



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	フォークヘッド転写因子F0X03a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
Author(s)	加島, 裕基; 大久保, 直登; 中川, 宏治 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(2), 158-168
Issue Date	2018-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68801
Type	journal article
File Information	38_02_05_Kashima.pdf



原 著

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

加島 裕基¹⁾ 大久保直登²⁾ 中川 宏治²⁾ 武田 宏司²⁾ 北川 善政¹⁾

抄 録：インターフェロン- β (IFN- β) はウイルス感染における免疫、炎症反応において重要だが、その発現制御機構は不明点が多い。過去にフォークヘッド転写因子FOXO3aがその産生を負に制御することが報告されたが、詳細な機序に関する報告は少ない。そこで我々はFOXO3aによるIFN- β の発現制御の分子機構の解明を目的に本研究を行った。まず、293T細胞、293-TLR3細胞にFOXO3aを過剰発現させた後にpolyICを導入し、IFN- β mRNA発現量を定量的RT-PCRにより測定した。次に293T細胞にMAVS、TBK1、IRF3-5DをFOXO3と共発現させ、IFN- β プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。その結果、FOXO3aはpolyICにより誘導されるIFN- β mRNAの発現、MAVS、TBK1で誘導されるIFN- β プロモーター活性を抑制した。続いて293T細胞にTBK1、FOXO3a、IRF3を導入後、免疫沈降、ウエスタンブロットによりFOXO3aとTBK1、IRF3の相互作用について検討した。その結果、TBK1とFOXO3aの結合を認め、FOXO3aの共発現によりIRF3のリン酸化が減弱したが、TBK1のリン酸化は変化しなかった。最後に、PI3K阻害剤LY294002処理によるFOXO3aの細胞内局在を免疫蛍光染色により検討した。また、LY294002処理下で、B型DNAであるpolydAdT (B-DNA) により誘導されるIFN- β mRNAの発現量を定量的RT-PCRにて解析した。その結果、LY294002処理によりFOXO3aの核への局在が観察され、同処理下ではB-DNA導入によるIFN- β mRNAの発現が増強した。以上より、FOXO3aはTBK1と相互作用し、IRF3リン酸化を減弱させてIFN- β 発現を負に制御する可能性が考えられた。

キーワード：IFN- β , FOXO3a, TBK1, IRF3

緒 言

生体において炎症反応は生体防御に重要な役割を果たす。しかし、制御から逸脱した過剰な炎症反応は組織や器官を傷害し、生体にとってむしろ有害となる。事実、過剰な炎症反応の亢進は、リウマチや炎症性腸疾患、SLE、肝炎など様々な疾患の原因、増悪因子となり、それらの疾患の原因の究明及び治療法の開発は現在急務であり、適切な炎症制御が疾患の治療において重要である¹⁻¹²⁾。しかし炎症反応の制御機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。

Type I Interferonに属するIFN- β は、ウイルスや細菌の感染により発現が誘導されるサイトカインであり、抗ウイルス作用や細胞増殖抑制作用、免疫調節作用などを有し、生体防御反応やがん化抑制などにおいて重要な役割を果たす¹³⁻¹⁹⁾。

通常、非感染下の細胞では、IFN- β は極めて微量にしか発現しないが²⁰⁾、ウイルスや細菌の感染が生じると、細胞内に存在するパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor : PRR) により外来抗原の成分が認識される。そしてPRRからの細胞内シグナル伝達により核へ情報が伝わり、大量のIFN- β 遺伝子の発現が誘導される^{21, 22)}。ウイルス由来の単鎖RNA (ssRNA) や人工的な二重鎖RNA (dsRNA) であるpolyICは、細胞質に局在するPRRであるヘリカーゼタンパク質RIG-I (retinoic acid inducible gene I) やMDA5 (melanoma differentiation-associated protein⁵⁾) により認識される²³⁻²⁷⁾。ウイルスRNAにより活性化されたRIG-I/MDA5はミトコンドリア外膜に局在するアダプタータンパク質MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein)²⁸⁻³¹⁾ と結合し、Ser/ThrキナーゼであるTBK1 (TANK-binding protein 1)/IKK ϵ (IkB kinase ϵ) を活性化させる³²⁾。活性化したTBK1/IKK ϵ は転写因

¹⁾〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野 口腔診断内科学教室 (主任：北川 善政 教授)

²⁾〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目

北海道大学大学院薬学研究院 医療薬学分野 臨床病態解析学研究室 (主任：武田 宏司 教授)

子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³³⁻³⁷。核移行したIRF3は、IFN- β プロモーターの転写開始点から125塩基上流領域内にあるシスエレメントPRDI-IVにNF κ B及びAP-1複合体と共にISRE (Interferon stimulated response element) へ結合し、ヒストンアセチル化酵素p300/CBPやRNAポリメラーゼIIを含む巨大な転写複合体である“IFN- β enhancesome”を形成することでIFN- β mRNAの転写を著しく増強する³⁸。また、繊維芽細胞や樹状細胞などにおいては、エンドサイトーシスにより取り込まれたウイルス由来のRNAはエンドソーム内に局在するTLR3 (Toll-like receptor 3) により認識される^{39, 40}。活性化されたTLR3は、アダプター分子TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) を介してTBK1/IKK ϵ 及びIKK α/β を活性化する。その結果、IRF3及びNF- κ Bの核移行が促進され、RIG-I/MDA5-MAVSを介した経路と同様にIFN- β 遺伝子発現が誘導される^{41, 42}。

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⁴³で、MnSOD, Catalase, G6PC, p27^{Kip1}, Bim, Fas ligand, GADD45など種々の標的遺伝子の発現を介して、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修復促進など様々な生体機能の制御に幅広く関与している⁴⁴⁻⁵⁰。また、FOXO3aは核と細胞質をシャトルすることが知られており、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はリン酸化を受ける。その結果FOXO3aは細胞質への移行が促進され、標的遺伝子の転写活性が抑制される⁵¹⁻⁵⁵。一方、飢餓条件下ではPI3K-Akt経路の活性化が起こらず、FOXO3aはAktによるリン酸化を受けず核内にとどまり、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することが示されており、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と考えられる⁵¹。

