

## 審査の結果の要旨

氏名 崔 明權

本研究は新規DNA認識受容体の同定をするため、細胞質内DNA受容体のもつ性質として、IFN- $\alpha/\beta$ 誘導性であり、TBK1、IRF3を活性化出来、かつDNAに結合できる蛋白質の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス胎児繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast ; MEF) をIFN- $\beta$ で処理し、total RNAに対してマイクロアレイ解析を行った結果、N末端領域にZ $\alpha$ 及びZ $\beta$ の2つのDNA結合ドメインを持つDLM-1/ZBP1 (Z-DNA binding protein 1) 分子が誘導されていることを見出した。I型IFNシグナルに応答しない*Ifnar1*+/MEFにおいて著明に減弱していたことから、DLM-1/ZBP1はDNA刺激時にI型IFNによって誘導される分子であることが示された。
2. DLM-1/ZBP1をL929細胞にレトロウイルスベクターを用いて発現させ、DNA刺激時のI型IFN誘導について検討したところ、コントロール細胞と比較してDLM-1/ZBP1を高発現させた細胞において有意に高いIFNの誘導が認められた。一方で二本鎖RNAであるpoly (rI:rC) 刺激によるIFN mRNAの誘導にはDLM-1/ZBP1の発現は影響を与えなかった。これらの結果から、DLM-1/ZBP1はDNAによる刺激応答に関与している分子であることが示された。以上の結果に基づき、この分子をDAI (**D**NA-dependent **a**ctivator of **I**FN regulatory factor) と呼ぶこととした。
3. B-DNA刺激によるI型IFN産生へのIRF3、IRF5及びIRF7の関与を調べたところ、IFN- $\beta$  mRNAの誘導はIRF3に大きく依存しており、IRF5及びIRF7の関与は認められなかった。IFN- $\alpha$ 4 mRNAの誘導にはIRF3のみならず、IRF7も関与していることが明らかとなった。
4. siRNA ベクターを使用したノックダウンシステムを用いて、DNA刺激におけるDAIの役割について検討を加えたところ、DNA刺激によるIFN- $\beta$  mRNA誘導は、DAIノックダウン細胞において顕著に減弱していた。またpoly (rI:rC) 刺激によるIFN- $\beta$  mRNAの誘導にはDAIのノックダウンは影響を与えなかった。これらの結果からも、DAIはDNA刺激でのサイトカイン誘導に関与していることが示された。
5. B-DNA刺激によるIRF3の活性化をIRF3のホモ二量体形成能を指標にNative PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) にて検討したところ、DAIノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較して、IRF3の二量体形成が3分の1程度に減少していた。さらにNF- $\kappa$ Bの活性化をゲルシフトアッセイによって検討した結果、B-DNA刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化もDAIノックダウン細胞においてコントロール細胞と比較して2倍程度の減弱が認められた。一方で、この減弱はpoly (rI:rC) 刺激では観測されなかった。これらの結果から、DAIは、DNA刺激時のサイトカイン誘導において、IRF3やNF- $\kappa$ Bの活性化を制御する上流に位置しているものであることが示された。
6. DAIとDNAとの結合についてFRET解析によって検討したところ、DAIとB-DNAとのFRETが観測されたが、細胞質内RNA認識受容体であるRIG-IとB-DNAとではFRETが観測されなかった。FRETは分子同士が数nm程度の近傍に

存在しないと観察されないことから、DAIとB-DNAが近い距離に存在していることが示された。B-DNAによるDAIのpull-downアッセイによってB-DNAとDAIの結合を検討したところ、DAIはB-DNAでpull-downされた。pull-downする際、過剰量のB-DNAをcompetitorとして加えておいたところ、pull-downされるDAIが過剰量のB-DNAによって競合阻害されていたが、この阻害は二本鎖RNAであるpoly (rI:rC) では観測されなかった。これらの結果からDAIはB-DNA特異的に結合することが示唆され、DNA認識受容体として機能していると考えられた。

7. DAI欠失変異体を作製し、DAIとDNAとの結合ドメインを検討したところ、Z $\alpha$ 及びZ $\beta$ の二つのDNA結合ドメインを欠失したDAIはB-DNAと結合していた。このことはZ $\alpha$ 、Z $\beta$ 以外にDNAとの結合できる領域がDAIに存在することが示唆された。

8. DAIのシグナル伝達機構を調べるために免疫沈降によってDAIとTBK1またはIRF3との会合を検討したところ、DAIとTBK1及びIRF3との共沈が認められ、DAIとTBK1、IRF3がDNA刺激依存的に会合することが示唆された。この会合がDAIのどの領域で起きているかを、DAI欠失変異体を用いて検討した結果、C末端領域約100アミノ酸残基を欠失したDAI- $\Delta$ C1変異体ではTBK1及びIRF3共に、DAIとの会合が著しく減弱していた。これらの結果からDAIはC末端領域でIFN産生に重要な転写因子IRF3と結合し、且つIRF3の活性化に重要なキナーゼTBK1とも結合することが示唆された。

9. DNA応答におけるDAIの生物学的役割の解析するために、DAIノックダウンL929細胞においてウイルス感染でのDAIの役割を検討したところ、DAIノックダウン細胞においてはコントロール細胞と比較して、DNAウイルスであるHSV-1ウイルスの増殖量が上昇した。一方でRNAウイルスであるNDVの増殖には変化は認められなかった。これらの結果から、DAIはDNAウイルスであるHSV-1の抑制に必要であることが示され、感染防御において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上、本論文はDAIが種々のDNAを認識し、IRF3及びNF- $\kappa$ Bの活性化に関わる細胞質内DNA認識受容体として機能することが明らかになった。本研究は、DAIがDNA認識受容体として機能することを示したことによって、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代表される自然免疫系の活性化機構の解明に貢献したものであり、学位の授与に値するものと考えられる。