

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 ウィルス感染防御における TRAF6 の機能解析

指導教員 井上純一郎 教授

東京大学医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

金野 弘靖

TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6)は、TNF (Tumor necrosis factor)受容体スーパーファミリーや Toll/IL-1 受容体ファミリーからのシグナルを伝達し、転写因子 NF $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B)や AP-1 (Activator protein-1)の活性化を誘導するアダプタータンパク質である。TRAF6 が関係する生命現象は多岐に渡っており、TRAF6 遺伝子欠損マウスの解析から、リンパ節形成、胸腺構築、骨形成、Toll/IL-1 受容体を介した炎症性サイトカイン産生の誘導、皮膚形成、神経管の閉塞、樹上細胞の分化成熟、T 細胞受容体を介したシグナル伝達に関係することが報告されている。従って、TRAF6 の生理的機能を明らかにすることは基礎医学研究の発展に貢献するだけでなく、関連する疾患の原因解明や新たな診断・治療方法の開発にも寄与する研究となる。

本研究では TRAF6 の機能をさらに詳細に明らかにする目的で、以下に示す二つの課題に取り組んだ。

- ① ウィルス感染防御における TRAF6 の機能解析
- ② TRAF6 シグナル制御因子 TIFAB (TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain)の機能解析：TIFAB 遺伝子欠損マウスの作成と表現型の解析

## ウイルス感染防御における TRAF6 の機能解析

近年、RNA ウィルスの感染に対して、炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ , IL-6) や I 型インターフェロン (type I interferon; IFN) 産生を誘導する受容体である RIG-I (Retinoic acid inducible gene I) や MDA5 (Melanoma differentiation-associated gene 5) が同定され、盛んに研究されている。これらの受容体は細胞質に存在しており、RNA ウィルス由来の二本鎖 RNA (dsRNA) を RNA helicase domain で認識し、CARD (Caspase recruitment domain) を介して IPS-1 (IFN $\beta$  promoter stimulator; 別名 MAVS/VISA/Cardif) と結合してシグナルを伝える。IPS-1 の下流では TRAF3、TBK1 (TANK-binding kinase) を介して活性化される IRF (Interferon regulatory factor) によって誘導される IFN 産生と、分子機構は不明であるが NF $\kappa$ B 活性化による炎症性サイトカイン産生が誘導される。

IPS-1 には TRAF6 結合配列 (P-X-E-X-X-Acidic/Aromatic) が存在しており、実際に IPS-1 と TRAF6 が結合することが報告されている。従って、RIG-I/MDA5 を介したシグナル伝達経路に TRAF6 が関係する可能性がある。しかし詳細な分子機構は未だに明らかにされていない。そこで本研究では TRAF6 遺伝子欠損 MEF (Mouse embryonic fibroblast) を用いて、ウイルス感染防御における TRAF6 の機能解析を行った。

RIG-I 及び MDA5 遺伝子欠損マウスの解析から、RIG-I は SeV (Sendai virus) や *In vitro* transcribed dsRNA を、MDA5 は EMCV (Encephalomyocarditis virus) や poly I:C を認識することが知られている。SeV 感染に対する IL-6 産生は TRAF6<sup>-/-</sup> MEF で消失しており、IFN $\beta$  及び IFN $\alpha$  産生は TRAF6<sup>+/+</sup> MEF と比較して TRAF6<sup>-/-</sup> MEF で減弱していた。さらに、EMCV 感染に対する IFN $\beta$  プロモーター活性の増加が TRAF6<sup>-/-</sup> MEF では見られなかった。また、dsRNA (*In vitro* transcribed dsRNA, poly I:C) をカチオン性リン脂質で細胞内にトランスフェクションして RIG-I もしくは MDA5 を活性化し、IL-6 及び IFN $\alpha$  産生を検討したところ、TRAF6<sup>+/+</sup> MEF と比較して TRAF6<sup>-/-</sup> MEF で減弱していた。以上のことから、TRAF6 は RIG-I 及び MDA5 を介した炎症性サイトカイン産生や IFN 産生に関係することが判明した。

次に、転写因子 NF $\kappa$ B 及び IRF 活性化に対する TRAF6 の役割について検討した。Poly I:C のトランスフェクションに対する NF $\kappa$ B 及び IRF の活性化をルシフェラーゼアッセイで検討したところ、TRAF6<sup>+/+</sup> MEF と比較して TRAF6<sup>-/-</sup> MEF では NF $\kappa$ B 及び IRF の転写活性が減少した。また、poly I:C のトランスフェクシ

