

インターフェロン誘導性ユビキチン様タンパク質 ISG15 の機能解析

学位論文内容の要旨

インターフェロンはウイルス感染に対する自然免疫機構において重要な役割を果たしている。即ち、インターフェロンは下流の情報伝達系を活性化して抗ウイルス性遺伝子群 ISGs (interferon-stimulated genes) を誘導する。インターフェロン誘導性タンパク質の 1 つである ISG15 は、ユビキチン様ドメインがタンデムに 2 つ連結した構造を有するユビキチン様タンパク質である。また、ISG15 は、ユビキチンの場合と同様に、E1/E2/E3 からなる複合酵素系の触媒作用により標的タンパク質に共有結合する (ISG 化)。最近、シンドビスウイルスの複製が ISG15 の過剰発現により抑制されることが報告され、ISG15 が抗ウイルス作用を有することが示されたことから、ISG 化が免疫応答において重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、ISG 化される標的タンパク質の種類や ISG 化の意義について未解明な点が多く残されている。

本研究では、翻訳後修飾分子としての ISG15 に焦点をあて、ISG 化システムの機構及び ISG 化の意義について解析を行い、以下の新知見を得た。

(1) ISG15、ISG 化の E1 酵素 UBE1L 及び脱 ISG 化酵素 UBP43 がインターフェロンにより誘導されることから、ISG 化システムの E2 酵素はインターフェロン誘導性のユビキチン E2 酵素ではないかと考えられる。そこで、インターフェロン誘導性の UbcH5c, UbcH6 及び UbcH8 を含む 6 種のユビキチン E2 酵素のクローニングを行い、ISG15 及び UBE1L と共発現させたところ、UbcH6、UbcH8 及び Ubc13 の場合、ISG 化された E2 酵素に由来する高分子量のバンドが検出され、免疫沈降実験の結果から、これら 3 種の E2 酵素が ISG 化されることが明らかになった。UbcH6 及び UbcH8 の場合、還元条件下では遊離の ISG15 に由来するバンドが検出され、非還元条件下では検出されないことから、UbcH6 及び UbcH8 が ISG15 とチオエステル結合することが明らかになった。さらに、UbcH6 は Cys131 残基を介して ISG15 とチオエステル結合することが明らかになった。以上の結果から、UbcH6 は、ISG 化の標的であるばかりでなく、ISG 化の E2 酵素として機能すると結論される。

(2) UbcH6 の ISG 化の意義を明らかにするために、ISG 化サイトの同定を行った。UbcH6 の Lys 残基を Arg に置換した各種変異体を作製して ISG 化の有無を解析し、Lys136 残基が ISG 化サイトであることが明らかになった。ユビキチンとチオエステル結合する Cys131 残基の近傍の Lys136 残基が ISG 化されることから、UbcH6 の ISG 化が UbcH6-ユビキチ

ン・チオエステル中間体の形成を阻害する可能性が考えられる。そこで、ISG 化された UbcH6 と非修飾 UbcH6 を培養細胞から単離し、両者のユビキチン E2 酵素活性を比較した。その結果、UbcH6・ユビキチン・チオエステル中間体に由来するバンドが、非修飾 UbcH6 の場合では検出されたが、ISG 化された UbcH6 の場合では検出されなかった。以上の結果から、UbcH6 のユビキチン E2 酵素活性が ISG 化により抑制されると結論される。

(3) UbcH6 の場合と同様に ISG 化される Ubc13 において、UbcH6 の場合と同様に、触媒残基の Cys87 残基の近傍に Lys92 残基と Lys94 残基が存在している。そこで、2 つの Lys 残基をそれぞれ Arg に置換した変異体を作製して ISG 化の有無を解析し、Lys92 残基が ISG 化サイトであることが明らかになった。さらに、UbcH6 の場合と同様の解析を行い、Ubc13 のユビキチン E2 酵素活性が ISG 化により抑制されることが明らかになった。以上の結果から、ISG15 がユビキチン E2 酵素の抑制を介して細胞内で機能していると考えられる。今後、ユビキチン E2 酵素との関連で、細胞内における ISG 化の意義を解明することが必要である。

(4) ISG 化の意義を明らかにするために ISG 化される標的タンパク質の同定が重要であると考え、新規標的タンパク質の同定を行った。HeLa 細胞に Flag-ISG15, UBE1L 及び UbcH8 を共発現させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、ISG 化された標的タンパク質群を単離した。そして、ペプチドマスフィンガープリント法により、得られた標的タンパク質の同定を行った。

