

# 蔡 君柔 論文内容の要旨

## 主 論 文

### A shorter variant of BTBD2 as a novel negative regulator of IRF-associated signalling

IRF-依存性シグナル伝達の抑制因子としての BTBD2 (新規) バリエント

蔡君柔、久保嘉直、馬玉華、安井潔、松山俊文、林日出喜

International Journal of Integrative Biology (in press )

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御系専攻  
(主任指導教員：松山俊文 教授)

## 緒 言

Interferon regulatory factors (IRFs)は、微生物の侵入を認識するパターン認識受容体である TLR (Toll-like receptor)や RLR (RIG-like receptor)からのシグナル伝達、及び I 型インターフェロン (IRF)の発現誘導において重要な役割を果たしている。IRFs はヒトでは 9 種類あるが、免疫応答以外にも細胞分化、増殖、癌化への関与が報告されており、その多様な機能はそれらへの結合タンパク質により制御されている。ここでは T 細胞、B 細胞、樹状細胞の特定のサブセットの分化に必須であるとともに自然免疫にも大きな役割を果たしている IRF-4 の分子メカニズムを明らかにする目的で、酵母細胞の Two-Hybrid (YTH)法を用いて IRF-4 結合タンパク質をクローニングし、解析を行った。

## 対象と方法

IRF-4 の N-末端側 (DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインの一部を含む)を YTH 法のベイトとして、ヒト T 細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

その結果 3 つの分子が IRF-4 と特異的な結合を示したが、中でも最も結合能が高かった broad-complex, tramtrack, and bric-à-brac (BTB) domain containing 2 (BTBD2) についてその IRF-シグナル伝達への影響を以下の方法で検討した。

1. BTBD2 の 2 つのバリエント (v1 及び v2) のクローニングとその欠失変異体の作成
2. RT-PCR、及び Real-time PCR 法を用いた mRNA の検出及び定量
3. BTBD2 と IRFs の免疫沈降法による結合実験
4. ルシフェラーゼをレポーターとした IRF 依存性 IFN $\beta$ 、IL12p40 プロモーター活性、及び NF- $\kappa$ B 依存性プロモーター活性の測定
5. キメラタンパク質 LexA-IRF-7 を用いての核移行の定量
6. siRNA を用いた BTBD2 のノックダウン
7. GFP 標識 BTBD2 を用いた蛍光顕微鏡による細胞内局在観察

## 結 果

1. IRF-4 に結合する新たな分子としてヒト BTBD2 の C-末端部位(BTBD2-CT)をクローニングした。
2. BTBD2 の転写産物として v1 と v2 が GenBank に登録されていたが v2 の生物学的な解析はされていなかった。そこで v1, v2 の全長の cDNA をクローニングし、それらの解析を行った。
3. BTBD2-v2 は、BTBD2-v1 遺伝子の第 3 イントロンから転写が始まり、ユニークな N-末端を有するが、大部分は v1 の C-末端と共通のアミノ酸配列を持つ。すなわち、クローニングした BTBD2-CT と同様の構造になることが判明した。
4. BTBD2-v2-特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法によりその mRNA は HeLa 細胞、THP-1 細胞、Jurkat 細胞等のヒト培養細胞で検出された。
5. BTBD2-v2 タンパク質は BTBD2-CT と同様に IRF-4 だけでなく、IRF-2、IRF-3、IRF-5 及び IRF-7 とともに結合したが、BTBD2-v1 はいずれの分子とも結合しなかった。
6. BTBD2-v2 は IRF-3、IRF-7 依存性の IFN $\beta$ プロモーター活性、及び NF- $\kappa$ B 依存性プロモーター活性を顕著に抑制し、IRF-5 依存性の IL-12p40 プロモーター活性、MyD88 刺激による IRF-7 の細胞質から核への移行に対して抑制作用を示した。
7. 293T 細胞において BTBD2 特異的な siRNA を用いたノックダウンにより、TLR4 刺激による内在性の IFN $\beta$ 、IL-12p40 遺伝子の mRNA の増加が起こった。
8. BTBD2 の欠失変異の解析により、この抑制活性は v1、v2 とともに共有するアミノ酸領域(v1:205~411 番目、v2:1~207 番目)が有していることがわかった。
9. BTBD2-v1 は Cytoplasmic body (CB)と呼ばれる細胞内集合体を形成するが、その N-末端、あるいは C-末端領域を欠失させることにより、BTBD2-CT や BTBD2-v2 のように CB 形成能がなくなり、IRF-7-依存性の IFN $\beta$ プロモーター活性等を抑制する作用を有するようになった。

## 考 察

ウイルス感染等の排除に働く I 型 IFN を含めた炎症性サイトカインの分泌が過剰になると時には炎症反応の遅延による組織の損傷、自己免疫疾患の誘発といった宿主に悪影響をもたらすことが起こりうる。したがって、サイトカインの適切な分泌の調節は極めて重要であり、BTBD2-v2 はこのネガティブフィードバックに働いていると推察された。

その分子メカニズムとして、BTBD2-v1 はその N 末端と C 末端により中央部分にある IRF 依存性の IFN $\beta$ プロモーター活性等の抑制領域を 3 次元的に分子内部に収めているために IRF 分子とは結合できず、IRF シグナル伝達の抑制作用をもたないと考えられた。一方、BTBD2-CT や BTBD2-v2 では N-末端、あるいは C-末端がないために IRF と結合して抑制活性を示す領域が分子の外側に露出することで、IRF シグナル伝達の抑制活性が現れると考えられた。

現在、ウイルスが生き残り戦略として BTBD2-v2 を利用している可能性について検討を始めているところである。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。