近年の研究から、単球由来樹状細胞や293-TLR4細胞 (Toll-like receptor 4 安定発現293細胞) においては、FOXO3aの過剰発現によりリポポリサッカライド (LPS) 誘導性のIFN- β プロモーターの活性化が抑制されることが示されている⁵⁶。また、FOXO3aノックアウトマウス由来の骨髄マクロファージにおいては、polyIC刺激において、IFN- β 及びISGsであるIRF7 (interferon regulatory factor 7) のmRNA発現が上昇することも報告されている⁵⁷。これらの事実から、FOXO3aはtype I IFNシステムの負の制御因子として機能することが示唆されるが、FOXO3aがどのような機序を介してIFN- β 発現を抑制するのかについては現在明らかにはなっていない。

今回我々は、FOXO3aによるIFN- β 発現制御の分子機構を解明することを目的に解析を行い、FOXO3aがTBK1と直接結合を介してTBK1によるIRF3のリン酸化を低下させ、IFN- β mRNAの発現を抑制するという機序を発見した。

方法と材料

1. 細胞培養及びトランスフェクション

ヒト胎児腎臓293T細胞及びヒト子宮頸がんHeLa細胞は、非働化ウシ胎児血清 (FBS) を10 %添加したダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM) (Wako) 中で、37 °C、5 % CO₂大気下にて培養した。また、ヒトTLR3遺伝子安定発現細胞株293-TLR3細胞 (Invivogen) は、Blasticidin (10 μ g/ml) を含有したD-MEM-10%FBS培養液中において37 °C、5 % CO₂大気下にて培養した。細胞へのプラスミドDNAのトランスフェクションには、Polyethyleneimine “MAX” (Polyscience) を用いた。また、293T細胞へのpolyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) (Sigma) およびpoly (deoxyadenylic-deoxythymidylic) acid (polydAdT) (Sigma) の導入には、LipofectAmine2000 (Invitrogen) を用いた。

2. プラスミド構築

FOXO3a, TBK1, MAVS, IRF3のcDNAは、293T細胞から抽出したtotal RNAを用いてRT-PCR法により単離した。各cDNAの発現ベクターは、それぞれのPCR産物を制限酵素で切断した後、CMVプロモーターを有する発現ベクターpCMV-2 $\times$ T7, pCMV-3 $\times$ FLAG, pCI-neo-3 $\times$ T7, pCI-neo-6 $\times$ MycもしくはpCI-neo-5 $\times$ HAに挿入して構築した。pCMV-2 $\times$ T7, pCMV-3 $\times$ FLAGは、pcDNA3.1 (Invitrogen) にそれぞれ2 $\times$ T7 tag及び3 $\times$ FLAG tagを挿入することにより作製した。またpCI-neo-3 $\times$ T7, pCI-neo-6 $\times$ MycおよびpCI-neo-5 $\times$ HAは、pCI-neo (Promega) にそれぞれ3 $\times$ T7 tag, 6 $\times$ Myc tagおよび5 $\times$ HA tagを挿入することにより作製したものである。IRF3の構成的活性化型変異体IRF3 5D (S396/398/402/404/405D)⁵⁸は、PCRを用いた変異導入法により構築した。

3. 定量的RT-PCRによるIFN- β mRNAレベルの測定

24well collagen plate (BioCoat) で培養した293Tもしくは293-TLR3細胞にFOXO3aの発現ベクターを1.0 μ g/ml導入して24時間培養した。その後、293-TLR3細胞の場合は培地中にpolyICを1.0 μ g/mlで添加し、6時間培養した。また、293T細胞の場合は、polyIC、あるいはB型DNA polydAdt (B-DNA) を1.0 μ g/mlでトランスフェクションし、6時間培養した。その後、1 $\times$ TBSで細胞を洗浄後、IsogenII (Nippon GENE) を用いてtotal RNAを抽出。引き続きPrimeScript (BioTaKaRa) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを得た。

IFN- β mRNA及び β -Actin mRNAレベルは、SYBR Primix

Ex Taq (Tli RNase), ROX plus (TaKaRa) を用いて, Step One Real-Time PCR systemにより測定した (n=3). 相対的なIFN- β の発現量の解析は, β -actinをコントロールとして $\Delta\Delta$ CT法により測定した. プライマーは以下のものを使用した.

human IFN- β Fwd: 5'-ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC-3', Rev: 5'-GCTCATGGAAAGAGCTGTAGTG-3', human β -actin Fwd: 5'-TTGCCGACAGGATGCAGAA-3', Rev: 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'

4. Luciferase AssayによるIFN- β プロモーター活性の測定

24 well collagen plateで培養した293T細胞に, レポータープラスミドpIFN- β -LucもしくはpGL 445 [Luc2P/ISRE/Hygro] (Promega) を, 内部標準用ベクター pGL 4.75 [hRluc-CMV] (Promega) ならびに図中に示した発現ベクター (TBK1, FOXO3a, IRF3 5D) と共に導入して24時間培養した後, Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) 及び GloMax 20/20 Luminometer (Promega) によりIFN- β プロモーター活性を測定した (n=3). 導入したIRF3, TBK1プラスミド量は0.2 μ g/mlとした. FOXO3a導入量は, 導入量を変えない実験では0.2 μ g/ml, 導入量変更する実験では, それぞれ0.1 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 0.4 μ g/mlとした.

5. 免疫蛍光染色によるFOXO3aの細胞内局在の検討

8 well chamber plateにHeLa細胞を図中に示した条件にて培養し, 1×PBSで洗浄後, 4 %パラホルムアルデヒドで4 °C, 30分間固定を行った. 洗浄後に0.1 % TritonX-100で膜透過処理を行い, 3 % BSA-1×PBS溶液により室温で1時間ブロッキングを行った. 洗浄後に抗FOXO3a抗体 (Cell Signaling Technology) と室温で1時間反応させた. 洗浄後, FITC標識抗ウサギIgG抗体 (Invitrogen), DAPI, ファロイジンと反応させた. 洗浄後, プレパラートを作製し, 蛍光顕微鏡BioRevo BZ-9000 (Keyence) にて観察して画像を取得した. 取得した画像に対してはすべて一律にBZ-II解析アプリケーション (Keyence) を用いてヘイズリダクション処理を施した.

