

本研究は自然免疫における細胞内に侵入したウイルスやバクテリアに由来する DNA を感知するセンサー分子 DAI の活性化機構を明らかにするために、L929 細胞やマウス胎児繊維芽細胞にレトロウイルスベクターによる DAI 遺伝子の過剰発現および siRNA を用いた DAI 遺伝子ノックダウンの系にて細胞内 DNA が誘導する I 型 IFN 誘導の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 大腸菌を用いて組み替え DAI タンパクを作製し、DNA ビーズと混ぜ、pull-down 実験を行った結果、DAI は直接 DNA と結合することが判明した。また、B-DNA ビーズと DAI タンパク質を混合する際、種々の DNA 及び二本鎖 RNA を競合物として加えて検討したところ、DAI と DNA ビーズとの結合阻害は DNA を競合物として加えたときにのみ生じ、RNA では観測されなかった。これらのことから、DAI は DNA に選択的に結合するが、B-DNA のみならず、様々な DNA に特異的に結合することが判明した。

2. 様々な長さの DNA を用意し、L929 細胞に、これらの DNA をトランスフェクションすることによって刺激を加え、IFN- β mRNA の誘導を RT-PCR にて検討した。その結果、DNA の鎖長依存的に IFN- β mRNA 誘導に増強が認められた。この時の IFN- β 誘導は、DAI の発現量をノックダウンシステムによって低下させることで強く抑制された。これらの結果から DAI による応答は DNA の鎖長に依存していることが示された。

3. DAI は DNA 結合領域 Z α 、Z β 、D3 を個別に欠失させた DAI、さらに全ての結合領域を欠失させた DAI 発現ベクターを作製し、B-DNA との結合を pull-down にて解析を行った。その結果、D3 領域を持たない変異体の場合においては B-DNA との結合が野生型や他の変異体と比較し、顕著に減弱していることが判明した。従って、新しく発見した D3 領域が、DAI の B-DNA 結合に最も重要であると考えられた。

次に、これら変異体の B-DNA 刺激による *Ifnb* 遺伝子の誘導に与える影響を調べた。L929 細胞にこれら DAI 変異体を発現させ、B-DNA 刺激による IFN- β mRNA 誘導について検討を行った。野生型 DAI を発現した細胞においては、コントロールの細胞と比較し、IFN- β mRNA 誘導に約 3 倍程度の増強が認められた。一方、Z α 、Z β または D3 領域をそれぞれ欠失させた変異体では、どの結合領域を欠いても IFN- β mRNA 誘導の増強能が低下していることが判明した。一連の結果から、DAI と B-DNA との結合には D3 領域が必須であり Z α 、Z β の欠失は影響を与えないが、DAI による *Ifnb* 遺伝子の誘導には全ての DNA 結合領域が関与していることが判明した。

4. DNA 結合領域を欠失させた変異体を L929 細胞に発現させ、B-DNA 刺激による DAI と IRF3 との会合を検討することにした。野生型 DAI 発現細胞では、B-DNA 刺激により IRF3 と DAI との結合したに対し、各 DNA 結合領域欠失変異体を発現させた場合においては、B-DNA 刺激後の DAI と IRF3 との結合に全ての変異体で減弱が認められた。これらの結果から、変異型

DAIは *Ifnb* 遺伝子の誘導に重要な IRF3 転写因子との会合に影響があるためであることが示唆された。

5. B-DNA 刺激によって DAI が 二量体 (多量体) を形成するかどうかを検討した。L929 細胞に FLAG タグ付き DAI 及び HA タグ付き DAI を発現させ、B-DNA 刺激での DAI の 二量体 (多量体) 形成を免疫沈降にて検討した。その結果、B-DNA 刺激によって2時間をピークに、DNA 依存的に一過性な DAI の相互作用 (二量体あるいは多量体の形成) が確認された。FK506 結合タンパク質の一部を DAI に結合させた融合タンパク質 (Fv-DAI) を L929 細胞に発現させた。二量体形成薬剤を作用させ、IFN mRNA の誘導を RT-PCR にて検討した。その結果、Fv-DAI を発現させ二量体形成薬剤を加えた時に、IFN mRNA が誘導されることが明らかとなった。DAI が DNA を足場として二量体あるいは多量体を形成することがシグナル伝達に重要であることが示唆された。

