

## 学位論文題名

TIPARP Negatively Regulates RIG-I-mediated  
Signaling Pathway

(TIPARPはRIG-Iを介するシグナル伝達経路を負に制御する)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】自然免疫は様々な病原体やデンジャーシグナルに対する生体内の第一線の防衛機構であり、病原性微生物の侵入初期における迅速な免疫応答と次に続く適応免疫活性化への橋わたしとして重要である。この作用は主に I 型インターフェロンを介して行われるが、自然免疫系における I 型インターフェロンと炎症性サイトカインの発現は、パターン認識受容体と呼ばれる微生物認識受容体が微生物由来の様々な構成分子の構造、すなわち糖や脂質、タンパク質、核酸からなる分子パターン（病原体関連分子パターン）を認識することによって惹起される。細胞質型核酸認識受容体である RIG-I は細胞質に侵入した RNA ウイルスを認識し、多くの種類のウイルスに対する感染防御に重要な役割を果たすことが知られている。最近、PARP ファミリー分子の 1 つである PARP-13 (ZAPS) が RIG-I の機能を活性化することで、I 型インターフェロン遺伝子や炎症性サイトカイン遺伝子の発現を増強し、RIG-I によって認識される RNA ウイルスに対して抗ウイルス作用をもたらすことが報告された。TIPARP も 2,3,7,8-tetrachlorodebenzo-p-dioxin (TCDD) によってその発現が誘導される遺伝子として同定された PARP ファミリーの一分子であったが、TCDD による肝臓での糖新生抑制や発癌プロモーションに寄与する報告がなされているのみで、自然免疫系におけるその機能は解明されていなかった。TIPARP の自然免疫系での機能について詳細な解析を行った。

【材料と方法】 HEK293T, A549 細胞, MonoMac6 細胞といったヒト不死化細胞系を使用して主に実験を行った。ヒト TIPARP の遺伝子配列を組み込んだベクターを作製し細胞内にトランスフェクションした過剰発現系と RNA 干渉による細胞内の TIPARP ノックダウン系で主に実験を行った。これらの細胞に、RIG-I のリガンドである pRNA の細胞質内投与や、NDV 感染を行い、RIG-I が伝達する経路への TIPARP の関与を検討した。具体的には、TIPARP 発現ベクターとともにルシフェラーゼレポータープラスミドを共発現させた後に 3pRNA で刺激してからルシフェラーゼアッセイ法を行い、*IFNB* のプロモーター活性や NF- $\kappa$ B プロモーター活性への TIPARP の影響を評価した。同時に 3pRNA 刺激後、NDV 感染後の細胞から total RNA を回収し qRT-PCR 法を用いて I 型 IFNs, 炎症性サイトカイン遺伝子および NDV の F 遺伝子の発現誘導を検討した。また RIG-I シグナル経路のどの位置で TIPARP が機能しているかを評価するために、HEK293T 細胞に RIG-I 経路に関与する分子群を TIPARP と共発現させた後に、qRT-PCR 法で IFN- $\beta$  と IL-6 の mRNA 発現を検討した。I 型 IFNs の産生に必須の転写因子である IRF3 の二量体化に

TIPARP が及ぼす影響を、Native PAGE 法にて測定した。蛍光顕微鏡にて YFP-TIPARP の細胞内局在を確認した。同時に免疫沈降、イムノブロットング法を用いて、TIPARP と RIG-I 経路の下流分子である TBK1 の会合を確認した。NDV 感染では、感染後の培養上清中の IFN- $\beta$  蛋白量を ELISA 法で測定し、TIPARP が及ぼす影響を検討した。最後にダイオキシン類似物質である 3-methylcholanthrene (3-MC) により TIPARP の誘導が見られるか確認した。