6. 免疫共沈降法とWestern blotting

293T細胞にTBK1, FOXO3a, IRF3プラスミドDNAを図中に示した組み合わせでトランスフェクションして24時間培養した. プラスミド導入量は, TBK1, IRF3はそれぞれ1.0 μ g/mlとした. FOXO3aプラスミド導入量は, 用量変更しない実験では1.0 μ g/mlとし, 導入量を変更する実験ではそれぞれ, 0.25 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/mlとした. 培養後, 細胞を回収し, cell lysis buffer [組成 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 % NP-40, protease inhibitor cocktail I (Roche), phosphatase inhibitor cocktail-2,3 (Sigma), 50 μ M MG132, 10 mM

nicotinamide (Wako), 10 μ M trichostatin A (Wako)]に溶解した. 細胞溶解液に対して超音波破碎を10秒間行った後, 21,000×gで15分間遠心分離を行い, 上清を回収してWhole cell lysateとした. Whole cell lysateにanti-FLAG M2agarose (Sigma) を10 μ l添加し, 4 °Cで1時間穏やかに攪拌した後, 800×gで1分間遠心分離を行い, アガロースビーズを回収した. アガロースビーズをcell lysis bufferにて4回洗浄した後, ビーズに3×FLAGペプチド (Sigma) を200 μ g/ml添加して4 °Cで1時間穏やかに攪拌して抗原を溶出し, その上清を免疫沈降物として得た.

Whole cell lysate及び免疫沈降物をSDS-PAGEにより分子量で分画した後, Polyvinylidene Difluoride (PVDF) 膜 (Millipore) に転写した. 転写した膜を5 %スキムミルク-1×TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) 溶液中で30分間ブロッキングした後, 1×TBSTもしくはCan Get Signal (TOYOBO) で希釈した一次抗体と4 °Cで1晩反応させた. 膜を1×TBSTにて室温で5分×4回洗浄した後, horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウスもしくは抗ウサギIgG抗体 (Jackson immunoresearch) と室温で30分反応させた. 1×TBSTで5分×4回洗浄した後, Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) と反応させ, ImageQuant LAS4010 (GEヘルスケア) にて画像を取得した.

7. 統計学的解析

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した. 統計学的有意差の検定にはStudent *t*検定を用い, $P < 0.05$ を有意差ありとした.

結 果

1. FOXO3aはIFN- β 発現を抑制する

はじめに, 細胞質におけるウィルスRNAセンシングシステムであるRIG-I/MDA5-MAVS経路 (図1) で誘導されるIFN- β mRNA発現に対するFOXO3aの効果を検討した. FOXO3aを過剰発現させた293T細胞にpolyICをトランスフェクションした後, 6時間培養してIFN- β mRNA発現量を定量的RT-PCR法により解析した. その結果, polyICの細胞質への導入により誘導されるIFN- β mRNA発現はFOXO3aにより有意に抑制された (図2-A).

次に, TLR3刺激で誘導されるIFN- β mRNA発現にFOXO3aが及ぼす影響を検討した. 293-TLR3細胞にFOXO3aを過剰発現させた後, 培地中にpolyICを添加して6時間培養し, IFN- β mRNA発現量を定量的RT-PCR法により解析した. その結果, polyIC刺激により誘導されたIFN- β mRNAがFOXO3aの過剰発現により有意に抑制された (図2-B). これらの結果から, FOXO3aは既報⁵⁷⁾ と合致して, polyICで刺激されるIFN- β mRNA発現を負に制

御することが確認された。

以上の結果から、FOXO3aは、RIG-I/MDA5-MAVS経路およびTLR3経路により誘導されるIFN- β mRNA発現の負の制御因子として機能することが示唆された。

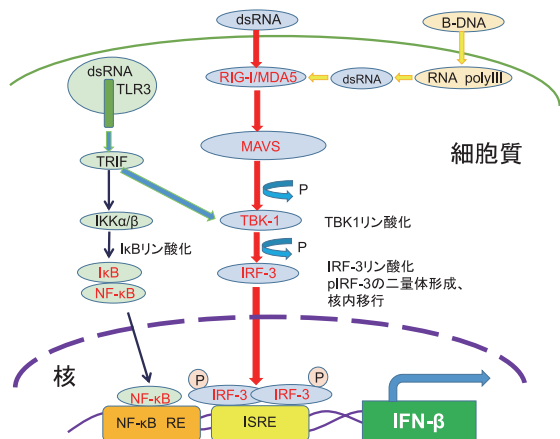


図1 外来核酸によるIFN- β の誘導

ウイルス由来の単鎖RNA (ssRNA) や二重鎖RNA (dsRNA)、人工的に合成されたdsRNAであるpoly IC、人工的に合成されたdsDNAであるB-DNAなどの外来核酸が細胞質へ侵入すると、それらをRIG-I/MDA5が認識し、ミトコンドリア外膜に局在するMAVSを活性化させる。活性化したMAVSはTBK1を誘導し、TBK1のリン酸化が起こる。リン酸化TBK1はIRF3をリン酸化し、リン酸化IRF3は二量体を形成し、核内へ移行する。核内移行したIRF3は、IFN- β 遺伝子の5'上流に存在するISRE (IRF結合配列) に結合し、IFN- β mRNAの転写を促進する。

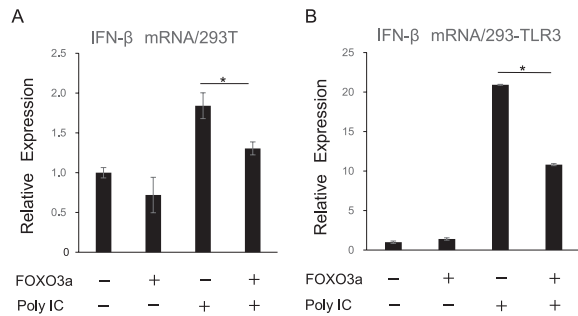


図2 感染刺激下でのIFN- β mRNA発現に対するFOXO3aの影響

A. RIG-I/MDA5-MAVS経路を刺激した場合のIFN- β mRNA発現に対するFOXO3aの影響: FOXO3aを293T細胞にトランスフェクション後、更にpolyICを導入し、定量的RT-PCRにてIFN- β mRNA発現量を測定した (n=3, *P<0.05)。

