

論文の内容の要旨

論文題目 IRF ファミリーによる抗ウイルス遺伝子活性化機構の解析

指導教官 谷口 維紹 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 仲矢 丈雄

ウイルス感染に対する生体防御において、転写因子 Interferon regulatory factor (IRF) ファミリーは重要な役割を担っている。その中で、IRF-3 はウイルス感染に対して最初に活性化され、インターフェロン(IFN)- α/β 産生などの自然免疫応答を惹起する因子である。IFN- α/β 産生には、これまでの研究から、IRF-3 \rightarrow IFN- β \rightarrow IFN- α/β シグナル \rightarrow ISGF3 \rightarrow IRF-7 \rightarrow IFN- α/β といういわば「IFN- β の誘導が IFN- α/β 誘導を増強する」という遺伝子発現増幅系路が作動することが示された。すなわち、まず、IRF-3 がウイルス感染を受けて IKK ϵ /TBK1 といったキナーゼによってリン酸化されて活性化され、核内へ移行し、IFN- β の転写を直接活性化する。IFN- β は IFN- α/β 受容体に結合し、受容体の下流で Stat1、Stat2、IRF-9 の 3 量体である転写因子複合体 IFN stimulated gene factor 3 (ISGF3) が形成される。ISGF3 は IFN 誘導遺伝子群の中の一つである IRF-7 を転写誘導する。ウイルスによって活性化された

IRF-7 は *IFN- α* と *IFN- β* の両遺伝子の転写を誘導することによって、ウイルス感染に対して迅速かつ大量の *IFN- α/β* 産生を可能にし、抗ウイルス応答を増強させている。

一方、*IFN* 誘導遺伝子群の誘導に関しては、*IFN- α/β* の下流の *IFN- α/β* 受容体→*ISGF3*→*IFN* 誘導遺伝子という経路以外に、ウイルス感染による転写誘導機構についてはよく知られていない。実際、*IFN* 誘導遺伝子は数百にも及ぶが、それらがどのような転写調節を受けているのかは不明な点が多く残されているので、本研究ではいくつかの遺伝子を取りあげ、それらのウイルス感染による転写誘導における *ISGF3*、*IRF-3*、および *IRF-7* の役割についてマウス胎仔線維芽細胞を用いて解析を行った。

IFN 誘導遺伝子である *ISG15* の *IFN- β* 刺激による誘導は、完全に *ISGF3* (*IRF-9*) 依存性であるが、ウイルス (NDV) による誘導は *IFNAR1* (*IFN- α/β* 受容体のサブユニット) 欠損細胞や *IRF-9* 欠損細胞でも認められることから、*IFN- α/β* による誘導とは異なり、*ISGF3* に依存しない経路も存在することが判明した。他方、同じく *IFN* 誘導遺伝子である *OAS* の誘導は、NDV 感染時も *IFN- β* 刺激時と同様に、*IFNAR1* 欠損細胞や *IRF-9* 欠損細胞で認められなかったことから、完全に *ISGF3* 依存性であった。

ISGF3 を介さない *ISG15* の誘導経路は *IRF-3* 依存性であると推察された。実際、*IRF-3/9* 両遺伝子欠損 (DKO) 細胞において NDV 感染による *ISG15* の誘導は完全に抑制されていた。DKO 細胞に *IRF-3* を強制発現させると、*ISG15* の誘導がある程度回復するが、*IRF-7* の強制発現では回復しなかった。以上のことより、*ISG15* のウイルス感染による誘導には *IFN- α/β* 刺激→*ISGF3* の活性化を経る経路ばかりでなく、*IRF-3* の活性化による直接誘導の経路が存在することが判明した。

同じく、NDV 感染による他の *IFN* 誘導遺伝子群の発現を解析したところ、調べた全ての *IFN* 誘導遺伝子において NDV 感染による誘導が、DKO 細胞で

