

## 論文の内容の要旨

論文題目: 新規 DNA 受容体 DAI の同定

指導教官 谷口 維紹 教授

東京大学大学院医学系研究科

2005 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理専攻

氏名 崔 明權

生体は病原体を認識し、免疫系を活性化してこれを排除する。生体における病原体認識は病原体固有のパターンを認識するパターン認識受容体 (pattern recognition receptors) によって担われている。最近の研究から、DNA、RNA など核酸もこれら受容体によって認識され、免疫系を賦活化することが明らかとなってきた。RNA の認識受容体として TLR (Toll-like receptor) 3、TLR7 の Toll 様受容体に加え、RIG-I (retinoic acid inducible gene I) や MDA5 (melanoma differentiation antigen 5) といった細胞質内 RNA 認識受容体の存在が明らかにされている。一方、DNA についてはこれまで TLR9 のみが同定されていたが、TLR9 非依存的に、細胞質内に暴露された DNA によって免疫系が活性化される報告が相次ぎ、TLR9 以外にも DNA 認識受容体が存在することが示唆されていた。

本研究において、この DNA 認識受容体として DAI (DNA-dependent activator of IFN regulatory factors) を同定した。DAI は N 末端領域に Z $\alpha$ 、Z $\beta$  の二つの DNA 結合ドメインを有し、Z 型 DNA に結合することは知られていたものの、その生物学的機能については未知のままであった。私は、DAI が I 型 IFN (interferon) によって発現誘導されることに着眼し、この分子が細胞質の DNA 認識を通して I 型 IFN 遺伝子を活性化し、誘導された IFN のシグナルによって更に DAI 発現が亢進することによって自然免疫系の増幅的活性化が起きるのではないかと考えた。そこでまず、DAI を高発現させた細胞を樹立し、その細胞では DNA 刺激時の IFN 誘導が亢進することを見いだした。一方で、RNAi によるノックダウンシステムにより DAI の発現量を低下させると、DNA 刺激時の IFN 誘導が顕著に減弱することを見いだした。一連の現象は二本鎖 RNA である poly (rI:rC) の刺激では認められなかったことから、DAI は DNA 特異的な応答に関与していると考えられた。DNA 刺激による IFN 誘導には TBK1 キナーゼ及び IRF3 が重要であることが知られているが、ノックダウンシステムによって DAI の発現量を低下させると、B-DNA 刺激による IRF3 の活性化が減弱していた。また DNA 刺激によって IFN 以外にも interleukin-6 や Cxcl10 などのサイトカイン、ケモカインが誘導されるが、DAI ノックダウンによって、これらの誘導は減弱し、さらに様々なサイトカイン、ケモカイン誘導に関与していると考えられる NF- $\kappa$ B 転写因子の活性化も抑制されていた。一連の結果は DAI が DNA を認識し、自然免疫系の活性化シグナルを伝達することを示唆していた。そこで、DAI と B-DNA との結合について検討したところ、YFP-DAI 発現細胞におい

てローダミンラベルされた B-DNA との間に蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer ; FRET) が観測された。更に pull-down assay の実験から DAI と B-DNA が結合することも明らかとなった。さらに DAI と B-DNA との結合について、DAI の様々な欠失変異体を作製し検討したところ、DAI と B-DNA との結合には、従来から知られていた Z $\alpha$ 、Z $\beta$  の DNA 結合ドメインではなく、それらの C 末端側に存在する新たな領域で B-DNA と結合していることが明らかとなった。この領域を欠失した変異体を過剰発現しても B-DNA 刺激による IFN 誘導の増強効果が認められなかった。また、DAI と IRF3 及び TBK1 との相互作用について免疫沈降実験によって検討したところ、B-DNA 刺激依存的に DAI と IRF3 及び TBK1 が結合することが判明した。この結合は DAI の C 末端領域を介しており、この領域を欠失させた DAI 変異体は IRF3 及び TBK1 と結合せず、DAI 高発現による B-DNA 刺激時の IFN 誘導の増強効果は認められなかった。すなわち、DAI は、本研究によって見出された新しい DNA 結合領域によって B-DNA と結合し、C 末端領域を介して IRF3 及び IRF3 の活性化に必要な TBK1 キナーゼと結合し、B-DNA 刺激による IFN 産生に至るシグナルを伝達していることが示された。DAI による DNA 認識機構の重要性をウイルス感染において検討したところ、DAI ノックダウン細胞において、DNA ウイルスである単純ヘルペスウイルスの複製が亢進し、一方で RNA ウイルスであるニューキャッスル病ウイルスでは、ウイルス複製に影響を与えなかった。これらの結果から、DAI は DNA ウイルス感染防御に重要な役割を担う分子であることが明らかとなった。

以上、本研究から、DAI が DNA 認識受容体として機能する証拠が挙げられたことによって、これまで不明であった、細胞質内 DNA 刺激による IFN 及びサイトカイン誘導に象徴される自然免疫系の活性化機構の一端を解明できたものと考えられる。