B. TLR3経路を刺激した場合のIFN- β mRNA発現に対するFOXO3aの影響: FOXO3aをトランスフェクションした293T細胞にpolyICを培地中に添加することで感染刺激を加え、定量的RT-PCRにてIFN- β mRNA発現量を測定した (n=3, *P<0.05)。

A, Bいずれにおいても、発現量の比率は β -actin遺伝子を内部標準として $\Delta\Delta Ct$ により算出し、未刺激条件に対する相対値を平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

2. FOXO3aの作用部位の検討

続いて、FOXO3aがIFN- β 発現を誘導するシグナル伝達経路においてどの部位に作用してIFN- β mRNAの発現を抑制するかを検討した。IFN- β プロモーター配列を有するレポーター遺伝子pIFN- β -Lucを、MAVSおよびFOXO3aの発現ベクターと共に293T細胞にトランスフェクションし、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の過剰発現により誘導されるプロモーター活性の上昇は、FOXO3aの共発現により用量依存的に抑制された (図3-A)。次に、MAVSの下流因子TBK1に対するFOXO3aの効果を同様に検討した結果、TBK1で誘導されるIFN- β プロモーター活性においても、FOXO3aは抑制効果を示した (図3-B)。また、TBK1, FOXO3aの共発現下でのIFN- β mRNA発現を測定した結果、IFN- β mRNAはFOXO3a用量依存的に抑制された (図3-E)。更に、ISRE (Interferon stimulated

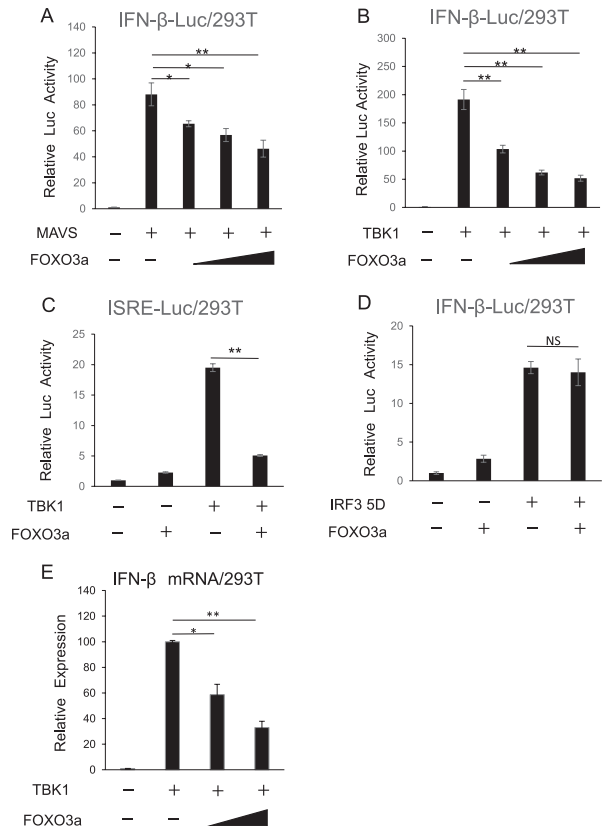


図3 ルシフェラーゼアッセイによるFOXO3aの作用部位の検討

A-D: pIFN- β -LucまたはpISRE-Luc, pGL 4.75 [hRluc-CMV]と共にFOXO3a, 及びMAVS (A), TBK1 (B, C), IRF3 5D (D)を293T細胞に導入, 24時間培養後にプロモーター活性を解析した。

レポーター活性の比率は、empty vectorを導入した条件に対する相対値として、平均値 $\pm$ 標準偏差でグラフに示した。(n=3, **P<0.01, *P<0.05)

E: 293T細胞におけるFOXO3aとTBK1 (E) 共発現下でのIFN- β mRNA発現量を定量的RT-PCRにより測定した (n=4, **P<0.01, *P<0.05)。

responsive element) プロモーター活性も測定した結果、TBK1で誘導されるISREプロモーター活性もまたFOXO3aにより有意に抑制された(図3-C)。しかしながら、TBK1の下流因子であるIRF3の構成的活性化型変異体(IRF3 5D)⁵⁸⁾で誘導されるIFN- β プロモーター活性に対しては、FOXO3aの共発現は抑制効果を示さなかった(図3-D)。これらの結果から、IFN- β 発現誘導に対するFOXO3aの作用部位は、TBK1である可能性が示された。

3. FOXO3aはTBK1と結合し、IRF3のリン酸化を抑制する。

次に、FOXO3aの作用部位がTBK1である可能性をさらに検証するために、FOXO3aとTBK1の物理的相互作用を検討した。293T細胞にFLAG-FOXO3aとT7-TBK1を共発現させ、細胞溶解液を調製したのち、抗FLAG-tag抗体で免疫沈降を行い、沈降物に対し抗T7-tag抗体を用いてwestern blottingを行った。その結果、FOXO3aとTBK1