6. 以前の研究において、DAI は DNA 刺激依存的に TBK1 セリン/スレオニンキナーゼと結合することが明らかとなっている。DAI が TBK1 によってリン酸化されるか否か検討した。TBK1 を DAI と共に HEK293T 細胞に発現させ PAGE によってタンパクを分離後、ウェスタンブロット解析を行うと DAI のバンドが上方にシフトすることが観測された。一方、この lysate を予め脱リン酸化酵素である CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) を作用させると上方にシフトしたバンドは検出されなかった。この結果から、DAI は TBK1 の高発現によってリン酸化を受けることが示唆された。次に、DAI のどのアミノ酸が TBK1 によってリン酸化されるか検討することにした。DAI の Ser352 及び Ser353 の二つの隣接したセリン残基をアラニンに点変異した DAI 変異体 (DAI-A1 及び DAI-A2) を作成し、L929 細胞に発現させ、B-DNA 刺激時の IFN- β 誘導に与える影響について検討した。その結果、野生型 DAI において観測される IFN- β mRNA 誘導の増強効果はこれら変異体で著明に減弱することが明らかとなり、これらセリン残基は DAI を介した IFN- β mRNA 誘導に重要であることが示された。さらに、これら変異体を用いて、TBK1 及び IRF3 との会合について検討を加えた。その結果、これらの変異体と TBK1 及び IRF3 との会合は野生型に比べ顕著に減弱していることが判明した。

7. マウス胎児繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast ; MEFs) において DAI ノックダウンを行い、この細胞においても B-DNA によって誘導される DAI は効率よくノックダウンされていた。しかし、この細胞における B-DNA 及び ISD 刺激時の IFN- β mRNA の誘導を RT-PCR にて検討した結果、若干の低下が認められるものの L929 細胞でみられたような著明な減弱は観測されなかった。これらの結果から、DNA 認識受容体として DAI の役割においては、細胞種特異的に活性化への寄与の度合いが異なっており、DAI 以外にも更に DNA 認識受容体が存在することが示唆された。

8. DAI と相同性を持つ内在性分子として ADAR1 の DNA 刺激による応答への関与を調べるため、MEF にレトロウイルスを用いて ADAR1 を過剰発現させ、B-DNA 刺激し、IFN- β mRNA の誘導を RT-PCR にて検討した。その結果、B-DNA 刺激による IFN- β mRNA 誘導は、ADAR1 発現細胞において、コントロール細胞と比較して抑制されていた。さらに、*Adar1* 遺伝子欠損

MEF を用いて検討を行った。DNA や DNA ウイルスである I 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) を感染させ、IFN- β の誘導を RT-PCR にて検討した。その結果、*Adar1* 遺伝子欠損 MEF では、ADAR1 の過剰発現とは逆に、刺激による IFN- β mRNA の誘導に顕著な増強が認められた。ADAR1 は B-DNA 刺激及び DNA ウイルス感染による *Ifnb* 遺伝子の誘導に対して、負の調節に寄与する DNA 認識分子であることが示唆された。

9. DNA 認識受容体 DAI に相同性を示すワクシニアウイルス由来の E3L タンパク質を MEF にレトロウイルスを用いて発現させ、B-DNA 刺激後の IFN- β mRNA の誘導を RT-PCR にて検討した。その結果、E3L の過剰発現によって、コントロール細胞と比較し、IFN- β mRNA 誘導が著明に抑制されることが判明した。このことから、E3L タンパク質には、恐らく DAI と相同性を有する Z α ドメインを介して DNA に結合し、DAI や他の DNA 認識受容体と拮抗することによって、細胞質内 DNA 刺激による免疫応答を抑制することが示唆された。

以上 本研究によって、DNA 認識受容体 DAI がどのように DNA を認識し、シグナル伝達を活性化していくか、その一端を明らかにすることが出来た。また、細胞質内 DNA の認識による自然免疫系の活性化システムは、DAI 以外にも DNA 認識受容体が機能する、多様かつ複雑なシステムであることが明らかとなった。これらの結果は生体防御にきわめて重要な自然免疫システムの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。