

学位論文題名

Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system.

(Ro52は IgG1と機能的に結合し ERAD システムを介して
その品質管理を行う)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

多くのタンパクの分解に関わるユビキチン・プロテアソーム系において、標的タンパクはユビキチン化され、プロテアソームによりユビキチン鎖が認識されることによりタンパク分解を受ける。ユビキチン化酵素の中でユビキチンリガーゼ (E3) は標的タンパクの最終的なユビキチン付加に関わる重要な因子であり、E3 活性に強く関わる RING ドメインを有する TRIM ファミリータンパクはユビキチン-プロテアソーム経路に関与し、細胞周期、分化、DNA 修復、細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たすことが報告されている。我々は分子構造的に RING フィンガードメインを有し、E3 として作用する可能性が高いと考えられる Ro52 について *in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて E3 活性の検討、基質タンパクの検索から Ro52 の細胞内機能解析を試みた。

【材料と方法】

ヒト B 細胞 cDNA ライブラリーから PCR 法を用いて Ro52 を増幅させ、細胞内発現ベクター p3×FLAG、バキュロウイルスベクター pFASTBACHTa、酵母ツーハイブリッドベクター pBTM116、レトロウイルスベクター pMX-puro にサブクローニングした。同様にして RING ドメイン欠失 Ro52(Ro52 ΔRING)を各ベクターにサブクローニングした。

バキュロウイルス系を用いて Ro52 リコンビナントタンパクを作製したのち *in vitro* ubiquitination assay を行い(結果 1)、基質タンパクの検索としては酵母株 L40 を用いて酵母ツーハイブリッド法を行った。pBTM116-Ro52 を bait としてヒト B 細胞 cDNA ライブラリー(pACT2)を L40 に形質転換し、検出されたコロニーから DNA シークエンスを行った(結果 2)。次に、β-ガラクトシダーゼアッセイにより Ro52 と基質タンパクとの酵母内での結合を確認したのち、HEK293T 細胞を用いて免疫沈降法により Ro52 と基質タンパクとの結合、ユビキチン化の有無を検討した(結果 3)。Ro52 の細胞内局在を検討する目的で HeLa 細胞を用いて免疫染色を行った(結果 4)。

さらに Ro52 の細胞内機能を検討するためレトロウイルスベクター pMX-puro を用いて Ro52 安定発現 IgG1 ハイブリドーマ(CLN H11.4)を作製した。同細胞株に tunicamycin 3μg/ml 付加により基質タンパクである IgG1 の糖鎖修飾を抑制し、Ro52 発現株における IgG1 発現量の変化を検討した(結果 5)。また、IgM 産生細胞である Namalwa 細胞にレトロウイルスを用いて分泌型 IgG1 を安定発現させ、内在性 Ro52 発現の変化を検討した(結果 6)。小胞体ストレス関連タンパクである XBP-1 の Ro52 への影響を検討するため HEK293T 細胞に XBP-1 を発現させ、内在性 Ro52 発現を比較した(結果 7)。

【結果】

結果 1. *In vitro* ubiquitination assay の結果、Ro52 は Ubc4、UbcH5A、UbcH5B、UbcH5C をユビキチン結合酵素(E2)とするユビキチンリガーゼであることが証明された。

結果 2. 酵母ツーハイブリッド法により 220 のコロニーが検出され、シークエンスを行ったすべてのフラグメントはヒト IgG1 heavy chain constant region(IgG1hc)由来のものであった。

結果 3. HEK293T 細胞において Ro52 と IgG1hc の結合が確認された。また Ro52 Δ RING でも IgG1hc と結合しており、結合部位は RING ドメインを含まないことが確認された。また IgG1hc は Ro52 によってポリユビキチン化され、プロテアソームにより分解されることが証明された。

結果 4. 免疫染色により Ro52 は細胞質発現パターンをとり、特に小胞体周囲に強く発現することが示された。また、小胞体シャペロン p97/VCP と Ro52、IgG1hc が結合することから三者は小胞体近傍において複合体を形成していると考えられた。

結果 5. Ro52 安定発現 CLN H11.4 では mock と比して IgG1 発現量の低下を認めた。さらに tunicamycin を用いて IgG1hc の糖鎖修飾を抑制し、高次構造を取れない IgG1hc(unfolded IgG1hc)を誘導すると Ro52 安定発現株では mock に比して IgG1hc が減少していることが確認された。

結果 6. IgG1 産生細胞では IgM 産生細胞に比して内在性 Ro52 が高発現していること、Namalwa 細胞に IgG1 を安定発現させると内在性 Ro52 の発現が高くなることが証明された。

結果 7. HEK293T 細胞に成熟型 XBP-1(XBP-1(S))を発現させると mock や前駆体型 XBP-1(XBP-1(U))に比して内在性 Ro52 がより誘導された。

