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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　鈴　木　啓

審査担当者
主査　教授　田　村　正　人
副査　教授　柴　田　健一郎
副査　教授　進　藤　正　信
副査　教授　高　岡　晃　教（遺伝子病制御研究所）

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

審査は，審査担当者全員の出席の下，はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ，審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた．申請者の提出論文の説明の概要は以下であった．

自然免疫系は，微生物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．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，ウイルスの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が誘導される．MAVS は N 末端側に CARD，C 末端側に TM ドメインを有する分子である．本研究では，MAVS に類似したドメイン構造を有するタンパク質である BinCARD isoform2 (BinCARD2) の RNA ウイルス感染による自然免疫応答における役割を明らかにすることを目的とした．

HEK293T 細胞もしくは HeLa 細胞を用い，siRNA を用いて BinCARD2 のノックダウンを行い，3pRNA もしくは poly(I:C) による刺激を行った．IFN-β mRNA 量，IFN-β プロモーター活性，IRFs および NF-κB レポーター活性のいずれの誘導も BinCARD2 siRNA により有意に低下した．これらより，BinCARD2 は IRFs および NF-κB の活性化を介して，IFN 応答を正に制御していると考えられた．MAVS もしくは TBK1 過剰発現による IFN-β プロモーターの活性化は siBinCARD2 により低下した．一方，TRIF もしくは活性型 IRF-3 の過剰発現による IFN-β プロモーターの活性化は siBinCARD2 により変化しなかった．これらより，BinCARD2 は MAVS 及び TBK1 の周辺における機能が示唆された．

BinCARD2 と会合する分子を調べるため，3xHA タグ融合 BinCARD2 と Flag タグ 融合 MAVS もしくは TBK1 を過剰発現させ，免疫沈降を行った．BinCARD2 と MAVS の会合は認められたが，TBK1 とは認められなかった． また，この MAVS との会合は BinCARD2 の野生型及び CARD 欠損変異体で認められたが，TM ドメイン欠損変異体では認められなかった．免疫蛍光抗体法を用いて BinCARD2 と MAVS の局在性を検討したところ，細胞質における共局在が観察され，BinCARD2 は MAVS と会合していることが明らかになった．

さらに，BinCARD2 を ノックダウンさせたところ，RIG-I と MAVS の会合は変化しなかったが MAVS 同士の会合は減少したことから，BinCARD2 は MAVS のオリゴマー化に関与していることが示唆された．

ウイルス感染において 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検討した．A549 細胞に VSV (vesicular stomatitis virus)を感染させ siBinCARD2 をノックダウンさせたところ， IFN-β 及び IL-6 の mRNA 量は有意に低下した．

本研究により，BinCARD2 はウイルス RNA に対する細胞内 RNA 認識経路において 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．

各審査委員からの主な質問項目は，以下である．

1. BinCARD2とMAVSの細胞内の局在はミトコンドリアか．
2. BinCARD2のミトコンドリア膜における局在が，その機能において重要であることを明らかにするためには，どのような実験を行えばよいか．
3. BinCARD2とMAVSのミトコンドリアにおける局在とアポトーシスとの関連性の有無と，アポトーシスを評価する実験を行ったか．
4. BinCARD2とMAVSの構造は類似しているが，RNAウイルスの感染応答における BinCARD2の独自の機能を明確に示すには，どのような実験を行えばよいか．
5. BinCARD2の各種組織における発現の違いとその生理的意義について．
6. BinCARD2の構造とロイシンリッチリピートの有無について．
7. RIG-1のRNA認識部位とその活性化機構について．
8. 過剰発現による実験でBinCARD2とMAVSの結合を示しているが，内在性のこれら分子間の結合についての検討は行われたか．
9. BinCARD2とMAVSのノックアウトマウスの有無及びそれらの表現型について．

申請者からはいずれの質問に対しても適切な回答及び説明が得られ、研究の立案と進行，結果の解析について十分な能力を有していると認められた．

本論文は，BinCARD2 がMAVS と会合しそのオリゴマー化に関与することにより，ウイルスRNA に対する自然免疫応答を正に制御することを明らかにした点が評価され，この業績は今後の生命科学の研究の発展に寄与するものと考えられた．また，試問の結果より学位申請者は十分な学識を有していることが認められた．従って，学位申請者は博士（歯学）の学位を授与されるにふさわしいと認められた．