HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	自然免疫応答におけるインターフェロン応答の正の調節因子としてのBinCARD2の解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	鈴木, 啓
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11717号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59156
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiraku_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　鈴木　啓

学　位　論　文　題　名

自然免疫応答におけるインターフェロン応答の正の調節因子としてのBinCARD２の解析

免疫とは自己と非自己の識別にもとづいて，侵入した病原体をはじめとする非自己の排除を行うシステムである．脊椎動物における免疫は自然免疫系と獲得免疫系からなる．感染初期に機能する自然免疫系は，微生物の糖やタンパク質，核酸等の構成分子の構造を認識し，すみやかな病原体や感染細胞の排除を行う生体防御システムである．インフルエンザウイルスなどのRNA ウイルス感染においてはRIG-I やMDA5 といった細胞内RNA センサー分子がウイルスRNA を認識し，下流のアダプター分子MAVS を介して，ウイルス複製阻害や獲得免疫系の活性化を行うインターフェロン(IFNs)や炎症性サイトカインの産生誘導が行われる．MAVS はサイトカイン産生に必須な分子であるとの報告に加え，ウイルスによる自然免疫回避機構の標的となっているとの報告もあり，細胞内RNA 認識経路において重要な機能を担っていると考えられる．

MAVS はN 末にCARD，C 末にTM ドメインを有するタンパク質であり，ウイルスRNA を認識したRIG-I，MDA5 とCARD で結合するとオリゴマー化して活性化し，TBK1，IRF-3，NF-κB を介してIFNsや炎症性サイトカインの発現を誘導する．ドメインデータベース(Prosite)を用いた解析から，私はMAVS に類似したタンパク質であるBinCARD isoform2(BinCARD2)に着目した．BinCARD2 はN 末にCARD，C 末にTM ドメインを有する．一方，スプライスバリアントのisoform1(BinCARD1)は，BinCARD2 と異なりC 末にTM ドメインを持たない．BinCARD1 はNF-κB の活性化を抑制する分子であることが報告されているが，BinCARD2 に関する機能解析はなされていない．私は，BinCARD2 がMAVS と類似した構造をとることから，RNA ウイルス感染によって引き起こされる自然免疫応答に関与するのではないかと考えて，本研究を行った．

BinCARD2に対する3種類の異なるsiRNAを作製し，HEK293T細胞を用いてBinCARD2のノックダウン効果をqRT-PCR法にて調べた．いずれのsiRNAにおいてもノックダウン効果が認められた．これらのsiRNAを使用して，BinCARD2がRNAによって誘導される自然免疫応答に関与するか解析を行った．HEK293T細胞またはHeLa細胞を用いてこのsiBinCARD2によるBinCARD2ノックダウンを行い，RIG-IのリガンドRNAである3pRNA，poly(I:C)による刺激を行いqRT-PCRとルシフェラーゼアッセイを用いて解析を行ったところ，誘導されるIFN-β mRNA量およびIFN-βプロモーター活性は有意に低下した．また3pRNA刺激によって活性化される転写因子IRFsおよびNF-κBのレポーター活性はsiBinCARD２によって有意に低下したことから，BinCARD2は細胞内RNA認識経路において転写因子IRFsおよびNF-κBの活性化を引き起こし，IFN応答を正に制御していることが示された．

次にBinCARD2 が細胞内RNA 認識経路のどこで作用するかを調べるために，RNA 認識経路

に関与する分子を過剰発現することによって誘導される IFN-β プロモーター活性化が BinCARD2 のノックダウンによってどのような影響を受けるかについて検討した．その結果，HEK293T 細胞での MAVS または TBK1 過剰発現による IFN-βプロモーター活性化は siBinCARD2 により低下したが，細胞外 RNA 認識経路のアダプター分子 TRIF，転写因子である活性化型 IRF-3 の過剰発現によって誘導された IFN-β プロモーター領域の活性化は変化しなかった．以上の結果から BinCARD2 は MAVS，TBK1 の周辺で機能することが示唆された．

次に BinCARD2 と会合する分子を調べるため，HEK293T 細胞において 3xHA tag 融合 BinCARD2 と Flag tag 融合 MAVS または TBK1 を過剰発現させ，免疫沈降を行ったところ，BinCARD2 と MAVS の会合が認められたが，TBK1 との会合は認められなかった．さらに BinCARD2 野生型，BinCARD2 の CARD 欠損変異体である BinCARD2ΔCARD，TM ドメイン欠損変異体 BinCARD2ΔTM を用いて同様の実験を行い，MAVS との結合性を検討したところ，野生型の BinCARD2，BinCARD2ΔCARD では MAVS との会合が認められたが，BinCARD2ΔTM では認められなかった．また BinCARD2 と MAVS の局在性を，HeLa 細胞で免疫蛍光抗体法を用いて検討したところ，細胞質における BinCARD2 と MAVS の共局在が観察された．

MAVS は，核酸を認識し活性化した RIG-I と結合し，自身のオリゴマー化によって，下流へシグナル伝達を行うことが知られている．そこで活性化した RIG-I と MAVS の結合，または MAVS 同士の結合(オリゴマー化)が，BinCARD2 のノックダウンによりどのような影響を受けるかについて検討した．HEK293T 細胞で 3xHA tag 融合 RIG-I と Flag tag 融合 MAVS，または 3xHA tag 融合 MAVS と Flag tag 融合 MAVS を過剰発現させ，BinCARD2 ノックダウンを行った結果，siBinCARD2 により RIG-I と MAVS の会合性は変化しなかったが，MAVS 同士の会合性は減少した．これらの結果から，BinCARD2 は MAVS のオリゴマー化に関与することで自然免疫応答を制御することが示唆された．

さらに，実際のウイルス感染においても BinCARD2 が IFN-βおよび炎症性サイトカインの発現誘導に関与するかどうかを検討するために，A549 細胞に RNA ウイルスである VSV(vesicular stomatitis virus)を感染させ，BinCARD2 ノックダウンによる影響を qRT-PCR によって解析した．その結果，siBinCARD2 により IFN-β，炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA 量は有意に低下した．

本研究により，BinCARD2 は外来 RNA に対する細胞内 RNA 認識経路においてアダプター分子 MAVS と会合し，そのオリゴマー化に関与することにより，自然免疫応答を正に制御することが示唆された．