

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19209016

研究課題名（和文）DNA 認識分子による自然免疫系の活性化及び免疫応答調節機構

研究課題名（英文）Innate immune system activation and regulation via DNA receptors.

研究代表者

谷口 維紹 (TANIGUCHI TADATSUGU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50133616

研究成果の概要（和文）：

最近我々が新規に同定した細胞質内 DNA センサー分子、DAI (DNA-dependent activator of IRFs) の細胞質内 DNA による活性化機構について詳細な解析を行い、DAI タンパク内の新規 DNA 認識ドメインや DNA 依存性の自然免疫応答惹起に重要なリン酸化修飾サイトを明らかとした。また *in vivo* においてさらに詳細に生理的機能を解析するため、*Dai* 遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスは正常に成長し、リンパ器官における細胞群の構成も野生型マウスと比較して正常であったが *Dai* 遺伝子欠損細胞ではいくつかの抗ウイルス遺伝子の mRNA 誘導が起こらないことを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Recently, we had identified a novel cytosolic DNA sensing molecule, DAI (DNA-dependent activator of IRFs). We analyzed the activating mechanism of DAI by cytosolic DNA stimulation and we found a new DNA binding domain and phosphorylation sites in DAI protein. These domain and amino acid residues are turned out to be important for DNA-mediated activation of innate immune responses. To investigate further the role of DAI in innate immune responses *in vivo*, we generated mice deficient in *Dai* gene. *Dai*^{-/-} mice grew normally with normal cellular population in lymphoid organs compared to those of wild-type control mice. We analyzed the role of DAI in innate immune responses and found defects in mRNA induction levels of some antiviral genes in *Dai*^{-/-} cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	20,300,000	6,090,000	26,390,000
2008 年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	35,100,000	10,530,000	45,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：(1)自然免疫 (2)核酸認識受容体 (3)インターフェロン (4)シグナル伝達
(5)遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

免疫による生体防御は生命の維持においてきわめて重要な機構であり、これら免疫応答系メカニズムは自然免疫系と適応免疫系に大別されてきた。近年の研究により、これら自然免疫系受容体が適応免疫系の活性化にも重要であることが明らかになりつつある。このことから、上述した二つの免疫系の連携による生理作用とその分子機序の解明が大きな注目を集めている。自然免疫応答の活性化機構においてはウイルスやバクテリアに含まれる病原体由来分子パターン、PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) が自然免疫系受容体に認識され、これによって下流のシグナル伝達系が活性化、インターロイキン(IL)-6, IL-12p40などの炎症性サイトカインや、インターフェロン(IFN)、ケモカインなどの発現を誘導する。

それぞれの自然免疫受容体は各々に特異的な分子パターンを認識するが、いまだ未知の受容体およびシグナル経路が存在しており、これら自然免疫受容体に関する研究は現在きわめて注目度の高い分野である。さらに、自然免疫系受容体の新たなグループとして細胞質内の受容体(cytosolic PRRs)が見出されており、このうち特に核酸を認識する分子が脚光を浴びている。

これまでに核酸のうちウイルス由来二本鎖RNAを認識する受容体であるRIG-IやMDA5, PKRなどが同定されているが、ウイルスやバクテリアに含まれるDNAを認識する受容体については、B型DNAなどの類似物質を用いて自然免疫系を活性化する経路の存在のみが示される一方で、その応答を担う分子機構は未知であった。このことから、DNAに対するセンサー分子の研究が注目されていた。

2. 研究の目的

我々は細胞にIFN刺激を施すことにより誘導される遺伝子を網羅的に解析し、その過程でDNA認識による自然免疫応答に関与する遺伝子候補として、DNA-dependent activator of IRFs (DAI)を見出している。さらにこの分子がDNA特異的に免疫応答に関与していることを示唆する予備的知見も得た。よって本研究ではDAIの生理機能およびDNA認識における分子機構の解明を行うことを目的とする。

そのために、本研究においてはDAIとDNAの結合メカニズムおよびその活性化制御機構や、DNA刺激によるDAIのインターフェロン誘導機序におけるシグナル伝達機構について詳細な解析を行う。

