

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	脳神経科学領域 脳血管病態学教育研究分野 氏名 早狩 亮
<p>(論文題目)</p> <p>Critical role of IRF-3 in the direct regulation of dsRNA-induced retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression (二本鎖 RNA 依存的なレチノイン酸誘導遺伝子-I の発現誘導における IRF-3 の直接的制御)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>自然免疫系は、宿主に元来備わっている感染防御システムである。細胞にウイルスが感染した際の自然免疫応答は、ウイルスの核酸成分を宿主のパターン認識受容体が認識することで開始される。Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) は、パターン認識受容体の一つであり、細胞質内で、感染したウイルスの二本鎖 RNA を認識する。RIG-I がウイルス RNA を認識すると、その下流の抗ウイルスシグナルが活性化され、interferon (IFN) regulatory factor (IRF)-3 や NF-<math>\kappa</math>B などの転写因子を介して I 型 IFN や炎症性サイトカインの発現が誘導される。細胞から分泌された I 型 IFN は、細胞表面の IFN 受容体に結合し、転写因子である signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) の活性化を介して IFN-stimulated genes (ISGs) の発現を誘導し、それらの ISGs が多角的な抗ウイルス作用を発揮する。したがって、ウイルス RNA の受容体である RIG-I の発現量の調節は、ウイルス感染に対する生体防御において重要と考えられる。</p> <p>これまで、ウイルス感染時の RIG-I の発現は、de novo 合成された IFN により誘導されることが報告されてきた。しかしながら、IFN に依存しない RIG-I の発現調節機構はいまだ明らかにされていない。そこで、本研究では、IFN に依存しない RIG-I の発現調節機構が存在するとの仮説に基づき、以下の検討を行った。</p> <p>まず、I 型 IFN の受容体を欠損する U5A 細胞、STAT1 を欠損する U3A 細胞およびそれらの親株である 2fTGH 細胞を培養し、ウイルスの二本鎖 RNA を mimic する試薬である polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) を導入し、RIG-I mRNA の発現を比較した。その結果、いずれの細胞でも、poly I:C の導入により時間依存的に RIG-I の発現が誘導された。特に poly I:C 導入後早期では、I 型 IFN の受容体や STAT1 が欠損していても、RIG-I の発現が親株と同等に誘導されたことから、IFN に依存しない RIG-I 発現誘導経路が存在することが明らかとなった。</p> <p>次に、これらの細胞および HeLa 細胞において、poly I:C 導入による RIG-I 発現に対する、RNA 干渉法による IRF-3 のノックダウンの影響を検討した。その結果、IRF-3 のノックダウンは、これらの全ての細胞で RIG-I mRNA の発現を抑制した。この結果から、IRF-3 が IFN 非依存的に RIG-I の発現を調節することがわかった。</p> <p>IRF-3 は転写因子として、標的遺伝子のプロモーター領域上にある IRF 結合サイト IRF (binding element; IRF-E) や IFN-stimulated response element (ISRE) に結合し、転写活性を亢進することが知られている。そこで、RIG-I 遺伝子のプロモーター領域を luciferase 遺伝子上流に挿入したプラスミドを作製し、プロモーター活性を luciferase レポーターアッセイで検討した。その結果、RIG-I プロモーター領域上の -2000~-131 (転写開始点より) の欠失はプロモーター活性に影響がなかったのに対し、IRF-E を含む -130~-5 の欠失時にプロモーター活性の著しい低下が認められた。さらに、ゲルシフト法で、RIG-I 遺伝子上の IRF-E 配列と IRF-3 の結合能を検討したところ、野生型 IRF-E 配列は IRF-3 と複合体を形成したが、IRF-E 配列の変異は複合体の形成を消失させた。この結果から、poly I:C を導入した細胞において、IRF-3 が RIG-I 遺伝子の近位プロモーター上にある IRF-E に結合し、RIG-I の転写活性を亢進することがわかった。</p>	

以上の結果から、本研究では、poly I:C を導入した細胞において、転写因子の IRF-3 が RIG-I 遺伝子のプロモーター上の IRF-E に結合し、IFN 発現を介さずに RIG-I の発現を誘導しうることが明らかになった。この経路は、ウイルスに対する感染防御システムを感染早期に増強するメカニズムとして、重要であると考えられた。