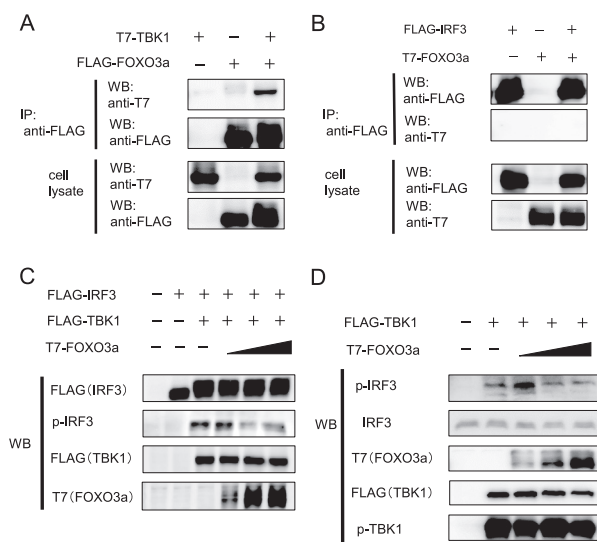


図4 免疫沈降法、ウエスタンブロットによるFOXO3aの作用部位、作用機序の検討

- A. FOXO3とTBK1の結合性の検討: 293T細胞にFLAG-FOXO3aとT7-TBK1を導入した。調製した細胞溶解液に抗FLAG抗体での免疫沈降 (IP)、FLAG peptideでの抗原溶出により免疫沈降物を回収し、各種tagの抗体を用いてwestern blotting (WB) を行った。
- B. FOXO3とIRF3の結合性の検討: 293T細胞にFLAG-IRF3とT7-FOXO3aを導入し、Aと同様に抗FLAG抗体によるIP、各種tagの抗体によるWBを行った。
- C. FOXO3がIRF3のリン酸化に及ぼす影響の検討: 293T細胞にFLAG-IRF3、FLAG-TBK1とT7-FOXO3aを導入し、調製した細胞溶解液に抗リン酸化IRF3 (Ser392) 抗体、各種tagの抗体によるWBを行った。
- D. FOXO3aがTBK1及び細胞内在性のIRF3のリン酸化に及ぼす影響の検討: 293T細胞にFLAG-TBK1とT7-FOXO3aを導入し、調製した細胞溶解液にIRF3抗体、抗リン酸化IRF3 (Ser392) 抗体、抗リン酸化TBK1抗体 (Ser396) 及び各種tagの抗体によるWBを行った。

の共沈降が観察され(図4-A)、両者が複合体を形成することが示唆された。また、TBK1の共発現により、FOXO3aのSDS-PAGEにおける移動度の遅延が観察された(図4-A)。一方、FLAG-IRF3とT7-FOXO3aを用いた共発現系を用いて、免疫沈降法により両者の物理的相互作用を同様に検討したが、IRF3とFOXO3aの結合性は観察されなかった(図4-B)。FOXO3aはTBK1と複合体を形成してIFN- β 発現誘導を抑制する可能性が示唆されたため、次に、FOXO3がTBK1依存的なIRF3のSer396のリン酸化にどのような影響を及ぼすのかを検討した。293T細胞にTBK1、IRF3、FOXO3aを過剰発現させ、そのライゼートに対して抗リン酸化IRF3抗体を用いてwestern blottingを行った。その結果、FOXO3aはTBK1で惹起されるIRF3のリン酸化を抑制した。(図4-C)。更に、FOXO3aとTBK1との相互作用が細胞内在性のIRF3に対しても同様に抑制的に働くかを検討した。293T細胞にTBK1とFOXO3aを共発現させ、図4-Cと同様にして解析を行った。その結果、内在性のIRF3においてもリン酸化が抑制されることが確認できた(図4-D)。しかし、FOXO3aの過剰発現は、TBK1活性化の指標であるTBK1のSer172のリン酸化には有意な変化を与えなかったことから(図4-D)、FOXO3aは、TBK1の活性化自体には影響を及ぼさないことが示唆された。

4. 細胞質に局在するFOXO3aがIFN- β 発現抑制に関与する。

最後に、FOXO3aの局在を変化させた場合のIFN- β の発現変化を解析した。FOXO3aはPI3K-Akt経路により核移行が抑制されることから、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。はじめに、局在観察が容易なHeLa細胞を用いて、PI3K阻害剤であるLY294002⁵⁵⁾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ていたが、LY294002処理によりFOXO3aの核内への蓄積が観察された(図5-A)。LY294002処理によりFOXO3aの核移行が促進されることが確認できたため、次に、LY294002処理を行った293T細胞に対しB型DNA polydAdT⁵⁹⁾を導入した際のIFN- β mRNA発現変化を解析した。B型DNA polydAdTは細胞質のRNAポリメラーゼIIIの作用により二重鎖RNAに変換されることでIFN- β の発現を誘導する事が知られている⁵⁹⁾。定量的RT-PCR法による解析の結果、polydAdT刺激により誘導されるIFN- β mRNAレベルはLY294002処理により増強した(図5-B)。これらの結果から、FOXO3aによるIFN- β mRNA発現抑制は細胞質で生じている可能性が示唆された。

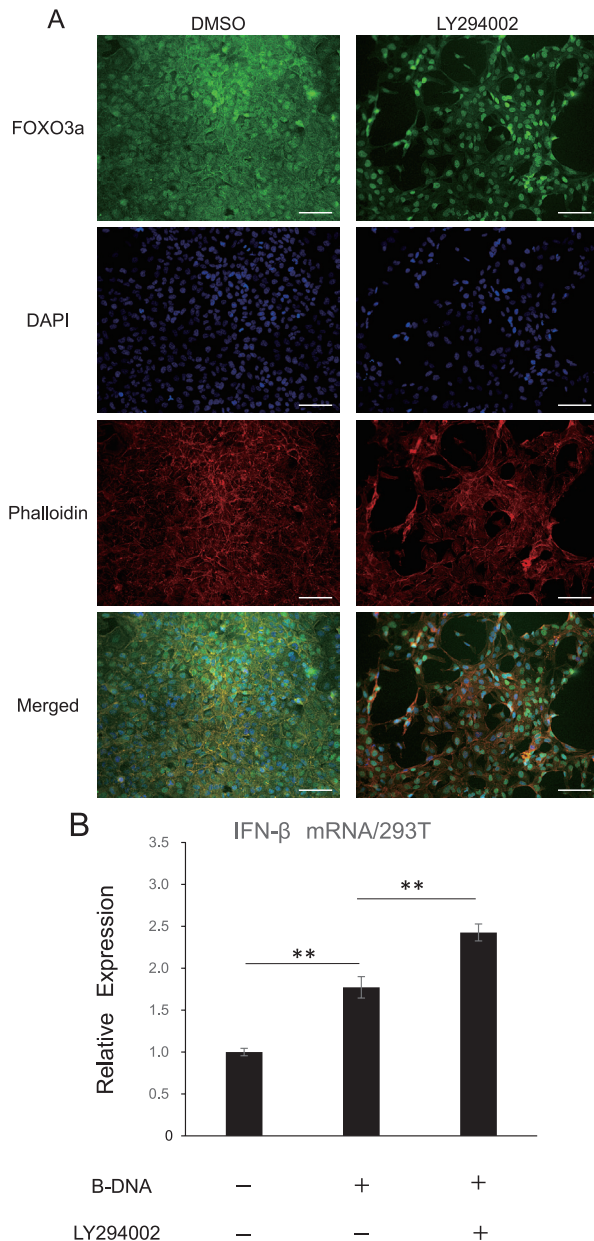


図5 FOXO3aの細胞内局在変化がIFN- β mRNA発現量に及ぼす影響の解析

A. FOXO3a細胞内局在に対するPI3K阻害剤の効果: HeLa細胞に0.4 % DMSOあるいはLY294002 (40 μ M) を培地に添加して6時間培養し, 抗FOXO3a抗体を用いた免疫蛍光染色によりFOXO3aの細胞内局在を比較した. FOXO3a (緑), ファロイジン (細胞骨格マーカー: 赤) DAPI (核マーカー: 青). スケールバーは100 μ mを示す.