また生体内でのDAIの免疫応答制御における

総合的役割について解明するため、*Dai* 遺伝子を欠損したノックアウトマウス等を作製および解析する。

このほかDAIと同様にインターフェロン誘導性遺伝子としてスクリーニングされてきたADAR1についてもDNA認識に対する自然免疫応答への制御機能の解析および検討を行うこととした。

これらの研究結果を総合して、DAIを中心としたDNA認識分子による自然免疫応答の活性化と、その調節機構について統合的な理解をめざす。

3. 研究の方法

研究初年度にあたる平成19年度においては、細胞へ導入したDNAが認識され自然免疫応答を惹起する過程にどのようにDAIが関与するかについて明らかとするため、DAI変異体分子を細胞系に発現させて、DNA刺激によるインターフェロン誘導に対する影響を検討。この手法により、まずDAIを構成するアミノ酸への欠損導入によって、これまで機能が未知であったドメインの役割についての解析を進めた。

また、DNA刺激を行った細胞においてはDAIのセリン残基がリン酸化修飾を受けているという予備的知見が得られたことから、標的と予想されるセリン分子を、リン酸化修飾を受けないアラニンに置換した変異体を作成し、これらの変異体についても同様にDNA刺激によるインターフェロン誘導への影響を検討してDAIの自然免疫応答活性化におけるセリンリン酸化の機能について調べた。

さらに、われわれは免疫沈降実験によってDAIがDNA刺激時に多量体を形成するという予備的知見を得ていることから、DAIの多量体形成が下流シグナルの活性化にいかなる働きをするのかについて解析するため、上記のセリン残基に近接した二箇所のアミノ酸を、S-S結合を形成しうるシステイン分子に置換して、恒常的に二量体を形成しうる変異体についても作成し、同様に検討を進めた。これらの検討によってDAIのDNA認識およびインターフェロン誘導メカニズムについて詳細な解析を行い、仮説モデルを構築した。

続く平成20年度には、それまでのin vitro解析の結果を踏まえ、in vivoにおけるDAIの生理的機能を明らかとするため、*Dai* 遺伝子を欠損したノックアウトマウスの作製を進めた。この他に、昨年度の解析において、DAI以外のDNAセンサー分子を介した自然免

疫応答惹起経路の存在が示唆される結果が得られたことから、他の DNA センサー分子の探索および機能解析を進めた。この候補として、DAI と同時に、IFN 誘導遺伝子の網羅的解析においてスクリーニングされてきた ADAR1 を検討した。さらに RNA センサー分子として知られる RIG-I 等の分子についても DNA に対する認識について機能の再検討を行った。

一方、新たな DNA 認識分子について探索するため、DNA 結合タンパクの沈降解析によって未発見分子の同定を進展させた。

研究最終年度に当たる平成 21 年度には昨年までの研究により得られた *Dai* ノックアウトマウスを用いて、その個体発生及びリンパ球のサブセット構成において野生型との差を検討した。

また、より詳細な DAI の機能解析のために、ノックアウトマウスとは反対に *Dai* 遺伝子を恒常的に高発現する *Dai* トランスジェニックマウスの作成についても検討を進めた。

一方で、平成 20 年度の解析の結果、主要な DNA 結合分子として HMGB1, 2, 3 が同定されたことから、細胞への shRNA 発現ベクター導入による HMGBs のノックダウンを行い、DAI と同様にインターフェロン誘導への影響などこの分子の DNA 認識による自然免疫応答への作用について、詳細に機能解析を行った。

各年度において、得られた成果は複数の論文にまとめ、学術誌にて発表した。

4. 研究成果

(1) DAI の DNA 認識メカニズムおよび活性化機構の解析；

研究初年度にあたる平成 19 年度には、DAI の変異体を作成し、これを細胞内に発現させて DAI を構成するドメインについての機能解析を行った。その結果 $Z\alpha$ ドメインおよび $Z\beta$ ドメインに加えて、新たな DNA 結合ドメイン ($D3$ ドメイン) を同定し、このドメインが DAI による DNA 認識に必須であることを明らかとした。

また、DAI 分子に含まれるセリン残基 (Ser352, Ser353) をアラニンに置換してアミノ酸残基へのリン酸化を阻害した変異体を発現させると DNA 刺激時のインターフェロン産生誘導増強が認められなかったことから、これらのセリン残基のリン酸化修飾が DAI を介した DNA 刺激に対する免疫応答惹起において重要な働きをすることが示唆された。

