

## 小畑 陽子 論文内容の要旨

### 主論文

Role of Cyclophilin B in Activation of Interferon Regulatory Factor-3  
(インターフェロン調節遺伝子-3の活性化におけるサイクロフィリンBの役割)

Yoko Obata, Kazuo Yamamoto, Masanobu Miyazaki, Kunitada Shimotohno,  
Shigeru Kohno and Toshifumi Matsuyama

The Journal of Biological Chemistry, 2005, (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学系専攻  
(指導教授：河野 茂教授)

#### 緒言

Interferon Regulatory Factor (IRF)ファミリーは、インターフェロン(IFN)や IFN 応答遺伝子の発現を調節する転写因子群である。このうち IRF-3 は、恒常的に細胞質に発現しており、ウイルス感染に際して産生される I 型-インターフェロン (I 型-IFN) の転写誘導に必須の因子である。IRF-3 はウイルス感染によって活性化された IRF-3 kinase (IKKepsilon/TBK1)によってリン酸化を受け、2量体化後、コアクティベータである CBP/p300 とホロ複合体を作り、核に移行して I 型-IFN 遺伝子の転写を誘導する。今回われわれは IRF-3 活性化の分子機構を探る目的で IRF-3 と会合する分子のスクリーニングを行い、同定された CypB の役割について解析した。

#### 材料と方法

- 1) bacteria two-hybrid systemを用いたIRF-3 と会合する分子の同定：baitにIRF-3、preyに HeLa細胞のcDNA libraryを使用し  $4.3 \times 10^6$  個のコロニーをスクリーニングした。
- 2) *in vitro* での IRF-3 と CypB の会合の証明：スクリーニングにより同定された CypB と、IRF-3 との *in vitro* での会合を GST-pull down assay にて確認した。また、両者のどの領域が会合に重要であるかを、IRF-3 の deletion mutant と CypB の酵素活性 mutant を作成し、同じく GST-pull down assay にて検討した。
- 3) *in vivo* での IRF-3 と CypB の会合の証明：HT1080 細胞 (ヒト fibrosarcoma cell line) に Newcastle disease virus (NDV) を感染させ、10分後、30分後に回収した細胞の全抽出液を用いて抗 IRF-3 抗体にて免疫沈降を行った。Cyclophilin B の RNA 干渉 (RNAi) によるノックダウン：HT1080 細胞に Lipofectamine2000 を用いて、CypB 特

異的 siRNA を導入し CypB 発現を抑制した。以下の実験にはこの CypB をノックダウンした細胞抽出液を使用した。

- 4) IRF-3 活性化における CypB の役割: NDV 感染によって起こる IRF-3 のリン酸化は、IRF-3 C 末端に対する抗体やリン酸化 IRF-3 に特異的な抗体を用いて、ウエスタンブロットティングにて検討した。NDV 感染によって起こる IRF-3 の 2 量体化は Native PAGE assay にて、IRF-3 のコアクティベータとの会合や IRF-3 の標的遺伝子への結合は Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) とクロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて検討した。
- 5) IFN $\beta$  産生: NDV 感染後の細胞培養液上清中の IFN $\beta$  量を ELISA にて測定した。

## 結果

- 1) bacteria two-hybrid system を用いた IRF-3 と会合する分子の同定: スクリーニングの結果、*cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase (PPIase) 活性をもつ immunophilin の一つである Cyclophilin B (CypB) が同定された。
- 2) *in vitro* での IRF-3 と CypB の会合の証明: GST-pull down の結果から、両者の結合には IRF-3 の autoinhibition domain と CypB の PPIase domain が必要であることが明らかとなった。
- 3) *in vivo* での IRF-3 と CypB 会合の証明: NDV 感染 10 分後の免疫沈降の結果より *in vivo* で実際に IRF-3 と CypB が会合していることが証明された。
- 4) IRF-3 活性化における CypB の役割: CypB をノックダウンした細胞の IRF-3 はウイルス感染時に活性化型と不活性化型の中間の移動度を示し、リン酸化も阻害されていた。また IRF-3 の 2 量体化が阻害され、IRF-3 のコアクティベータとの会合及び標的遺伝子への結合が阻害されていた。
- 5) IFN $\beta$  産生に対する CypB の役割: ウイルス感染時に誘導される IFN $\beta$  の産生は CypB をノックダウンした細胞では、コントロールの 1/9 にまで減少していた。

## 考察

今回の研究により、新たに IRF-3 と結合する蛋白質として、CypB が単離され、両者の結合には IRF-3 の autoinhibition domain と CypB の PPIase domain が必要であることが明らかとなった。CypB の PPIase 活性は、タンパクの folding などに重要であるという報告や、CypB と同じ immunophilin のメンバーである FKBP52 が IRF-4 と会合しその構造変化を通して活性化に関与しているとする報告がある。CypB と IRF-3 の会合は NDV 感染 10 分後で検出されることから、CypB はウイルス感染時の極めて早い段階で IRF-3 のリン酸化を引き起こす構造変化に関与し、引き続いて起こる 2 量体化、コアクティベータとの会合、そして標的遺伝子への結合と転写活性化に必須の役割を果たしていると考えられた。