HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	フォークヘッド転写因子FOXO3aによるインターフェロン-β遺伝子の発現制御機構の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	加島, 裕基
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12604号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65845
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Kashima_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　加　島　裕　基

学　位　論　文　題　名
フォークヘッド転写因子 FOX03a によるインターフェロン-β遺伝子の
発現制御機構の検討

インターフェロン-β（IFN-β）は、ウイルスや細菌の感染により発現が誘導され、抗ウイルス作用や免疫調節、細胞増殖抑制作用を有し、生体防御や癌化抑制において重要である。IFN 応答による炎症反応は生体防御に重要だが、過剰な炎症反応は生体にとって有害となる。過剰な炎症反応は、リウマチや炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス（SLE）、肝炎など様々な疾患の原因、増悪因子となる。そのため、適度な炎症抑制は疾患の治療において重要だが、その機構に関しては不明な点が多い。ウイルス由来の単鎖 RNA（ssRNA）や二重鎖 RNA（dsRNA）、人工的に合成した dsRNA である polyIC などの外来核酸が細胞質内に侵入すると、細胞質内に局在する RIG-I（retinoic acid inducible gene I）や MDA5（melanoma differentiation-associated protein5）がそれらを認識し、ミトコンドリア外膜上の MAVS（mitochondrial antiviral-signaling protein）と結合し、TBK1（TANK-binding protein 1）/IKKε（IkB kinase ε）が活性化する。活性化した TBK1/IKKε は IRF3（interferon regulatory factor）をリン酸化し、リン酸化 IRF3 は二量体を形成して核内へ移行する。核内移行した IRF3 は IFN-β 遺伝子の上流に存在する IRF3 結合配列、ISRE（Interferon stimulated responsive element）へ結合し、IFN-βmRNA 転写が増強される。一方、エンドサイトーシスにより取り込まれた外来核酸は、エンドソーム内の TLR3（Toll-like receptor 3）により認識される。活性化した TLR3 は、アダプター分子 TRIF（TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β）を介して TBK1/IKKα/β を活性化し、IRF3 及び NF-κB の核移行が促進されて IFN-β遺伝子発現が誘導される。

FOXO3a は DNA 結合ドメインとして Forkhead box を有する Forkhead ファミリーのサブタイプ“O”に属する転写因子で、酸化ストレス応答の亢進や糖新生促進、細胞周期停止、アポトーシスの誘導、DNA 修復など生体機能の制御に幅広く関与する。また、FOXO3a は核と細胞質をシャトルすることが知られている。栄養豊富な条件下ではインスリンや IGF-1 などの増殖因子刺激により PI3K-Akt 経路が活性化し、Akt 依存的に FOXO3a はリン酸化される。その結果 FOXO3a は細胞質への移行が促進され、標的遺伝子の転写が抑制される。一方、飢餓条件下では PI3K-Akt 経路は活性化せず、FOXO3a はリン酸化されず核内に留まり、標的遺伝子の転写を促進する。このように、FOXO3a は細胞の栄養状態により細胞の機能や動態を制御し、生体のエネルギー状態に依存した遺伝子発現の調節に関与する。近年、FOXO3a が IFN-β 遺伝子発現を抑制することが報告されたが、その詳細な機序は不明である。そこで、FOXO3a による IFN-β発現抑制の分子機構の解明を目的に解析を行った。

まず、RIG-I/MDA5-MAVS 経路で誘導される IFN-βmRNA 発現に対する FOXO3a の効果を検討した。ヒト胎児由来腎細胞である 293T 細胞、及びヒト TLR3 遺伝子安定発現細

胞株 293-TLR3 細胞に polyIC を導入後、6 時間培養して IFN-βmRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、polyIC により誘導される IFN-βmRNA 発現は FOXO3a により有意に抑制され、FOXO3a は、RIG-I / MDA5-MAVS 経路及び TLR3 経路により誘導される IFN-β mRNA 発現を抑制することが示唆された。続いて、IFN-β 経路における FOXO3a の作用部位を検討した。293T 細胞に IFN-β プロモーター配列を有するレポーター遺伝子を、MAVS、TBK1 および FOXO3a の発現ベクターと共に 293T 細胞に導入し、IFN-βプロモーター活性を Luciferase Assay により解析した。その結果、MAVS、TBK1 の過剰発現により誘導される IFN-β プロモーター活性は FOXO3a の共発現により用量依存的に抑制された。更に、TBK1 導入により誘導される ISRE プロモーター活性もまた FOXO3a により有意に抑制された。また、TBK1、FOXO3a の共発現下で FOXO3a は用量依存的に IFN-βmRNA 発現を抑制した。一方、IRF3 の構成的活性化型変異体（IRF3 5D）で誘導される IFN-β プロモーター活性を FOXO3a は抑制しなかった。更に、免疫共沈降法、Western blotting により FOXO3a と TBK1 の物理的結合を検討した結果、両者の結合が確認できた。同様の検討を FOXO3a、IRF3 で行ったが、両者の結合は観察されなかった。以上より、FOXO3a は細胞質において TBK1 と相互作用する可能性が考えられた。両者の結合は IRF3 または TBK1 のリン酸化に影響する可能性が高いと考え、293T 細胞に TBK1、IRF3 と FOXO3a を共発現させた後に細胞溶解液を調製し、IRF3 の Ser396 のリン酸化、及び TBK1 の Ser172 のリン酸化を western blotting にて確認した。その結果、FOXO3a は TBK1 により誘導される IRF3 のリン酸化を抑制した。この傾向は細胞内在性の IRF3 においても同様であった。一方、FOXO3a は TBK1 のリン酸化には有意な変化を与えなかった。最後に、細胞内在性の FOXO3a が IFN-β 発現に及ぼす影響を検討するため、FOXO3a の細胞内局在が変化した場合の IFN-β 発現を解析した。FOXO3a は PI3K-Akt 経路により核移行が抑制されるため、PI3K-Akt 経路の阻害により細胞内局在を変化させることが可能である。まず、HeLa 細胞を用いて PI3K 阻害剤である LY294002 による処理が FOXO3a の局在性に及ぼす影響を免疫蛍光染色法により確認した。その結果、未処理の HeLa 細胞では FOXO3a は細胞質および核内の両方に局在したが、LY294002 処理により FOXO3a の核内への蓄積が観察された。続いて、LY294002 処理を行った 293T 細胞に対し B 型 DNA を導入した際の IFN-βmRNA 発現を定量的 RT-PCR により解析した。B 型 DNA である polydAdT は、細胞質中の RNA ポリメラーゼ III により dsRNA へ返還され、RIG-I/MDA5 経路を誘導する。その結果、IFN-βmRNA レベルは LY294002 処理により増強した。

以上の結果から、FOXO3a は TBK1 と結合し、IRF3 のリン酸化を抑制することで IFN-βmRNA 発現を負に制御する可能性が考えられた。