このほか、免疫沈降実験により DAI は DNA の刺激時に多量体を形成することが示唆されたことから、恒常的に二量体を形成しうる DAI 変異体を作成、発現させたところ、この変異体は DNA 刺激に依存せずインターフェロンを誘導することを見出した。

これらの結果から、DAI は DNA と会合すると $Z\alpha$, $Z\beta$, $D3$ ドメインを介して DNA を認識し、この DNA を介して多量体を形成してインターフェロン誘導に必要な IRF3 や TBK1 などの因子をリクルートするという、モデル仮説が考えられた。上記の経路において DAI のセリン残基リン酸化がどの段階において起こるかは不明ではあるが、DAI セリン残基のリン酸化は IRF3 や TBK1 のリクルートに必要であることが明らかとなった。

(2) ADAR1 の DNA 認識自然免疫応答反応における機能解析；

IFN 誘導遺伝子の網羅的な解析によってスクリーニングされた分子であり、DAI と同じく $Z\alpha$, $Z\beta$ ドメインを有する分子である ADAR1 についても機能の解析を進めた。ADAR1 を欠損した細胞を用いて DNA 刺激時のインターフェロン誘導を検討した結果、ADAR1 が DNA によるインターフェロン誘導等の自然免疫応答を負に制御する因子であることを見出した。

(3) DAI ノックアウトマウスの作成およびフェノタイプ解析；

平成 20 年度および 21 年度には *Dai* 遺伝子を欠損したノックアウトマウスの作製を進め、これを確立するに至った。*Dai* 遺伝子欠損マウスは正常に成長し、リンパ器官における細胞群の構成も野生型マウスと比較して正常であった。この DAI ノックアウトマウスより様々な免疫担当細胞群を調製し、DNA 刺激、及びウイルス感染時の免疫系活性化における DAI の役割を解析した。その結果、ウイルス感染時において、種々の遺伝子の誘導に DAI が重要であるという興味深い現象を見出した。個体レベルでの DAI の感染防御における役割についても検討しており、重要な知見を報告出来ると思われる。

(4) 細胞質内 RNA 受容体 RIG-I の新規機能についての解析；

また、RIG-I についても解析を進めたところ、本分子が RNA のみならず壊死細胞由来の DNA を認識するセンサーとしても機能することを示唆する結果を得た。この RIG-I の新たな機能については、今後も解析を継続することとした。

これらの研究成果により、DNA を中心とした核酸センサー分子による自然免疫応答機構の理解について著しい進展が達成され、その成果は 15 本の学術論文にまとめられて高い国際的評価を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- [1] Savitsky D, Tamura T, Yanai H, and Taniguchi T. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol. Immunother.*, 査読有, Vol. 59, 2010, pp. 489-510,
- [2] Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, Nakasato M, Lu Y, Hangai S, Koshiba R, Savitsky D, Ronfani R, Akira S, Bianchi ME, Honda K, Tamura T, Kodama T, and Taniguchi T. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic acid-mediated innate immune responses. *Nature*, 査読有, Vol. 462, 2009, pp. 99-103,
- [3] Choi MK, Wang Z, Ban T, Yanai H, Lu Y, Koshiba R, Nakaima Y, Hangai S, Savitsky D, Nakasato M, Negishi H, Takeuchi O, Honda K, Akira S, Tamura T, and Taniguchi T. A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 106, 2009, pp. 17870-17875,
- [4] Nakajima A, Nishimura K, Nakaima Y, Oh T, Noguchi S, Taniguchi T, Tamura T. Cell type-dependent proapoptotic role of Bcl2L12 revealed by a mutation concomitant with the disruption of the juxtaposed Irf3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 106, 2009, pp. 12448-12452,
- [5] Suzuki S, Nakasato M, Shibue T, Koshima I, Taniguchi T. Therapeutic potential of proapoptotic molecule Noxa in the selective elimination of tumor cells. *Cancer Sci.*, 査読有, Vol. 100, 2009, pp. 759-769,
- [6] Chen HM, Tanaka N, Mitani Y, Oda E,

Nozawa H, Chen JZ, Yanai H, Negishi H, Choi MK, Iwasaki T, Yamamoto H, Taniguchi T, Takaoka A. Critical role for constitutive type I interferon signaling in the prevention of cellular transformation. *Cancer Sci.*, 査読有, Vol. 100, 2009, pp. 449-456,

