

主論文

Active Repression of IFN Regulatory Factor-1-Mediated Transactivation by IFN Regulatory Factor-4  
(IRF-4 による、IRF-1 トランス活性化の効果的な抑制)

Kayo Yoshida, Kazuo Yamamoto, Tomoko Kohno, Noriko Hironaka, Kiyoshi Yasui, Chojiro Kojima, Hiroshi Mukae, Jun-ichi Kadota, Shoichi Suzuki, Kiri Honma, Shigeru Kohno, and Toshifumi Matsuyama

International Immunology, 2005, (in press)

長崎大学大学院医学研究科病理系専攻  
(指導教授: 松山 俊文教授)

緒言

Interferon Regulatory Factor (IRF)ファミリーは、インターフェロン(IFN)の産生や IFN の応答を調節する転写因子群である。この中で IRF-4 はリンパ球、マクロファージ、樹状細胞といった免疫担当細胞に局限して発現し、これらの細胞の分化や機能発現に関わっている。IRF-4 の免疫系に果たす重要な役割についてはその遺伝子欠損マウスの解析により明らかにされてきたが、IRF-4 の標的遺伝子や IRF-4 による転写調節機構に関しては不明な点が多い。今回我々は IRF-4 により認識される至適 DNA 配列を決定することにより、その転写調節における役割を明らかにし、更に類似の配列をプロモーター領域にもつ TRAIL, DCIR 遺伝子においての IRF-4 の作用を検討した。

材料と方法

- 1) IRF-4 の至適 DNA 結合配列の決定: リコンビナント GST-IRF-4 融合蛋白を作成し selected and amplified binding site (SAAB) assay を行い、得られた配列を解析した。
- 2) IRF-4 と得られた配列 (SAAB1) との *in vitro* での結合の証明: Electrophoretic mobility shift assay にて確認した。また、既知の IFN-stimulated response elements (ISRE) と DNA 結合活性を比較した。
- 3) *in vivo* での IRF-4、IRF-1、IRF-2 の SAAB1 に対する転写活性の検討: SAAB1 配列を持つルシフェラーゼレポーターを構築、HeLa 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにて IRF-4 と、代表的な IRF である IRF-1 と IRF-2 の SAAB1 に対する転写活性を検討した。また、IRF-1 による転写活性化に対する IRF-4、IRF-2 の影響を比較した。
- 4) IRF-1 による転写活性化の抑制に必要な IRF-4 ドメインの決定: IRF-4 の deletion mutant を作成し、どの領域が転写抑制に必要なかをルシフェラーゼアッセイにて検討した。
- 5) *in vivo* での IRF-1 標的遺伝子に対する IRF-4 の転写抑制効果の証明: SAAB1 に類似した配列を転写調節領域に持つ遺伝子をヒト、マウスのゲノムデータベース中で検索した。これらの転写調節領域

をもつレポーターを作成後、293T 細胞や PBMC に導入し、ルシフェラーゼアッセイにて IRF-1 による転写活性化に対する IRF-4、IRF-2 の効果を比較した。さらに野生型、IRF-1 ノックアウトマウス、IRF-4 ノックアウトマウスの脾臓由来 T 細胞を Con A 処理して得られた mRNA を用い real time PCR 法でその発現を比較検討した。

## 結果

- 1) IRF-4 の至適 DNA 結合配列の決定: SAAB assay の結果得られた配列は ISRE コア配列 (5'-GAAA-3') を1コピーまたは2コピー持つものであった。特徴的なのはコア配列の前後に CpC を持つものが大部分であったことである。
- 2) *in vitro* での IRF-4 と得られた配列(SAAB1)との結合の証明: IRF-4 は SAAB1 配列に結合することが証明され、既知の ISRE (GBP 遺伝子の ISRE)よりも高い結合親和性を示した。
- 3) *in vivo* での IRF-4、IRF-1、IRF-2 の SAAB1 に対する転写活性の検討: IRF-1 は SAAB1 依存的に転写を活性化し、IRF-4、IRF-2 は抑制的に作用した。IRF-1 と IRF-4 を共発現させると IRF-1 による転写活性化は著明に抑制されるが、IRF-1 に対して抑制的に作用する IRF-2 にはこのような効果は認められなかった。
- 4) IRF-1 による転写活性化の抑制に必要な IRF-4 ドメインの決定: IRF-1 による転写活性化の抑制には IRF-4 の DNA 結合ドメインが必要であった。
- 5) *in vivo* での IRF-1 標的遺伝子に対する IRF-4 の転写抑制効果の証明: SAAB1 に類似した配列をヒト TRAIL 遺伝子のプロモーター領域とマウス dendritic cell immunoreceptor (DCIR) 遺伝子の 3'-UTR 領域に認めた。この2つの遺伝子は SAAB1 類似配列依存性に IRF-1 によって転写が活性化され、IRF-4 を共発現させると抑制された。マウス DCIR mRNA の発現は野生型で ConA 依存的に誘導され、IRF-4 ノックアウトマウスではさらに増強していた。対照的に IRF-1 ノックアウトマウスでは誘導されず、DCIR mRNA の発現は IRF-1 と IRF-4 のバランスにより調節されていることが示唆された。

## 考察

今回の研究では IRF-4 に認識される DNA 配列を決定することで IRF-4 の作用を探ろうと試みた。*in vitro* での binding site selection により IRF-4 に特異的な特徴が明らかとなった。IRF-4 が好んで結合した配列は ISRE コア配列が2回繰り返され、その大部分が前後に CpC を持つものであった。これまで同じような binding site selection が IRF-1、IRF-2 についてもなされているが、ISRE コア配列間に挟まれる配列や長さは SAAB1 に比べると変化に富んでいる。このことはある意味 IRF-1 の幅広い生物活性と関連しているのかもしれない。今回得られた SAAB1 配列へは IRF-1 も同様に結合することから、IRF-1 と IRF-4 の間での競合があると考えられる。

現在では公開されたデータベースを用いてゲノム上での転写因子の結合部位が予測可能となっている。この研究では SAAB1 類似配列をいくつかの遺伝子上に見出し、実際にこれらが IRF-1 と IRF-4 により発現調節を受けていることを証明した。このことは免疫細胞における IRF-1 のアンタゴニストとしての IRF-4 の役割の一端を示していると考えられ、今後、同様の調節を受ける標的遺伝子の数がさらに増えることによりその全貌が明らかになると期待される。