B. PI3K阻害剤によるIFN- β mRNA発現量変化: 293T細胞にLY294002を添加後, B-DNA (人工的に合成したB型DNA, polydAdT) を1.0 μ g/ml導入して6時間培養した. 定量的RT-PCRによりIFN- β mRNA発現量を測定した. 発現量の比率は, β -actin遺伝子を内部標準として用いた $\Delta\Delta$ Ctにより算出し, 未刺激条件に対する相対値を平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. (n=3, **P<0.01)

考 察

本研究の結果から, FOXO3aは, TLR3経路およびRIG-I/MDA5-MAVS経路で誘導されるIFN- β 遺伝子の発現を負に制御することが明らかとなった. また, その機序として, FOXO3aは, TBK1と物理的相互作用を介してTBK1によるIRF3のリン酸化を低下させることにより, IFN- β 遺伝子の発現を抑制するという可能性が示唆された.

これまでに, Luronらは, 単球由来樹状細胞や293-TLR4細胞において, FOXO3aの過剰発現は, LPSで惹起されるIFN- β プロモーターの活性化を抑制することを報告している⁵⁶⁾. さらに彼らは, FOXO3aがIRF3と物理的に相互作用することを示し, FOXO3aがIFN- β の誘導に関わる転写因子群と直接的に結合することによりIFN- β プロモーターの活性化を抑制する可能性を示している⁵⁶⁾. しかし, 我々がFOXO3aとIRF3の物理的相互作用について免疫沈降法により検討を行ったところではこれらの因子間で結合性は確認できなかった (図4-B). 本研究において彼らの報告と異なる結果となった原因は不明だが, 実験に使用した細胞株の違いや免疫沈降の際の条件 (塩濃度や界面活性剤濃度など) の違いが影響している可能性があり, FOXO3aとIRF3との結合性についてはさらなる検討が必要であると考える.

一方, 本研究では, レポーター遺伝子アッセイの結果から, FOXO3aは, TBK1の過剰発現で惹起されるIFN- β プロモーターの活性化については抑制効果を示すのに対し, IRF3の構成的活性化体IRF3 5Dの過剰発現によるIFN- β プロモーターの活性化に対しては抑制効果を示さなかった (図3 A-E). さらに, 免疫沈降およびwestern blot解析の結果から, FOXO3a は, TBK1と物理的に結合し (図4-A), TBK1依存的なIRF3のリン酸化を抑制することが示された (図4-C, D). これらの結果から, 我々は, FOXO3aは, TBK1と物理的に相互作用することでTBK1依存的なIRF3のリン酸化を抑制し, IRF3の活性化を低下させることによりIFN- β mRNAの発現を抑制すると予想している. しかしながら現在のところ, FOXO3aはTBK1と結合することにより, どのような機序を介してIRF3のリン酸化を抑制するのかについては不明である. TBK1は, RIG-I/MDA5-MAVSシグナルやTLRシグナル依存的にダイマーを形成し, その結果自己リン酸化により活性化されることが知られているが⁶⁰⁾, 我々のwestern blot解析の結果からは, FOXO3aの共発現によりTBK1のSer172のリン酸化は影響を受けていなかった (図4-D). よって, FOXO3aはTBK1の活性化自体を抑制するのではなく, TBK1によるIRF3のリン酸化の過程を負に制御すると考えられる. その機序として, FOXO3aは, TBK1と相互作用することによりTBK1によるIRF3のリン酸化を競合的に阻害する可能性を考えている. これまでの研究から, TBK1と配列上相同性が高

いSer/ThrキナーゼであるIKK ϵ によりFOXO3aがリン酸化されることが明らかになっており⁶¹⁾、さらに、本研究の結果からもTBK1の共発現により、FOXO3aのSDS-PAGEの移動度の遅延が観察されることから、FOXO3aはTBK1によるリン酸化の基質であることも予想される。したがって、IRF3とFOXO3aはTBK1によるリン酸化反応に対して競合する可能性は高いと思われる。しかしながら、FOXO3aは、TBK1と結合することによりアロステリックにTBK1のキナーゼ活性を阻害する可能性も除外できないことから、今後、TBK1およびFOXO3aの組換えタンパク質を用いてin vitroでキナーゼアッセイを実施し、速度論的解析を行い、阻害様式を決定する必要がある。

本研究の結果から、FOXO3aは、TBK1によるIRF3のリン酸化を抑制することにより、IFN- β mRNAの発現を負に制御するという新規の知見が得られた。しかしながら、本研究は過剰発現系を用いた解析であり、細胞内在性のFOXO3aタンパク質の機能に関しては検証できていない。我々は、複数の配列の異なるsiRNAを用いたRNA干渉法により内在性FOXO3aのノックダウンした場合のIFN- β mRNAの発現を確認したが、その効果は用いたsiRNAの配列により異なり、一定の傾向を得ることが出来なかった。その理由は現在のところ不明であるが、siRNAによるoff target効果ではないかと予測している。今後、よりoff target効果の少ないFOXO3a siRNAをデザインすることや、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集によりFOXO3aノックアウト細胞を作成することなどにより、内在性FOXO3aのIFN- β mRNA発現に対する効果を解析し、本研究で得られた知見が生理的条件下においても起こりうることを実証する必要がある。

