明らかにした。
- (2) 野生型 MEFs においては、無刺激の状態では、RT-PCR により IFN- α および IFN- β mRNA の発現を確認できたが、IFN- β 欠損 (IFN- β ^{-/-}) MEFs においては、無刺激の状態では、IFN- β はもとより IFN- α mRNA の発現もほとんど観察できなかった。このような自発的な IFN- α/β の産生が認められない IFN- β ^{-/-} MEFs においても、AR1^{-/-} MEFs 同様、IFN- γ による抗ウイルス作用、IFN- γ および IL-6 による Stats の DNA 結合能が低下していた。この IFN- β ^{-/-} MEFs

において観察された IFN- γ および IL-6 に対する応答低下は、培養液中に 0.1 U/ml の IFN- β を添加することで回復した。このことから、自発的に産生されている極微量の IFN- α/β が IFN- γ および IL-6 による効率の良い応答に関与していることが示された。

- (3) グリセロール密度勾配法を用いた実験から、野生型 MEFs と比較して AR1^{-/-} MEFs においては、IFN- γ による Stat1 の二量体形成が低下していることを明らかにした。
- (4) AR1^{-/-} MEFs に IFNAR1 の細胞内チロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体を発現させた細胞株においては、IFN- γ および IL-6 による応答が回復しなかったことから、IFN- γ および IL-6 によるシグナルには IFNAR1 の細胞内チロシン残基が重要であることを示した。実際、野生型 MEFs においては、IFNAR1 は無刺激状態からチロシンリン酸化されており、さらに Stat1、Stat2 および Stat3 と会合していた。IFN- γ 処理後、IFNAR1 のチロシンリン酸化レベルも、IFNAR1 に会合する Stat1 の量も増加した。一方、IFN- β ^{-/-} MEFs においては、IFN- γ あるいは IL-6 刺激の有無にかかわらず、このような IFNAR1 のチロシンリン酸化および Stats との会合は観察されなかった。このことから、自発的に産生されている極微量の IFN- α/β が IFNAR1 の細胞内チロシン残基を常にリン酸化した状態にしており、そこに IFN- γ あるいは IL-6 によって活性化された Stats が効率的にリクルートして、二量体形成にむかうメカニズムが示唆された。
- (5) 野生型 MEFs および脾臓細胞において、免疫沈降により IFNAR1 と、IFN- γ レセプターのサブユニットの一つである IFNGR2 の会合を明らかにした。また、架橋剤を用いた免疫沈降実験において、IFNAR1 と IL-6 レセプターである gp130 が共沈してきた。さらに、細胞膜上のカベオラ膜ドメインに、これらの IFN レセプターのサブユニット、gp130、Jak1 および Jak2 が局在していることを明らかにした。このことから、細胞膜上のカベオラ膜ドメインにおいて、IFN-

α/β と、IFN- γ およびIL-6のクロストークが行われていることを明らかにした。

以上、本論文はIFNAR1を欠損したマウスおよびIFN- β を欠損したマウス由来の細胞を有効に使用して、IFN- α/β と、IFN- γ およびIL-6の細胞膜上でのレセプターレベルでのクロストークの存在とそのメカニズムを初めて明らかにした。さらに、現在まで知られていなかった自発的に産生されている極微量のIFN- α/β の役割の一端についても明らかにできた。本研究は、細胞膜ドメインの重要性を明らかにすることで、これまで二次元的に解析されてきたサイトカインシグナルの三次元的な解析の糸口となり、さらに生体内における様々なサイトカインの協調作用の機序解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。