は完全に抑制されていた。このことから、IRF-3 と ISGF3 の両者がウイルス感染による幅広い IFN 誘導遺伝子群の誘導に必要であることが示された。

さらに、DKO 細胞に IRF-3 または IRF-7 を強制発現させた細胞を作成し、それらにおける IFN 誘導遺伝子群の誘導を解析した。そして、ISGF3 がいないと IRF-3 を強制発現させても全くウイルス感染による誘導が回復しない遺伝子群 (OAS、PKR) と、ISGF3 がなくても IRF-3 を強制発現させるとウイルス感染による誘導が回復する遺伝子群 (ISG15、ISG54、GBP、IP-10) が存在することを明らかにした。一方、IRF-7 の強制発現は *IFN- α/β* の誘導の回復に有効であるが IFN 誘導遺伝子を直接活性化するという証拠は得られなかった。

これらのウイルス感染時の転写誘導における IRF ファミリーへの依存性のパターンに基づいて、*IFN- α/β* 自身を含む IFN 誘導遺伝子群を次の 4 グループに分類できることを提起した。第一に「ISGF3 のみ」に依存するグループ、すなわち、ウイルス感染による転写が *IFN- α/β* 受容体の下流で活性化される ISGF3 に完全に依存するグループ、があり、OAS、PKR、IRF-7 が属する。第二は「ISGF3 と IRF-3」両転写因子に依存するグループで、ウイルス感染→IRF-3 の活性化を経て低いレベルに直接誘導される経路と、ISGF3 の活性化を介する経路の両方によって誘導されるグループで、ISG15、ISG54、IP-10、GBP が属する。*IFN- β* は第三の「IRF-3 と IRF-7」両因子に依存するグループに属し、*IFN- α* は第四の「IRF-7 のみ」に依存するグループに属する。

さらに、IRF-3 が細胞の抗ウイルス応答において実際に直接的作用を果たしているのかを解析するために、野生型 (WT) と *IRF-3* 欠損細胞におけるウイルス (VSV) の増殖程度を比較した。その結果、*IRF-3* 欠損細胞の方が明らかにウイルスの増殖レベルが高く IRF-3 がウイルスの増殖抑制に重要な役割をしていることを示した。同じ条件下で IFN 誘導遺伝子群の誘導を解析したところ、WT に比べて *IRF-3* 欠損細胞では *IFN- β* のみならず IFN 誘導遺伝子群の誘導が著しく抑制されていた。また、*IRF-3* 欠損細胞は WT 細胞よりもウイルス

(EMCV) 感染に対して死滅しやすいという結果が得られた。これらのことから、IRF-3 は抗ウイルス作用において実際に重要な役割を担っていることが示された。

IRF-3 のウイルス感染による遺伝子誘導の経路は、IFN- β 産生→IFN- α/β 受容体→ISGF3 経路と、IRF-3 による直接の遺伝子誘導経路とに大別することができる。それらの経路が抗ウイルス作用において果たす役割を調べるため、ウイルス感染時に抗 IFN- α/β 抗体を加えることで IFN- α/β 受容体→ISGF3 の経路の遺伝子誘導をブロックし、その条件下において WT と *IRF-3* 欠損細胞で VSV の増殖を比較検討した。その結果、抗体を加えた場合においては、抗体を加えない場合に比べて差は縮まるものの、依然 WT 細胞と *IRF-3* 欠損細胞の間で後者の方がウイルス増殖のレベルは有意に高いことが判明した。このことから、IFN- β 産生→IFN- α/β 受容体→ISGF3 の経路のみならず、IRF-3 の直接誘導の経路も抗ウイルスの生理的作用に寄与していることが示唆された。

このように、IRF-3 による直接経路と IFN- α/β 産生→ISGF3 の経路は、ともに密接に関わり合いながら、IFN- α/β 産生のみならず様々な IFN 誘導遺伝子群の誘導を行うのに必要であることを明らかにした。さらに、これらの遺伝子誘導経路は実際の細胞の抗ウイルス応答の発揮に生理的にも重要な役割を担っていることが示された。

従来より、ウイルス感染時における細胞の抗ウイルス応答は、IFN の誘導とその下流で活性化される転写因子 ISGF3 による IFN 誘導遺伝子群の誘導によって担われていると考えられて来た。本研究では、それに加えてウイルス感染によって活性化される IRF-3 が IFN の誘導を介さない経路によっても抗ウイルス作用を担う遺伝子を誘導することを示した。