【考察】

これまで TRIM ファミリータンパクである Ro52 がユビキチンリガーゼ E3 であること、IgG1hc と結合することはすでに報告されているが、本研究は Ro52 が IgG1hc をポリユビキチン化しプロテアソーム依存性に分解すること、Ro52 が小胞体膜近傍において分子シャペロン p97/VCP と結合し unfolded IgG1 を選択的に分解誘導すること、さらには Ro52 が小胞体ストレス応答に関与する可能性があることを示した最初の報告である。

RING 型ユビキチンリガーゼは SCF のように細胞周期に関わるものや IAP のようにアポトーシスに関わるものなどを含み多彩な細胞内機能を有しているが、Hrd 1 のように小胞体膜に存在し小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation: ERAD)に関わるものもある。今回我々が解析を行った Ro52 は分泌型 IgG1hc を基質タンパクとしてプロテアソーム依存性に分解していたことから、Ro52 が ERAD に関与している可能性を考えた。上記結果により Ro52 が ERAD を介して IgG1 の品質管理を行い、細胞の小胞体ストレス回避に関わっていることが示された。

さらに多発性骨髄腫のように分泌型 IgG1 を恒常的に大量産生される細胞内環境においては小胞体ストレス応答、細胞生存に Ro52 が重要な役割を果たしている可能性があり今後臨床的検討が必要と考えられる。

【結論】

本研究を通してユビキチンリガーゼである Ro52 が ERAD システムを介して IgG1 の品質管理に重要な役割を果たしていることが示された。また、Ro52 が小胞体ストレス応答シグナルの一構成因子である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 武 藏 学
副 査 教 授 浅 香 正 博

学位論文題名

Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system.

(Ro52は IgG1と機能的に結合し ERAD システムを介して
その品質管理を行う)

多くのタンパク質の分解に関わるユビキチン・プロテアソーム系において、標的タンパク質はユビキチン化され、プロテアソームによりユビキチン鎖が認識されることによりタンパク質分解を受ける。ユビキチン化酵素の中でユビキチンリガーゼ (E3) は標的タンパク質の最終的なユビキチン付加に関わる重要な因子であり、E3 活性に関与する RING ドメインを有する TRIM ファミリータンパク質はユビキチン-プロテアソーム経路に関与し、細胞周期、細胞分化、DNA 修復、細胞内シグナル伝達等に重要な役割を果たすことが報告されている。申請者は、分子構造的に RING-フィンガードメインを有し、E3 として作用する可能性が高いと考えられる Ro52 について *in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて E3 活性を検討し、基質タンパク質の検索から Ro52 の細胞内機能解析を試みた。

In vitro ubiquitination assay の結果、Ro52 は Ubc4、UbcH5A、UbcH5B、UbcH5C をユビキチン結合酵素(E2)とするユビキチンリガーゼであることが証明され、酵母ツーハイブリッド法により検出されたコロニーはすべてヒト IgG1 heavy chain constant region(IgG1hc)由来のものであった。さらに Ro52 は IgG1hc と結合し、IgG1hc をポリユビキチン化して、プロテアソームにより分解することが証明された。また、Ro52 は小胞体シャペロンと共存しており、アンフォールド IgG1 の分解に関わっていることが Ro52 安定発現細胞株の解析から示された。小胞体ストレス応答に重要な転写因子である XBP-1 が Ro52 の転写を誘導している可能性が示され、Ro52 が小胞体関連分解(ERAD)に重要な役割を果たしていることが分かった。

口頭発表において、副査武蔵学教授より、プロテアソーム阻害薬 MG132 の特異性、IgG1

産生細胞における IgG1 ユビキチン化の検出の有無についての質問があった。これらの質問に対し、プロテアソーム阻害薬に関する実験学的解説、Ro52 による細胞内分解についての分子論的解説を行った。ついで、副査浅香正博教授より、Ro52 の自己免疫疾患などにおける臨床的意義、ノックアウトマウス・トランスジェニックマウスについての質問があった。これらの質問に対し、これまでに報告されている文献的考察、遺伝子改変マウスにおいて想定される異常について述べた。さらに、副査畠山鎮次教授より、B 細胞における Ro52 の存在意義、推測される細胞外機能に関する質問があった。これらの質問に対し、抗体産生細胞における小胞体ストレス回避の必要性、抗原として作用する可能性を述べた。最後に、主査今村雅寛教授より、Ro52 の IgG1 分解の特異性、XBP-1 の免疫グロブリン産生に対する特異性、今後の臨床応用の展望に関する質問があった。これらに対し、文献的考察から Ro52 の IgG1 に対する特異性、XBP-1 の転写産物の多様性、多発性骨髄腫などの血液疾患への応用の可能性を述べた。

本研究者は Ro52 が IgG1 と機能的に結合し ERAD に重要な役割を果たしていることを明らかにしたことにより、今後自己免疫疾患のほかにも多発性骨髄腫などの血液疾患の病態解明および治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。