オン及び SeV 感染による NFκB の活性化を EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) で検討したところ、TRAF6<sup>-/-</sup> MEF で NFκB の核移行が減弱していた。ウイルス感染により活性化する IRF には IRF3 及び IRF7 が挙げられる。IRF3 活性化に伴う二量体化を Native PAGE で検討したところ、poly I:C のトランスフェクション及び SeV 感染に対する IRF3 の活性化は TRAF6<sup>+/+</sup> MEF と TRAF6<sup>-/-</sup> MEF との間で差が見られなかった。以上のことから、TRAF6 は RIG-I 及び MDA5 を介する経路において NFκB 及び IRF の活性化を誘導する機能を有するが、少なくとも IRF3 の活性化には関与しないことが明らかになった。

さらに、TRAF6<sup>+/+</sup> MEF と TRAF6<sup>-/-</sup> MEF との間で NFκB 及び IRF の標的遺伝子の発現量に差が見られるかを Real time PCR 法で検討した。NFκB の標的遺伝子である IκBα、TNFα 及び IL-6 の発現量は TRAF6<sup>-/-</sup> MEF で減少した。IFN 受容体の下流で活性化する ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3) 依存的に発現誘導される IRF7 の発現量は、TRAF6<sup>+/+</sup> MEF と TRAF6<sup>-/-</sup> MEF との間で差が見られなかった。また、IRF3 及び ISGF3 によって発現誘導される IP10 と ISG15 の発現量にも差が見られなかった。しかし、IRF3 と IRF7 によって発現誘導される IFNβ や、IRF7 によって発現誘導される IFNα の発現量は TRAF6<sup>+/+</sup> MEF と比較して TRAF6<sup>-/-</sup> MEF で減少した。以上のことから、TRAF6 は RIG-I/MDA5 を介した経路において、NFκB 活性化を誘導する機能を有することが明らかになった。また、IRF3 活性化に TRAF6 が関与しないこと、しかし IFN の発現は TRAF6<sup>-/-</sup> MEF で減少することから、IRF7 活性化に TRAF6 が関与する可能性が示唆された。

以上のように、RIG-I/MDA5 を介する経路に TRAF6 が存在し、NFκB 及びおそらく IRF7 の活性化を誘導して炎症性サイトカインと IFN 産生を制御することが、本研究により明らかになった。

### TRAF6 シグナル制御因子 TIFAB の機能解析：TIFAB 遺伝子欠損マウスの作成と表現型の解析

本研究では、TRAF6 の機能をさらに詳細に明らかにする目的で、TRAF6 シグナル制御因子として同定されている TIFAB の遺伝子欠損マウスを作成して、その表現型の解析を行った。TIFA ファミリーは TIFA 及び TIFAB から成り、過剰発現の実験から、TIFA は TRAF6 と結合して NFκB 活性化を誘導する機能を持ち、TIFAB は TRAF6 とは結合しないが TIFA を介して TRAF6 と複合体形成し、

NFκB 活性化を負に制御する機能を所有することが判明している。

TIFAB 遺伝子欠損マウスの作成は常法に基づき行った。TIFAB 遺伝子欠損マウスの表現型の解析は、TIFAB の発現が脾臓や胸腺に多いこと、TRAF6 遺伝子欠損マウスに見られる異常が免疫系に多いことから、免疫系を中心に行った。主に TRAF6 遺伝子欠損マウスで異常が報告されている箇所を中心に解析したが、野生型との差は見られなかった。前述のように、TRAF6 がウイルス感染防御を担っていることを本研究で見出している。そこで TIFAB もウイルス感染に対して機能している可能性を考え、ウイルス感染実験を行った。SeV 感染の結果、TIFAB<sup>+/+</sup> MEF と比較して TIFAB<sup>-/-</sup> MEF で IFNα 産生の増強が見られ、一方で IL-6 産生には差が見られなかった。Poly I:C のトランスフェクションに対する NFκB 及び IRF の活性化をルシフェラーゼアッセイで検討したところ、NFκB の転写活性には差が見られなかったが、IRF の転写活性が TIFAB<sup>-/-</sup> MEF で増強していた。また、Poly I:C のトランスフェクションによる NFκB の核移行を EMSA で検討したが、TIFAB<sup>+/+</sup> MEF と TIFAB<sup>-/-</sup> MEF との間で差が見られなかった。以上のことから、TIFAB は RIG-I/MDA5 を介する経路において、IFN 産生に対して抑制的に機能していることを本研究で明らかにした。一方で過剰発現の実験から予測されていた機能とは異なり、NFκB 活性化には関与しないことが明らかになった。

以上のように TRAF6 と TIFAB がウイルス感染に対して機能していることが本研究によって明らかになった。TRAF6 と TIFA ファミリーによるウイルス感染防御機構をさらに詳細に明らかにすべく、今後の研究を遂行する予定である。