また、FOXO3aとTBK1が細胞内のどの部位で相互作用するかについても考慮する必要がある。PI3キナーゼ阻害剤であるLY294002処理によりPI3K-Akt経路を阻害すると内在性FOXO3aの核移行が促進され(図5-A)、polydAdT誘導性のIFN- β mRNAの発現が上昇したことから(図5-B)、FOXO3aによるIFN- β 発現抑制は、主に細胞質で起こっていると考えられる。これらの結果から、我々は、FOXO3aは、主に細胞質でTBK1と物理的に相互作用することによりIFN- β mRNAの発現を抑制していると予想しているが、そのことを更に検証するためにAktによるリン酸化部位への変異導入により常に核内に局在しているFOXO3a T32A, S253A, S315A変異体⁵¹⁾を用いてIFN- β 抑制効果を解析することが必要である。

炎症は生体防御において非常に重要な反応である一方、制御から逸脱した過剰な炎症反応は生体にとってかえって有害となる。したがって、炎症反応のメディエーターである炎症性サイトカインの発現は厳密に制御される必要があり、ウイルスや細菌の感染応答において重要な役割を果たすType I IFNにおいても、その過剰な発現は全身性エリ

ママトーテス(SLE)など自己免疫疾患の発症につながることを示唆されている¹⁻⁵⁾。本研究では、FOXO3aに着目し、FOXO3aによるIFN- β mRNA発現抑制の新規機序を提示した。すでに述べたようにFOXO3aは、生体の栄養状態によりその活性が制御される転写因子であり、本研究から得られた知見と考え併せると、ウイルスや細菌感染で誘導されるIFN- β mRNAの発現は、生体の栄養状態により影響を受ける可能性が考えられる。さらに、栄養状態によるFOXO3aの活性の変動が、SLEをはじめとする自己免疫疾患の発症の制御に関与している可能性も考えられることから、FOXO3aを介したIFN- β mRNA発現抑制機構の全容の解明は、これら疾患の原因究明や治療法開発につながることを期待される。

結 論

FOXO3aはTBK1と結合し、IRF3のリン酸化を抑制することでIFN- β mRNAの発現を負に制御する可能性が考えられた。

参 考 文 献

- 1) Lauwerys BR, Ducreux J, Houssiau FA, Bernard R : Type I interferon blockade in systemic lupus erythematosus : where do we stand? *Rheumatology* 53 : 1369-1376, 2014.
- 2) Crow MK : Advances in Understanding the Role of Type I Interferons in SLE. *Curr Opin Rheumatol* 5 : 467-474, 2014.
- 3) Hagberg N, Rönnblom L : Systemic Lupus Erythematosus - A disease with a dysregulated type I interferon system. *Scand J Immunol* 82 : 199-207, 2015.
- 4) Luo S, Wang Y, Zhao M, Lu Q : The important roles of type I interferon and interferon-inducible genes in systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol* 40 : 542-549, 2016.
- 5) Oon S, Wilson NJ, Wicks I : Targeted therapeutics in SLE : emerging strategies to modulate the interferon pathway. *Clin Transl Immunology* 5 : e79, 2016.
- 6) Zhao Y, Zhang M, Zhao J, Ma X, Huang T, Pang H, Li J, Song J : Inhibition of TLR4 signalling induced inflammation attenuates secondary injury after Diffuse Axonal Injury in rats. *Mediators Inflamm* 2016 : 4706915, 2016.
- 7) Burska A, Boissinot M, Ponchel F : Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* : 545493, 2014
- 8) Rodríguez-Carrio J, López P, Suárez A : Type I IFNs

- as biomarkers in rheumatoid arthritis : towards disease profiling and personalized medicine. Clin Sci (Lond) 128 : 449-464, 2015.
- 9) Strober W, Fuss IJ : Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 140 : 1756-1767, 2011.
- 10) Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A : Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. Autoimmun 13 : 3-10, 2014.
- 11) Zhang L, Xiang W, Wang G, Yan Z, Zhu Z, Guo Z, Sengupta R, Chen AF, Loughran PA, Lu B, Wang Q, Billiar TR : Interferon β (IFN β) production during the double-stranded RNA (dsRNA) response in hepatocytes involves coordinated and feed forward signaling through Toll-like Receptor3 (TLR3), RNA-dependent Protein Kinase (PKR), Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), and Src protein. J Biol Chem 291 : 15093-15107, 2016.
- 12) Liu LM, Tu WJ, Zhu T, Wang XT, Tan ZL, Zhong H, Gao DY, Liang DY : IRF3 is an important molecule in the UII/UT system and mediates immune inflammatory injury in acute liver failure. Oncotarget 7(31) : 49027-49041, 2016.
- 13) Ng CT, Mendoza JL, Garcia KC, Oldstone MB : Alpha and beta type 1 interferon signaling: Passage for Diverse Biologic Outcomes. Cell 164 : 349-352, 2016.
- 14) Capobianchi MR, Uleri E, Caglioti C, Dolei A : Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. Cytokine Growth Factor Rev 26 : 103-111, 2016.
- 15) Carrero JA : Confounding roles for type I interferons during bacterial and viral pathogenesis. Int Immunol 25 : 663-669, 2013.
- 16) Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G : Type I interferons in anticancer immunity. Nat Rev Immunol 15 : 405-414, 2016.
- 17) Teijaro JR : Type I interferons in viral control and immune regulation. Curr Opin Virol 16 : 31-40, 2016.
- 18) Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G : The host type I interferon response to viral and bacterial infections. Cell Res 15 : 407-422, 2005.
- 19) Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B : TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. J Leukoc Biol 100 : 27-45, 2016.
- 20) Gough DJ, Messina NL, Clarke CJ, Johnstone RW, Levy DE : Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. Immunity 36 : 166-174, 2012.
- 21) Brencicova E, Diebold SS : Nucleic acids and endosomal pattern recognition : how to tell friend from foe? Front Cell Infect Microbiol 3 : 37, 2013.
- 22) Hancock RE, Nijnik A, Philpott DJ : Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. Nat Rev Microbiol 10 : 243-254, 2012.
- 23) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T : The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol 5 : 730-737, 2004.
- 24) Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T : Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. J Immunol 175 : 2851-2858, 2005.
- 25) Reikine S, Nguyen JB, Modis Y : Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. Front Immunol 5 : 342, 2014.
- 26) Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T : Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. Curr Opin Immunol 32 : 48-53, 2015.
- 27) Hägele H, Allam R, Pawar RD, Anders HJ : Double-stranded RNA activates type I interferon secretion in glomerular endothelial cells via retinoic acid-inducible gene (RIG)-1. Nephrol Dial Transplant 24 : 3312-3318, 2009.
- 28) Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ : Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. Cell 122 : 669-682, 2005.
- 29) Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S : IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. Nat Immunol 6 : 981-988, 2005.
- 30) Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J : Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. Nature 437 : 1167-1172, 2005.
- 31) Jacobs JL, Coyne CB : Mechanisms of MAVS regulation at the mitochondrial membrane. J Mol Biol 13 425 : 5009-5019, 2013.
- 32) Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC,

- Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T : IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4 : 491-496, 2003.
- 33) Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T : Direct triggering of the type I interferon system by virus infection : activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 17 : 1087-1095, 1998.
- 34) Hiscott J : Convergence of the NF-kappaB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. *Cytokine Growth Factor Rev* 18 : 483-490, 2007.
- 35) Yoneyama M, Suhara W, Fujita T : Control of IRF-3 activation by phosphorylation. *J Interferon Cytokine Res* 22 : 73-76, 2002.
- 36) Servant MJ, Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, Julkunen I, Lin R, Hiscott J : Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* 276 : 355-363, 2001.
- 37) Sato M, Tanaka N, Hata N, Oda E, Taniguchi T.: Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN- β gene. *FEBS Lett* 425 : 112-116, 1998.
- 38) Honda K, Takaoka A, Taniguchi T : Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25 : 349-360, 2006.
- 39) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA : Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413 : 732-738, 2001.
- 40) Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T : Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171 : 3154-3162, 2003.
- 41) Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S : Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169 : 6668-6672, 2002.
- 42) Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T : TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4 : 161-167, 2003.
- 43) Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC : Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* 47 : 187-199, 1998.
- 44) Eijkelenboom A, Burgering BM : FOXOs : signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 : 83-97, 2013.
- 45) Greer EL, Brunet A : FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24 : 7410-7425, 2005.
- 46) Boccitto M, Kalb RG : Regulation of Foxo-dependent transcription by post-translational modifications. *Curr Drug Targets* 12 : 1303-1310, 2011.
- 47) Nho RS, Hergert P : FoxO3a and disease progression. *World J Biol Chem* 26 : 346-354, 2014.
- 48) Accili D, Arden KC : FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117 : 421-426, 2004.
- 49) Nakae J, Oki M, Cao Y : The FoxO transcription factors and metabolic regulation. *FEBS Lett* 582 : 54-67, 2008.
- 50) Burgering BM, Kops GJ : Cell cycle and death control : long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 27 : 352-360, 2002.
- 51) Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. : Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96 : 857-868, 1999.
- 52) Zheng WH, Kar S, Quirion R : Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J Biol Chem* 275 : 39152-39158, 2000.
- 53) Barthel A, Schmoll D, Unterman TG : FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 16 : 183-189, 2005.
- 54) Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME : Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 3 : 952-965, 2001.
- 55) Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF : A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269 : 5241-5248, 1994.
- 56) Luron L, Saliba D, Blazek K, Lanfrancotti A, Udaloa IA : FOXO3 as a new IKK- ϵ -controlled check-point of regulation of IFN- β expression. *Eur J Immunol* 42 :

- 1030-1037, 2012.
- 57) Litvak V, Ratushny AV, Lampano AE, Schmitz F, Huang AC, Raman A, Rust AG, Bergthaler A, Aitchison JD, Aderem A : A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature* 490 : 421-425, 2012.
- 58) Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J : Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 18 : 2986-2996, 1998.
- 59) Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ : RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138 : 576-591, 2009.
- 60) Helgason E, Phung QT, Dueber EC : Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: the emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS Lett* 587 : 1230-1237, 2013.
- 61) Guo JP, Tian W, Shu S, Xin Y, Shou C, Cheng JQ : IKBKE phosphorylation and inhibition of FOXO3a : a mechanism of IKBKE oncogenic function. *PLoS One* 8 : e63636, 2013.

ORIGINAL

Regulation of interferon- β gene expression by forkhead transcription factor FOXO3a

Hiroki Kashima¹⁾, Naoto Okubo²⁾, Koji Nakagawa²⁾, Hiroshi Takeda²⁾ and Yoshimasa Kitagawa¹⁾

ABSTRACT : Interferon- β (IFN- β) plays a pivotal role in immune response induced by viral infection. Previous reports have shown that the forkhead transcription factor FOXO3a negatively regulates IFN- β expression. However, mechanisms underlying the FOXO3a-mediated regulation of IFN- β gene expression are largely unknown. In this study, we aimed to elucidate regulatory mechanisms of the IFN- β gene expression by FOXO3a. At first, we examined the effect of FOXO3a overexpression on polyIC-induced IFN- β gene expression. FOXO3a-transfected 293T or 293-TLR3 cells were stimulated with polyIC and a quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis was performed. We found that overexpression of FOXO3a reduced IFN- β mRNA induced by polyIC treatment. Next, we performed IFN- β promoter reporter gene assay in 293T cells and found that FOXO3a reduced MAVS- and TBK1-induced IFN- β reporter activity. However, FOXO3a had no effect on the reporter activity induced by IRF3 5D, a constitutively active form of IRF3. Furthermore, we examined molecular interaction between FOXO3a and TBK1. Immunoprecipitation analysis showed that FOXO3a physically associated with TBK1. In addition, western blot analysis revealed that overexpression of FOXO3a reduced the TBK1-mediated phosphorylation of IRF3. Finally, we examined the effect of the PI3K inhibitor LY294002 on FOXO3a subcellular localization and IFN- β gene expression. Using immune fluorescent staining, we found that LY294002 treatment induced nuclear translocation of FOXO3a. In addition, qRT-PCR analysis showed that LY294002 treatment promoted IFN- β mRNA levels stimulated with polydAdT treatment in 293T cells. Taken together, these results suggest that FOXO3a negatively regulates IFN- β gene expression by physically interacting with TBK1 and reducing the phosphorylation of IRF3.

Key Words : IFN- β , FOXO3a, TBK1, IRF3

¹⁾Oral Diagnosis and Medicine, Department of Oral Pathobiological Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Yoshimasa Kitagawa), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.

²⁾Department of Pathophysiology and Therapeutics, Division of Pharmasciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University (Chief : Prof. Hiroshi Takeda), Kita 12, Nishi 6, Kita-ku, Sapporo, 060-0812, Japan