

## 学位論文の内容の要旨

専攻	医学専攻	部門 (平成27年度以前入学者のみ記入)	
学籍番号	16D732	氏名	宮崎 亮
論文題目	The mechanism of action of Spi-B in transcriptional activation of the interferon- $\alpha$ 4 gene		
(論文要旨)			
【背景と目的】			
<p>形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)は、ウイルスおよび宿主自身の核酸により活性化され、多量の I 型インターフェロン(IFN)を産生する。この反応は、ウイルス感染に対して生体防御反応として機能する一方で、全身性エリテマトーデスや乾癬といった自己免疫疾患の病態形成にも関わりとされている。我々は、pDCの機能的特徴である I 型IFN産生誘導機構の解析を行ってきた。これまでにpDCに強く発現するEtsファミリー転写因子Spi-Bが、IFN regulatory factor-7 (IRF-7)による I 型IFN遺伝子の転写活性化を、相乗的に促進することを報告している。本研究では、Spi-Bが関与する I 型IFN遺伝子の転写活性化メカニズムについて詳細に解析した。</p>			
【材料と方法】			
<p>IFN-<math>\alpha</math>4遺伝子(<i>Ifna4</i>)プロモーター上のSpi-B結合部位を同定するために、プロモーターのdeletion mutantおよびsingle point mutantを複数作成し、293T細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにて解析した。また、プロモーター領域への転写因子の結合を調べるため、Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)にて解析した。タンパク質間の相互作用については、免疫沈降試験を行った。</p>			
【結果】			
<p><i>Ifna4</i>プロモーターの変異体を用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、Spi-Bは<i>Ifna4</i>プロモーターのIRF-7結合領域に隣接する、グアニン(g-150)を中心とする配列を必要とすることが明らかとなった。さらに、Spi-Bは、同部位を含む2本鎖DNAプローブに結合することをEMSAにて明らかにし、</p>			

Spi-B結合配列を特定した。今回明らかにした結合配列は、Etsファミリー転写因子のコンセンサス結合配列とは異なる配列であった。また、Spi-Bがこのプロモーターに結合する事で、IRF-7のプロモーターへの結合効率が上昇することが示唆された。

続いて、Spi-Bタンパク質の構造変異体を用いることで、*Ifna4*プロモーター活性化において機能する部位の探索を行った。Spi-BのSer-149をAlaに置換した変異体(Spi-B-S149A)を用いると、IRF-7とSpi-Bの共発現による*Ifna4*プロモーターの相乗的な活性化が起こらないことを示した。また、免疫沈降試験の結果、Spi-B-S149Aは野生型Spi-Bと同様にIRF-7に結合できることが明らかとなった。さらに、Spi-B-S149Aは、野生型Spi-Bと同様に*Ifna4*プロモーターに結合できることが、EMSAで確認された。

Spi-BはSer<sup>149</sup>を介して、他の転写調節因子と相互作用をしていると考えられ、転写コアクチベーターとして知られるp300の関与について検討した。Spi-B-S149Aは、p300に依存する*Ifna4*プロモーターの転写活性化を起こさないことが明らかとなった。さらに、免疫沈降試験の結果、p300はSpi-B-149Aと結合できないことが確認された。

#### 【考察】

pDCは核酸認識センサーのToll-like receptor 7/9 (TLR7/9)を選択的に発現している。TLR7/9がウイルスあるいは宿主由来の核酸成分を認識すると、IRF-7がリン酸化され核内へと移行する。本研究によって、核内においてSpi-BとIRF-7が*Ifna4*プロモーター上の極めて近い位置で結合すること、さらにSpi-BのSer<sup>149</sup>を含む領域を介してp300を動員し、*Ifna4*の転写活性を相乗的に増強していることが明らかとなった。今回の結果から、pDCの過剰なI型IFN産生を抑えるために、Spi-Bとp300の結合を阻害する方法を提案する。自己免疫疾患を標的とする、新しい治療手段の開発が期待できる。

掲載誌名	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS		
	第	巻, 第	号
(公表予定) 掲載年月	Available online 25 February 2020	出版社(等)名	ELSEVIER
Peer Review	① 無		

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。