

学 位 論 文 題 名

ユビキチン化および SUMO-1 化修飾による
転写因子 IRF-1 の機能制御に関する研究

学位論文内容の要旨

ユビキチンは 76 アミノ酸からなる低分子量タンパク質で、酵母からヒトに至るまで全ての真核生物に普遍的に存在する。ユビキチンは、E1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）および E3（ユビキチンリガーゼ）の 3 種類の酵素からなるユビキチン化酵素系の作用により、標的タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合を介して付加され、26S プロテアソームによる分解のシグナルとして機能する。一方、SUMO-1 や NEDD8 などの、ユビキチンと構造的に類似したユビキチン様タンパク質（ubiquitin-like protein、以下 Ubl）も、E1'、E2'および E3'の 3 種類の酵素からなる Ubl 化酵素系の作用により、標的タンパク質に付加され、標的タンパク質の機能変換（細胞内局在性や酵素活性などの変化）を引き起こす。ユビキチン化による分解と Ubl 化による機能変換は、細胞増殖・分化、シグナル伝達、転写調節、ストレス応答などの多様な細胞機能の制御に重要な役割をはたしており、その破綻が癌や神経変性疾患などの疾患の原因となると考えられている。

本研究では、転写因子であり、細胞増殖や細胞死を制御する癌抑制因子でもある IRF-1（interferon regulatory factor-1）に焦点をあて、IRF-1 のユビキチン化修飾と 26S プロテアソームによる分解機構、および、SUMO-1 による IRF-1 の修飾とその機能制御について解析した。

はじめに、26S プロテアソームによる IRF-1 の分解機構について解析した。IRF-1 が半減期 30 分の短寿命タンパク質であることから、ユビキチン-プロテアソームシステムが IRF-1 の分解に関与していると考えた。それを証明するために、IRF-1 の安定性に対するプロテアソーム阻害剤の効果を調べた。HeLa 細胞を MG115 と MG132（プロテアソーム阻害剤）あるいは E64d（カルパイン阻害剤）で処理し、抗 IRF-1 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、IRF-1 のタンパク質量を調べた結果、MG115 と MG132 で処理した場合に、IRF-1 の蓄積が観察された。プロテアソームが IRF-1 分解に関与することをさらに確かめるために、IRF-1 の分解速度に対するプロテアソーム阻害剤の効果を調べた。IRF-1 cDNA 発現ベクターを用いて NIH3T3 細胞へのトランスフェクションを行い、MG132 で 2 時間処理後、シクロヘキシミド（タンパク合成阻害剤）を添加し、時間経過に伴う IRF-1 の変動を解析した結果、MG132 処理による IRF-1 分解速度の遅延が観察された。

IRF-1 がプロテアソームによって分解されることを明らかにできたので、次に、プロテアソームによる分解に先立ち、IRF-1 がユビキチン化修飾を受けるかを解析した。IRF-1 およびユビキチンの発現ベクターを用いて COS7 細胞へのトランスフェクションを行い、免疫沈降後、ウェスタンブロッティングを

行った結果、IRF-1とユビキチンを同時に発現させた場合にのみ、マルチユビキチン化IRF-1が検出された。以上の結果から、IRF-1は、ユビキチン化修飾を受け、26Sプロテアソームにより分解されると結論した。

IRF-1が短寿命タンパク質であるので、その不安定性を規定しているドメインを決定した。IRF-1のC末端側から順次約40アミノ酸を欠失させた3種類の変異体を作成し、それらの安定性を解析した結果、インタクトなIRF-1に比較して、C末端側から39アミノ酸を欠失させたIRF-1 (1-290)の安定化が観察された。そこで、欠失させた領域を、安定なタンパク質であるGFP に融合させて安定性を調べた結果、GFP融合タンパク質が不安定化されることを発見した。以上の結果から、IRF-1の不安定性を規定するドメインがC末端領域に存在すると結論した。

次に、IRF-1のユビキチン化を制御する因子を同定することを目的として、Yeast two-hybrid system による IRF-1 結合タンパク質の探索を行った。IRF-1 (1-190)を LexA DNA 結合ドメインに融合させて bait として用い、マウス胎児線維芽細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、20 個の陽性クローンを得た。得られたクローンの DNA 配列を決定し、SUMO-1 に対する結合酵素(E2)である UBC9 と、転写因子 STAT3 の阻害タンパク質である PIAS3 を同定した。また、PIAS3 が全長の IRF-1 と細胞内でも結合することを明らかにした。

最近、PIAS ファミリータンパク質が SUMO-1 化修飾におけるリガーゼ(E3)として機能することが報告されたので、PIAS3 が IRF-1 の SUMO-1 化修飾を促進する可能性を考えた。それを証明するために、SUMO-1 と PIAS3 を用いて、IRF-1 とともに 293T 細胞へのトランスフェクションを行い、免疫沈降後、ウェスタンブロットティングにより解析した。その結果、PIAS3 依存的に IRF-1 の SUMO-1 化修飾が観察された。すなわち、PIAS3 は SUMO-1 リガーゼであり、IRF-1 の SUMO-1 化修飾を促進すると結論した。