【結果】 TIPARP を過剰発現させた細胞で 3pRNA による IFN- $\beta$ 、IFN- $\alpha$ 1mRNA の発現誘導は著明に抑制された。IFN- $\beta$  mRNA 誘導の抑制は TIPARP 発現ベクターの濃度に比例して見られた。3pRNA によって誘導された *IFNB* のプロモーター活性も TIPARP ベクターの濃度依存性に抑制された。TIPARP の siRNA (siTIPARP) によって 3pRNA による IFN- $\beta$  mRNA の誘導が増強した。同様に NF- $\kappa$ B 系の炎症性サイトカインである CXCL10、IL-6 も TIPARP を過剰発現させた細胞で抑制された。これと矛盾なく 3pRNA 刺激により誘導された NF- $\kappa$ B プロモーター活性、IRF3 プロモーター活性も TIPARP 用量依存的に抑制された。TIPARP がノックダウンされた細胞において、3pRNA 刺激での IL-6mRNA の発現誘導は増強した。さらに TIPARP は N-RIG, MAVS, TBK1 が誘導した *IFNB* のプロモーター活性をいずれも顕著に抑制した。TIPARP は TBK1 により誘導された *IFNB* のプロモーター活性と NF- $\kappa$ B のプロモーター活性を発現ベクターの濃度に比例して抑制すると同時に N-RIG, MAVS, TBK1 が発現誘導した IFN- $\beta$  と IL-6 を mRNA レベルでも顕著に抑制した。MAVS と TBK1 の強制発現によって誘導された IRF3 の二量体化は、TIPARP との共発現によって抑制された。HA-TIPARP と Flag-TBK1 を強制発現させた HEK293T 細胞内で両者は刺激依存的に会合を示した。TIPARP の過剰発現により NDV が発現誘導した IFN- $\beta$ 、IL-6、CXCL10 の mRNA は抑制され、NDV の F 遺伝子の発現誘導は上昇した。同様に NDV 感染により誘導された IFN- $\beta$  蛋白も TIPARP の過剰発現により顕著に抑制され、逆に TIPARP をノックダウンすると IFN- $\beta$  蛋白発現が 4 倍程度増強した。MCF7 細胞、A549 細胞において 3-MC により TIPARP が誘導された。

【考察】 ヒトの不死化細胞系において、TIPARP が RIG-I シグナル経路の介在分子である TBK1 との会合を経てその機能を抑制し、I 型インターフェロン産生を負に制御することでウイルス感染を増強させることを示したが、TIPARP がどのような機序で TBK1 の機能を抑止しているかは明らかにすることができなかったため、今後の検討課題であると思われた。また本研究ではそこまで踏み込めなかったが TIPARP が TCDD により引き起こされる免疫抑制を媒介しているかどうか興味を引くところである。

#### 【結論】

1) TIPARP はヒト細胞系において RIG-I シグナル伝達経路を介して誘導される I 型インターフェロンと炎症性サイトカインの産生を抑制する。2) TIPARP は RIG-I 経路の下流分子である TBK1 と会合して、その下流へのシグナル伝達を遮断する。3) TIPARP は NDV ウイルス感染においても、I 型インターフェロンと炎症性サイトカインの産生の負の調節因子としてはたらく。4) TIPARP はヒト細胞系でダイオキシン類似物質により誘導された。

以上より、TIPARP はウイルス感染時の新たな治療標的となりえる可能性を内在している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司  
副 査 教 授 島 山 鎮 次  
副 査 教 授 佐 邊 壽 孝  
副 査 教 授 志 田 壽 利

学位論文題名

## TIPARP Negatively Regulates RIG-I-mediated Signaling Pathway

(TIPARPはRIG-Iを介するシグナル伝達経路を負に制御する)

<内容要約>本研究では PARP-superfamily のメンバーである TIPARP の自然免疫系における新たな役割の解明に迫った。すなわち、培養細胞を用いた過剰発現とノックダウンの実験系において、TIPARP が RIG-I シグナル伝達経路を介して誘導される I 型インターフェロンと炎症性サイトカインの産生を抑制する可能性があることを示している。また RIG-I 経路の下流分子である TBK1 と会合して、その下流へのシグナル伝達を遮断する可能性を示唆しているが、詳細な機序の解明には至らなかった。