(5) ISG15 が主に免疫応答において働くと考えられることから、同定された複数の新規標的蛋白質の中で、PP2C β に着目して以下の解析を行った。なお、PP2C β は、リン酸化され活性化した TAK1 を脱リン酸化することにより、その下流のシグナル伝達系の活性化を抑制する。はじめに、PP2C β が UBE1L 及び UbcH8 依存的に ISG 化されることを確認し、次に、リン酸化 TAK1 に対する PP2C β 活性が ISG 化によって影響を受けるか否かを、NF- κ B ルシフェラーゼ・レポーターアッセイにより解析した。その結果、PP2C β による NF- κ B 活性化の抑制作用が、ISG15, UBE1L 及び UbcH8 から成る ISG 化システムの共発現により消失することが明らかになった。次に、PP2C β に対する ISG 化システムの共発現による抑制効果が、PP2C β 自身の ISG 化によるか否かを解析するために、PP2C β の ISG 化サイトの同定を行った。PP2C β の各種欠失変異体を作製して ISG 化される領域を推定し、次に、その領域の Lys 残基を Arg に置換した各種変異体を作製して ISG 化の有無を解析し、Lys12 残基と Lys142 残基が ISG サイトであることが明らかになった。そして、作製した PP2C β 非 ISG 化変異体を用いて NF- κ B ルシフェラーゼ・レポーターアッセイにより解析し、ISG 化システムの共発現による PP2C β 活性の抑制効果が非 ISG 化変異体では検出されないことが明らかになった。さらに、野生型に比較して、非 ISG 化変異体では、ISG 化システムの共発現下においても、I κ B α のリン酸化が抑制され、TAK1 との結合レベルが高いことが明らかになった。以上の結果から、PP2C β 活性が ISG 化により抑制されると結論される。今後、他の標的タンパク質の ISG 化の意義を解明することが必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 教 授 南 雅 文

副 査 助 教 授 上 原 孝

副 査 助 教 授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

インターフェロン誘導性ユビキチン様タンパク質 ISG15 の機能解析

インターフェロンは、下流の情報伝達系を活性化して抗ウイルス性遺伝子群 ISGs (interferon-stimulated genes) の発現を誘導することにより、抗ウイルス作用を発揮する。インターフェロン誘導性タンパク質の 1 つである ISG15 は、ユビキチン様ドメインがタンデムに 2 つ連結した構造を有するユビキチン様タンパク質であり、ユビキチンの場合と同様に、E1/E2/E3 からなる複合酵素系の触媒作用により標的タンパク質に共有結合する。最近、ISG15 が抗ウイルス作用を有することが明らかにされ、また、ISG15 による翻訳後修飾が免疫応答において重要な役割を果たしているとは提案されている。

本論文提出者は、翻訳後修飾分子としての ISG15 に焦点をあて、ISG15 による翻訳後修飾システムの機構および ISG15 による翻訳後修飾の意義に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) インターフェロン誘導性の UbcH5c、UbcH6 および UbcH8 を含む 6 種のユビキチン E2 酵素のクローニングを行い、次に、ISG15 および UBE1L との共発現と免疫沈降実験を行い、UbcH6、UbcH8 および Ubc13 が ISG15 により修飾されることを明らかにした。また、UbcH6 および UbcH8 の場合、還元条件下では遊離の ISG15 に由来するバンドが検出され、非還元条件下では検出されないことを見出し、UbcH6 および UbcH8 が ISG15 とチオエステル結合すると結論した。さらに、UbcH6 は Cys131 残基を介して ISG15 とチオエステル結合することを明らかにした。以上の結果から、UbcH6 は、ISG15 による修飾の標的であるばかりでなく、ISG15 による修飾システムの E2 酵素として機能すると結論した。

(2) UbcH6 および Ubc13 において ISG15 により修飾されるアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基が UbcH6 および Ubc13 の活性部位に存在する Cys 残基の近傍であることから、ISG15 による修飾が UbcH6 あるいは Ubc13 のユビキチン・チオエステル中間体の形成を阻害すると推論した。そして、その仮説を証明するために、修飾型と非修飾型の UbcH6 および Ubc13 を培養細胞から単離して、両者のユビキチン E2 酵素活性を比較し、UbcH6 および Ubc13 のユビキチン E2 酵素活性が ISG15 修飾により抑制されると結論した。

(3) ISG15 による修飾の意義を明らかにするために、ISG 化される標的タンパク質の同定が重要であると考え、ISG 化されたタンパク質群を単離し、次に、ペプチドマスフィンガープリント法による同定を行い、ISG15 により修飾される、複数の新規標的タンパク質を発見した。

(4) 上記 (3) で同定された新規標的タンパク質の中で、リン酸化 TAK1 に対する脱リン酸化活性を有する PP2C β に着目して、NF- κ B ルシフェラーゼ・レポーターアッセイにより解析し、PP2C β による NF- κ B 活性化の抑制作用が、ISG15、UBE1L および UbcH8 から成る ISG15 修飾システムの共発現により消失することを見出した。そこで、この抑制効果が、PP2C β 自身の ISG15 修飾によるか否かを解析するために、PP2C β において ISG15 により修飾されるアミノ酸残基を同定し、次に、そのアミノ酸残基を置換した非修飾型の変異体を用いて NF- κ B ルシフェラーゼ・レポーターアッセイにより解析し、ISG15 修飾システムの共発現による PP2C β 活性の抑制効果が非修飾型の変異体を用いると検出されないことを見出した。さらに、この非修飾型の変異体では、IkB α のリン酸化が抑制され、TAK1 との結合レベルが高いことを明らかにした。以上の結果から、PP2C β 活性が ISG15 修飾により抑制されると結論した。

以上の新知見およびそれらを得るために用いた新研究方法は、ユビキチン様タンパク質 ISG15 による翻訳後修飾システムの理解にとどまらず、広く他のユビキチン様タンパク質による翻訳後修飾システムの機構および役割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。