[7] Yanai H, Savitsky D, Tamura T, Taniguchi T. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr. Opin. Immunol.*, 査読有, Vol. 1, 2009, pp. 17-22,

[8] Negishi H, Osawa T, Ogami K, Ouyang X, Sakaguchi S, Koshiba R, Yanai H, Seko Y, Shitara H, Bishop K, Yonekawa H, Tamura T, Kaisho T, Taya C, Taniguchi T, Honda K. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 105, 2008, pp. 20446-20451,

[9] Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, Tamura T, Takaoka A, Nishikura K, Taniguchi T. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 105, 2008, pp. 5477-5482,

[10] Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 査読有, Vol. 26, 2008, pp. 535-584,

[11] Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci.*, 査読有, Vol. 99, 2008, pp. 467-478,

[12] Couzinet A, Tamura K, Chen HM, Nishimura K, Wang Z, Morishita Y, Takeda K, Yagita H, Yanai H, Taniguchi T, Tamura T. A cell-type-specific requirement for IFN regulatory factor 5 (IRF5) in Fas-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 105, 2008, pp. 2556-2561,

[13] Kano S, Sato K, Morishita Y, Vollstedt S, Kim S, Bishop K, Honda K, Kubo M, Taniguchi T. The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin12 signaling axis and T(H)1 versus T(H)-17 differentiation of CD4(+) T cells. *Nat. Immunol.*, 査読有, Vol. 9, 2008, pp.34-41,

[14] Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 査読有, Vol. 448, 2007, pp. 501-505,

[15] Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, Fujita T. Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism. *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 282, 2007, pp. 7576-7581,

[学会発表] (計 11 件)

[1] Taniguchi T. “Sensing, signaling and transcription in the innate immune response”. *The 6th Congress of the Chinese Society for Immunology*, 2008. 10. 31-11. 3, 西安、中華人民共和国

[2] Taniguchi T. “Cytoplasmic receptors for the perception of danger”. *1st International Conference on Immunotherapy*, 2008. 10. 17-18, Paris, France

[3] Taniguchi T. “30 Years After the Dawn of Cytokine Molecular Biology: Roles of IRF Transcription Factors”. *Cytokines 2008 - 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society*, 2008. 10. 12-16, モントリオール (カナダ)

[4] Wang Z. et al. Regulation of Innate Immune Responses by DAI (DLM-1/ ZBP1) and Other DNA-sensing Molecules. *7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society*,

2008. 10. 12-16, モントリオール (カナダ)

[5] Taniguchi T. 核酸認識による免疫系の活性化. *ToI1 2008 国際会議*, 2008. 8. 24-27, Lisbon, Portugal

[6] Taniguchi T. The IRF family transcription factors in oncogenes and immunity. *Molecular biology of cancer: 20 years of progress punctuated by the Pezcoller Symposia*, 2008. 6. 11-13, in Trento, Italy,

[7] Taniguchi T. “Interferons and DNA Sensors”. *Perspectives in Immunology Symposium*, 2008. 5. 12, in the Timken Amphitheater, Green Hospital, in La Jolla, California, USA

[8] Taniguchi T. Sensing, signaling and transcription in innate immune responses. *1st International - Singapore Symposium of Immunology*, 2008. 1. 12-16, Biopolis, Singapore

[9] 柳井 秀元. IRF-5 の抗ウイルス応答及び抗腫瘍応答における役割. *日本癌学会*, 2007. 10. 3-5, パシフィコ横浜 (横浜)

[10] Taniguchi T. IRFs in Innate Immune Signaling. *Interacademy Symposium: Innate immunity and its interface with adaptive immunity*, 2007. 8. 31, France

[11] Taniguchi T. Regulation of immune response and tumor suppression by the IRF family transcription factors. *International Conference on Immunology*, 2007. 7. 12-15. China

[図書] (計 1 件)

[1] 谷口 維紹, *南山堂*, 免疫応答と免疫病態の統合的分子理解. 2007. 269 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 維紹 (TANIGUCHI TADATUGU)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50133616

(2)研究分担者

柳井 秀元 (YANAI HIDEYUKI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 7 0 4 3 1 7 6 5

(3)連携研究者

なし