<質疑応答>

島山 鎮次教授

①TIPARP のヒトとマウス組織での発現について検討をしているかどうか。

申請者：各組織における TIPARP の蛋白発現レベルは確認していないが、マウスでは mRNA レベルで心臓、腎臓、精巣をはじめとした広範な臓器での発現が報告されている。また LSBM の database によるとヒト組織でも TIPARP のユビキタスな発現が確認されている。

②TIPARP はウイルス感染時に negative feedback によって誘導されてくるのか。プロモーター領域に IRF3 や NF- $\kappa$ B の結合領域が報告されているか。

申請者：3pRNA 刺激後早期 (4-16 時間) においては TIPARP の転写は抑制されるが、24 時間で基準値に回復し、さらに 32 時間では有意に誘導が増強されてくる。また TIPARP のプロモーター領域には NF- $\kappa$ B の結合領域が報告されているが、IRF 系の結合領域は報告されていない。

③TIPARP が NF- $\kappa$ B 経路の IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  のリン酸化に及ぼす影響は検討したかどうか。

申請者：検討していない。IKB $\alpha$ のリン酸化は検討したが、抗体がうまくあたらず検出できなかった。

佐邊 壽孝教授

①日本人にありがちな悪いところとしてこの仕事の位置づけが不明瞭である。TIPARP が RIG-I 経路を抑制することにどのような意義があるのか。RIG-I 経路を抑制する分子の同定は初めてなのか、他に報告があるとしたらそれらの分子との関連はどうとらえるのか。

申請者：RIG-I 経路を抑制することはウイルス感染に脆弱性を示すということである。PARP 阻害剤の存在が報告されており、インフルエンザ感染症などの急性感染症において感染早期での一時的な使用はウイルス感染の抑制に有利に働く可能性がある。また C 型慢性肝炎のような慢性感染症においても、TIPARP が持続的に RIG-I 経路を抑制することにより感染の遷延を引き起こしている可能性があり、PARP 阻害剤の使用により C 型肝炎ウイルスの排除に有利に働く可能性がある。TIPARP 以外にも RIG-I 経路の **negative regulator** は数多く報告されているが、それらとの関連性、相互作用については本研究では検討していない。

②ダイオキシンによる TIPARP の誘導実験で正常細胞を使用せず、がん細胞を使用しているのはなぜか。

申請者：がん細胞が扱い易かったため、まず最初に検討した。今後正常細胞での検討も予定したい。

③TIPARP は他の PARP superfamily の **dominant negative** として働くのか。

申請者：検討していない。現在、ZAPS(PARP13s)の機能を抑制しないか検討中である。

志田 壽利教授

非常にクリアカットな実験結果で実験内容に関して質問することはないが、重要なことは研究室の方針ではなく実際に自分で考えて実験したところはどこか。

申請者：RIG-I 経路を抑制する傾向があることに着目し、TIPARP を実験させてほしいと担当教官に相談した。同時に TIPARP がダイオキシン類によって誘導されるのも興味深いことと感じた。

瀬谷 司教授

はじめに厳しいことを言うがこの細胞内での実験系だけでは何も明らかことは言えない。KO マウスがあるのにそれを使用して実験していない時点で、できることをしていないのだから不十分な検討ということになる。TBK1 との結合実験も **artificial** な系であり過剰発現量を増やせばどんな分子でも結合性は見えてくる。RIG-I がはじめから細胞内に存在していることを前提として実験を進めているが、ほとんどの細胞に RIG-I ははじめから発現していないがどう考えるか。

申請者：RIG-I KO マウスでは、RNA ウイルスによる IFNB がほとんど誘導されないことから内因性に弱く発現している RIG-I が IFNB の誘導に重要な働きをしていることが考えられるため、今回の実験の意義はあると思われる。TIPARP KO マウスの検討も重要だがあくまでマウスでの話になる。ヒトの細胞系での実験は KO マウスを用いた *vivo* の実験に進む足がかりとして、またヒトの細胞を使用しているという点で同じく評価に値すると考える。