



Title	核酸認識自然免疫レセプターToll-like receptor 3 により認識されるRNA構造の同定 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	立松, 恵
Description	配架番号 : 2060
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11067号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53798
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Megumi_Tatematsu_review.pdf, 「審査の要旨」



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 立松 恵

	主査	教授	笠原	正典
審査担当者	副査	准教授	松本	美佐子
	副査	准教授	森松	組子
	副査	教授	志田	壽利

学 位 論 文 題 名

核酸認識自然免疫レセプターToll-like receptor 3 により認識される RNA 構造の同定

本研究では、二本鎖 RNA 受容体として知られる Toll-like receptor (TLR) 3 が、不完全な二本鎖構造を持つ安定なウイルス一本鎖 RNA を認識することを示した。

学位審査は 4 名の審査員により非公開で行われ、申請者の発表後、質疑応答が行われた。志田教授より、インフルエンザウイルスの複製過程で二本鎖 RNA が生成されるのではないかと、また RNA の安定性だけで活性の有無が説明できると考えるのかについて質問がなされた。申請者は、インフルエンザウイルスについては複製過程で二本鎖 RNA ができる可能性はあるものの、二本鎖 DNA ウイルスやプラス鎖 RNA ウイルスでは複製中間体として生じる多量の二本鎖 RNA の蓄積が検出されており、それらのウイルスに比較すると生成量は少ないと考えられると回答した。一本鎖 RNA による TLR3 活性化では RNA 構造の安定性が非常に重要であるものの、欠損体を用いた実験では、DOTAP 試薬によりエンドソーム内へ一本鎖 RNA を送達した場合でも D2 や D4 では活性がなかったことから、RNA が分解されない条件でも TLR3 に認識される構造と認識されない構造があると考えられることを説明した。森松准教授より、エンドソーム内の RNase により RNA が分解されるか、またポリオウイルス内で PV5 は今回予測した構造をとるのか、ウイルス NP によって RNase 耐性があるものとならないものがあるが、ポリオウイルスではどうかについて質問があった。申請者は、エンドソーム内にどのような RNase が存在するかはわからないが、少なくとも安定な構造部分は維持されるために TLR3 に認識されると考えており、DOTAP 試薬により RNA が安定化した状態でエンドソームに送達する、分解をほとんど受けない条件での実験も行ったことを説明した。ポリオウイルス内の全長ゲノム RNA は、任意の領域で予測した構造をもつとは考えられず、細胞外に流出した場合は切断されやすい部分から分解されて安定な立体構造を作る二本鎖領域を多く含む RNA が残りやすいと考えていると回答した。さらに、PV5 領域を含むより長い配列の二次構造解析では PV5 部分で同じ構造は予測されないことも付け加えた。ウイルス NP により RNase への耐性が異

なっていることは把握しておらず、ポリオウイルスを含めて TLR3 が感染応答に関与するウイルスでの NP について検討課題とすると答えた。笠原教授より、今回作製した一本鎖 RNA の中の TLR3 活性化能があるものとなないものの間で、二次構造上の違いを定量的に評価できるかについて質問がなされた。申請者は、全塩基の中で二本鎖形成にかかわる塩基の割合は、TLR3 の活性化能によらずほとんど一定であり、不完全な二本鎖領域の連続性が重要とは考えているが、具体的な指標とするのは難しく、さらに立体的な安定化などは解析することができないと述べた。志田教授より、一本鎖 RNA の場合も二本鎖領域が TLR3 に認識されるのかとの質問を受け、申請者は、TLR3 と結合するには 21 塩基長以上の二本鎖が必要であるが PV5 や PV6 にはその長さの完全な二本鎖部分はないことから、一本鎖 RNA 内の不完全な二本鎖構造であっても TLR3 を活性化できることが新規の発見であると回答した。松本准教授より、ネクローシス細胞から出る自己 RNA の場合にも TLR3 に認識される構造の RNA ができると考えられるか、また、慢性感染症の場合はどうかという質問がなされた。申請者は、熱処理または UV 照射した HEK293 細胞や HeLa 細胞から抽出した RNA では TLR3 応答は見られなかったが、自己由来の RNA でも TLR3 が認識できる構造のものができる可能性は十分に考えられ、今後 TLR3 応答を起こす RNA ができる条件について検討したいと回答した。また、最近疾患特異的なマイクロ RNA が細胞外へエキソサイトーシスされるという報告もあることから、マイクロ RNA に着目した解析も興味深いと述べた。申請者は、すべての質問に対して自らの研究内容と文献的考察を交えて回答した。

この論文は、TLR3 による RNA 認識について感染細胞由来の RNA および *in vitro* 転写 RNA を用いてヒト・マウスの細胞で解析を行い、TLR3 がこれまで考えられていた以上に多様な RNA 構造に対して免疫応答を誘導することを明らかにした。二本鎖 RNA を生じないウイルス感染や非感染性の慢性炎症などにおいて、ウイルスや自己由来の RNA に対する免疫応答のメカニズムの解明につながるものであり、過剰な炎症応答制御に向けて研究が進展することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。