

## 論文内容の要旨

申請者氏名 DYANINGTYAS DEWI PAMUNGKAS PUTRI

ウイルスや細菌といった病原体の感染に対する生体防御において中心的な役割を果たす免疫細胞の一つマクロファージは、Toll-Like Receptors (TLRs)、RIG-I-like Receptors (RLRs)、DNA sensors 等の自然免疫受容体を介して病原体成分を認識する。これら受容体を介する情報伝達経路の活性化は最終的に I 型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカインの転写を促進する。本研究では、イノシトール脂質脱リン酸化酵素 Myotubularin Related Protein (MTMR) 3 および MTMR4 に着目し、自然免疫受容体を介した自然免疫応答制御における役割を明らかにすることを旨とした。まず、MTMR3 および MTMR4 をそれぞれ欠損するマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞 (以下、MTMR3 KO、MTMR4 KO) を CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立し解析を行った。その結果、TLR4、RLRs、DNA センサーのリガンドに対するサイトカイン発現は、野生型、KO ともに有意な差は認められなかった。そこで、MTMR3、MTMR4 の二重欠損株 (Double KO ; DKO) を樹立し解析を行ったところ、DKO では TLR4 や RLRs に対するサイトカイン産生は正常であったものの、DNA に対するサイトカイン産生が有意に増強していた。また、これらサイトカイン遺伝子発現を制御する転写因子 IRF3 の活性化亢進も認めた。そこで、DNA に対する自然免疫応答において中心的役割を果たすシグナル伝達分子 STING に着目し解析を行った。STING は DNA 刺激に伴い小胞体 (ER) からゴルジ体へと移動し、ゴルジ体において IRF3 のリン酸化酵素 TBK1 をリクルートすることで活性化される細胞内因子である。そこで STING の動態を観察したところ、DKO 細胞では DNA 刺激後の STING のゴルジ体への移動が野生型細胞より早期に誘導されており、この早期の移動がサイトカイン産生の増強の要因の一つであることが示唆された。一方、MTMR3/MTMR4 はホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PtdIns3P) をホスファチジルイノシトール (PtdIns) へ、ホスファチジルイノシトール 3,5 ビスリン酸 (PtdIns3,5P2) をホスファチジルイノシトール 5 リン酸 (PtdIns5P) へと変換することから、これら脂質の細胞内局在を細胞染色により検討したところ、DKO 細胞で PtdIns3P 陽性の細胞質内ドット様構造が認められ、ここに STING と一部のエンドソームマーカーが含まれることを認めた。したがって、MTMR3/MTMR4 の欠損により PtdIns3P 陽性の細胞質内構造体が誘導され、ここに STING がリクルートされることがサイトカイン産生の増強に関与していることが示唆された。

以上のことから、MTMR3/MTMR4 はマクロファージにおいてイノシトール脂質代謝を制御することで DNA に対する自然免疫応答を負に制御する機能を有していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名      DYANINGTYAS DEWI PAMUNGKAS PUTRI

本研究は DNA に対する自然免疫応答制御における脂質脱リン酸化酵素 Myotubularin Related Protein (MTMR) 3 と MTMR4 の役割を明らかにしたものである。ウイルスや細菌に含まれる DNA は異物として宿主自然免疫系により認識され、宿主細胞から産生される炎症性サイトカインや I 型インターフェロンがこれら病原体の排除に働く。これら DNA は自然免疫受容体の一つである cGAS と呼ばれる細胞質内タンパク質で認識される。また、cGAS は DNA 認識後、小胞体に局在する STING の活性化を促し、活性化 STING は小胞体からゴルジ体へと移行することで下流シグナル伝達経路を活性化することが知られているが、STING の移行を制御する分子機構については不明な点が多かった。今回、DYANINGTYAS DEWI PAMUNGKAS PUTRI は、MTMR3 および MTMR4 を欠損するマクロファージ細胞株 RAW264.7 を CRISPR/Cas9 技術を用いて樹立し、MTMR3、MTMR4 の二重欠損細胞では DNA 刺激後のサイトカイン発現が増強していることを見出した。さらに、STING のゴルジ体への移行が二重欠損株では野生型より早期に誘導されることを免疫染色により確認した。興味深いことに、二重欠損株では MTMR3/4 の基質として知られるホスファチジルイノシトール 3 リン酸(PtdIns3P)が細胞質内でドット状に蓄積しており、野生型細胞と比べサイズ、数ともに増えていた。さらに、二重欠損株ではこの構造体に STING が移行することを見出した。これらの結果は、MTMR3/4 欠損により、正常細胞では認められない STING を含む PtdIns3P 陽性の細胞質内構造が誘導されること、これにより STING の過剰な活性化が誘導されることを示唆するものである。これらの結果は、DNA に対する免疫応答を増強する免疫賦活剤の開発に繋がる可能性もあり、基礎、応用の両面から興味深い。また、自己のゲノム DNA が細胞障害やストレス等で細胞質へと漏出すると cGAS を活性化し、これが恒常的なサイトカイン産生を促すことで自己免疫疾患の発症に寄与することが報告されている。よって、DNA に対する応答を負に制御することはこれら疾患の抑制に重要である。これら疾患において MTMR3/4 の活性化異常や PtdIns3P の蓄積が認められる可能性もある。したがって、MTMR3、MTMR4 の免疫応答における制御機構の理解は免疫制御の基礎研究のみならず臨床研究上でも重要な意味を持つと考えられる。

以上のように、本論文は DNA により惹起される自然免疫応答誘導における MTMR3、MTMR4 の役割を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。