

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	佐野 晃之
論文題目	Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent and the characterization of their phosphatase activity. (スレオニン脱リン酸化酵素 Eyes absent による自然免疫反応の調節とその活性の生化学的特徴)		
(論文内容の要旨)			
生体は、その恒常性を維持するため、不要になった細胞を除去する必要がある。その過程で起こる細胞死はプログラムされており、その処理機構も厳密に制御されている。細胞死での染色体 DNA の分解は二段階で進行する。まず死細胞内で Caspase によって活性化される DNA 分解酵素(Caspase activated DNase : CAD)により染色体 DNA はヌクレオソーム単位に断片化される。ついで、アポトーシス細胞が貪食細胞に貪食された後、貪食細胞リソソーム内に局在する DNaseII により DNA はヌクレオチド単位にまで分解される。DNaseII 遺伝子欠損マウスの胚組織にはアポトーシス細胞由来の DNA を未分解のまま蓄積したマクロファージが多数存在し、そのマクロファージでは IFN-β,CXCL10 や TNF-α遺伝子が強く発現している。そこで、cDNA library を用いた発現スクリーニングにより、未分解の DNA に応答する IFN-β,CXCL10 遺伝子を活性化する因子として Eyes absent (EYA)4 を同定した。EYA4 は未分解の DNA だけでなく、RNA ウイルスの感染や、細胞内に流入した DNA や RNA に応答する自然免疫も活性化した。EYA4 はその C 末端にチロシン脱リン酸化酵素活性を有し、転写を促進すると報告されてきたが、自然免疫活性化の際は細胞質に局在し、自然免疫活性化に必要である様々なアダプタータンパクと結合した。また EYA4 は N 末端にはスレオニン脱リン酸化酵素活性を、C 末端領域にはチロシン脱リン酸化酵素活性を有する Two-heads phosphatase であり、そのスレオニン脱リン酸化酵素活性を用いて、自然免疫活性化を助長していることを見出した。 マウスには 4 つの EYA が存在しており(EYA1-4)、その全てが同様の脱リン酸化酵素活性を有し、種々のリン酸化ペプチドに対する基質特異性も Family 間で差は認められない。しかしながら、その比活性は著しく異なっており、チロシン脱リン酸化酵素活性においては、EYA1 及び EYA4 が、スレオニン脱リン酸化酵素活性は EYA3 が EYA family 間で強い酵素活性をもつことが明らかとなった。チロシン脱リン酸化酵素活性の強い EYA1 及び EYA4 でのみ、その遺伝子変異により、耳の形成不全や難聴を伴う branchio-oto-renal (BOR) syndrome を発症することが知られている。EYA のチロシン脱リン酸化酵素活性は、C 末端の Haloacid dehalogenase (HAD)ドメインに局在し、Family 間で			

非常に良く保存されているが、スレオニン脱リン酸化酵素活性に必要な N 末端は Family 間であまり保存されていない。そこで、EYA3 及び EYA4 の各 Exon を欠失させた変異体を作製したところ、スレオニン脱リン酸化酵素活性の強い EYA3 では 3 つの Exon(Exon 6,7,9)が酵素活性に重要な役割を果たしていること、EYA4 ではこれらのうち Exon6 が使われておらず、この使用する Exon の選択により、スレオニン脱リン酸化酵素活性の強弱を調製している可能性を見出した。また EYA3 のスレオニン脱リン酸化酵素活性には Cys-56,Tyr-77,His-79,及び Tyr-90 が必要であり、生物種間を越えて非常に良く保存されているが、これらのアミノ酸のうち Cystein 及び Histidine は EYA family 間で保存されていない。これらの違いは、生体内での異なった機能に寄与しているものと推測される。			
(論文審査の結果の要旨) 死細胞はマクロファージによって貪食、分解されるが、その際、死細胞の DNA が分解されないと自然免疫が活性化される。本研究では、発現クローニング法により、この過程に関与する分子、EYA (Eyes absent)4 を同定した。そして EYA4 を種々のヒト、マウス細胞に導入することにより、この分子はウイルス感染をはじめ、細胞に流入した核酸による IFN(Interferon)-β遺伝子の活性化を増強することが示された。EYA はショウジョウバエでは眼の発生を制御する転写因子として同定されたが、その後この分子の C 末端領域にはチロシン脱リン酸化酵素活性が存在することも報告されている。本論文では、哺乳類細胞を用いて EYA4 の組換え体を作製し、その N-末端領域にスレオニン脱リン酸化酵素活性が存在すること、その酵素活性が、IFN-β遺伝子活性化に必要であることを示した。また、スレオニン脱リン酸化酵素活性は EYA family に属する 4 種類のメンバーで大きく異なること、活性部位を形成する領域がメンバー間で異なることも示された。 以上の研究は、細胞内に蓄積した死細胞の DNA やウイルス由来の核酸によって引き起こされる自然免疫活性化の分子機構の解明に寄与するところが多いと考えられる。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 23 年 12 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			