IRF-1 が SUMO-1 化修飾されることを見いだしたので、次に、SUMO-1 化修飾の IRF-1 の転写活性に対する影響を解析した。IRF-1、SUMO-1 および PIAS3 の発現ベクターを用いて、ISRE (interferon-stimulated response element)をルシフェラーゼ遺伝子上流にもつリポータープラスミドとともに、293 細胞へトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイにより IRF-1 の転写活性を調べた。その結果、SUMO-1 と PIAS3 を共発現させた場合に、IRF-1 の転写活性が抑制された。この IRF-1 の転写活性の抑制が SUMO-1 化修飾によるかを解析するために、PIAS3 の SUMO-1 リガーゼ活性の発現に必須な RING finger ドメインの Cys 残基を Ser に置換した C334S 変異体を作成し、IRF-1 に対する SUMO-1 リガーゼ活性と IRF-1 の転写活性に対する影響を調べた。その結果、C334S 変異体では、野生型 PIAS3 と比較して、IRF-1 の SUMO-1 化修飾が減少し、IRF-1 の転写活性に対する抑制効果が失われていた。すなわち、PIAS3 は、IRF-1 の SUMO-1 化修飾を促進することで、IRF-1 の転写活性を負に制御していると結論した。

以上の本研究から、(1) 転写因子 IRF-1 がユビキチン化修飾を受け、26S プロテアソームにより分解されること、(2) PIAS3 および UBC9 の作用により、IRF-1 が SUMO-1 化修飾を受け、転写活性が抑制されることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	横 澤	英 良
副 査	教 授	有 賀	寛 芳
副 査	助教授	澤 田	均
副 査	助教授	平	敬 宏

学 位 論 文 題 名

ユビキチン化および SUMO-1 化修飾による 転写因子 IRF-1 の機能制御に関する研究

ユビキチンは、酵母からヒトに至るまで全ての真核生物に普遍的に存在する低分子量タンパク質である。ユビキチンは、E1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）および E3（ユビキチンリガーゼ）からなるユビキチン化酵素群により、標的タンパク質に共有結合を介して付加され、26S プロテアソームによる分解のシグナルとして機能する。一方、SUMO-1 などの、ユビキチンと構造的に類似したユビキチン様タンパク質（Ubl）も、E1'、E2'および E3'からなる Ubl 化酵素群により、標的タンパク質に共有結合を介して付加され、標的タンパク質の機能変換を引き起こす。ユビキチン化による分解と Ubl 化による機能変換は、細胞増殖、シグナル伝達、転写調節などの多様な細胞機能の制御に重要な役割をはたしており、その破綻が癌や神経変性疾患などの疾患の原因となると考えられている。

本論文提出者は、転写因子であり、細胞増殖や細胞死を制御する癌抑制因子でもある IRF-1 (interferon regulatory factor-1) を取り上げ、IRF-1 のユビキチン化修飾と SUMO-1 化修飾による機能制御に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) IRF-1 タンパク質の代謝回転がプロテアソーム阻害剤によって阻害されることを見いだし、IRF-1 の分解にプロテアソームが関与することを明らかにした。さらに、IRF-1 とユビキチンの発現系を用いて、IRF-1 がマルチユビキチン化されることを見いだし、IRF-1 が、ユビキチン化修飾を受け、26S プロテアソームにより分解されることを明らかにした。

(2) IRF-1 の C 末端側から順次約 40 アミノ酸を欠失させた変異体の安定性を解析し、

不安定なインタクトIRF-1と比較して、C末端側から39アミノ酸を欠失させたIRF-1 (1-290)が安定化されることを見いだした。さらに、欠失させた領域を融合させたGFP融合タンパク質が不安定化されることを見いだし、IRF-1の不安定性を規定するドメインがC末端領域に存在することを明らかにした。

(3) Yeast two-hybrid system を用いて IRF-1 結合タンパク質を探索し、SUMO-1 に対する結合酵素(E2)である UBC9 と、転写因子 STAT3 の阻害タンパク質である PIAS3 を、IRF-1 結合タンパク質として同定した。さらに、PIAS3 が SUMO-1 化修飾におけるリガーゼ(E3')として機能する可能性を証明するために、SUMO-1 と PIAS3 を用いて、IRF-1 とともに 293T 細胞へのトランスフェクションを行い、PIAS3 依存的に IRF-1 が SUMO-1 化されることを見いだした。すなわち、PIAS3 は SUMO-1 リガーゼであり、IRF-1 の SUMO-1 化修飾を促進することを明らかにした。

(4) SUMO-1 化修飾が IRF-1 の転写活性に対する影響を調べるために、IRF-1、SUMO-1 および PIAS3 の発現ベクターを用いたりポーターアッセイを行い、SUMO-1 と PIAS3 を共発現させた場合に、IRF-1 の転写活性が抑制されることを見いだした。IRF-1 の転写活性の抑制が SUMO-1 化修飾によるかを解析するために、PIAS3 の SUMO-1 リガーゼ活性の発現に必須な RING finger ドメインの Cys 残基を Ser に置換した C334S 変異体を作成し、IRF-1 に対する SUMO-1 リガーゼ活性と IRF-1 の転写活性に対する影響を調べた。そして、C334S 変異体では、野生型 PIAS3 と比較して、IRF-1 の SUMO-1 化修飾が減少し、IRF-1 の転写活性に対する抑制効果が失われることを見いだした。以上の結果から、PIAS3 は、IRF-1 の SUMO-1 化修飾を促進することで、IRF-1 の転写活性を負に制御していることを明らかにした。

以上の新発見およびそれらを得るために用いた新研究方法は、転写因子 IRF-1 におけるユビキチン化修飾および SUMO-1 化修飾の生理的意義の理解にとどまらず、ユビキチン化と Ubl 化という翻訳後修飾による細胞機能の制御機構を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査委員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。