

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月25日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590424

研究課題名（和文） ウイルス感染応答の新規制御メカニズム：SUMO 修飾を介した情報伝達経路の活性化

研究課題名（英文） Novel regulatory mechanisms against virus infection: activation of signal transduction through protein SUMO modification

研究代表者

久保田 耐 (KUBOTA TORU)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：10274929

研究成果の概要（和文）：

SUMO 修飾（SUMO 化）は、タンパク質翻訳後修飾の一つであり、SUMO 化により様々な細胞内情報伝達経路が制御されていることが知られている。ウイルス感染に応答して誘導される、宿主自然免疫系に関わる情報伝達経路においても SUMO 化による制御が知られていた。本研究ではウイルス感染に応答した I 型 IFN 産生経路に焦点を絞り、経路の制御に対する SUMO 化の影響とその作用メカニズムについて検討を行った。その結果、PIASy は I 型 IFN 応答経路だけではなく、I 型 IFN 産生経路の制御にも関わっており、両経路の不活性化を導く、負の制御因子であること、また PIASy は I 型 IFN 応答経路と I 型 IFN 産生経路をそれぞれ異なった作用メカニズムで調節していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

SUMO modification is one of the post-translational modification systems for regulating various cellular signal transductions. SUMO modification dependent molecular switch has been reported upon exhibiting innate immune response against virus infection. In this study, we focused on the contribution of SUMOylation upon virus infection induced type I IFN production pathway and found that PIASy negatively regulates both IFN transcription and IFN-stimulated gene expression through multiple mechanisms utilizing the function of different domains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	0	1,100,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
2012 年度	1,300,000	0	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス感染応答、インターフェロン、SUMO 化、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

宿主細胞はウイルス感染に反応し、その増殖と拡散を抑制するために、自然免疫系を発動する。自然免疫の発動には、他の多くの環境応答と同様に、情報伝達因子の質的、量的変動による、細胞内の様々な情報伝達経路のモード変化が伴う。SUMO 修飾 (SUMO 化) は、このようなタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、多数の情報伝達因子が SUMO 修飾により活性調節の制御を受けることが知られている。SUMO 修飾により、被修飾タンパク質の全体構造の変化や、新規分子表面の生成が引き起こされ、これらの作用により情報伝達因子の活性変化が誘発されると考えられている。SUMO 修飾の自然免疫制御への関与としては、ウイルス感染防御における主要なサイトカインの一つである I 型インターフェロン (IFN) に対する、細胞の応答経路が知られており、SUMO 化経路において SUMO E3 (SUMO リガーゼ) として関与する PIAS ファミリータンパク質が、負に作用することが知られている。ウイルス感染は Toll 様受容体や RIG-I 様受容体などの自然免疫応答受容体群により細胞に認識される。これら受容体下流の情報伝達経路が活性化されることにより、I 型 IFN を始めとするサイトカインの産生が誘導される。我々は SUMO 化経路における SUMO E2 (SUMO 結合酵素) の機能を持つタンパク質 UBC9 のノックダウン細胞を作成し、この細胞ではウイルス感染に反応した I 型 IFN の産生誘導が著しく低下していることを見出していた。このことは I 型 IFN 産生経路の活性化には、いずれかの情報伝達因子の SUMO 修飾が必須であり、SUMO 修飾を介して「正に制御」される未知の情報伝達ステップが存在することを示唆している。

2. 研究の目的

本研究ではウイルスの感染によって誘導される宿主自然免疫に関わる情報伝達系、特に I 型 IFN 産生経路における、新規情報伝達メカニズムとしてのタンパク質 SUMO 化の役割を明らかにすることを目的とした。具体的な研究項目は、次の通りに設定した。

- (1) タンパク質 SUMO 化に関わる E2 酵素 UBC9 及び E3 酵素 PIAS タンパク質群の、ノックダウン(KD) 細胞におけるウイルス感染応答の解析
- (2) I 型 IFN 産生経路における SUMO 化標的因子のスクリーニング

- (3) SUMO 修飾により活性化される情報伝達メカニズムの解析

3. 研究の方法

細胞内のタンパク質 SUMO 化に関わる E2 酵素 UBC9 及び E3 酵素 PIAS1、PIAS3、PIASx、PIASxb、PIASy の 5 種類を、それぞれ対応する shRNA コンストラクトを用いてノックダウンし、ウイルス感染による I 型 IFN の産生に対する影響を検討した。

4. 研究成果

SUMO E3 の一つである PIASy をノックダウンしたところ、ウイルス感染に反応した I 型 IFN の転写誘導が著しく増加した。PIASy 以外の PIAS ファミリータンパク質のノックダウン細胞ではこのような I 型 IFN 産生の増加は見られなかった。PIASy のノックアウトマウス由来の胎児胚細胞 (KO-MEF) でも同様に、ウイルス感染による I 型 IFN 産生誘導能が増加していた。また I 型 IFN 産生経路の情報伝達因子のうち、過剰発現により経路の活性化をもたらす VISA、TRIF、TBK1、IKKi などによる I 型 IFN 遺伝子のプロモータ活性化は PIASy を発現させることにより低下した。さらに PIASy 発現細胞でも I 型 IFN 遺伝子のプロモータ活性化に必須の転写因子である IRF3 の活性化が見られ、また IRF3 の活性化型ミミックである IRF3/5D を PIASy と発現した場合も、I 型 IFN 遺伝子のプロモータの活性化は抑制された。これらの結果から、PIASy は I 型 IFN 産生誘導を抑制しており、I 型 IFN 産生経路の IRF3 活性化後に作用する因子であると考えられた。PIASy は STAT1 の SUMO 化を誘導する E3 であり、STAT1 依存的な転写を抑制すること、また PIASy の変異解析から PIASy の N 末端 SAP 領域に STAT1 依存的な転写の抑制に必須アミノ酸が存在し、この領域が PIASy の SUMO E3 活性に必須であることが知られていた。そこで PIASy の点変異体を作成し、I 型 IFN 産生を阻害するために必要な領域を検討したところ、N 末端領域の SAP ドメインの変異体も野生型同様に I 型 IFN 産生を阻害したことから、PIASy は STAT1 とは別のメカニズムで IRF3 依存的な転写を抑制していること、また PIASy の SUMO E3 活性は、PIASy による I 型 IFN 産生経路の抑制に必要ないことが明らかになった。一方 PIASy の C 末端の変異体解析 AD (acidic domain、酸性領域) が、IRF3 依存的な転写の抑制に必要であることがわかった。アミノ酸配列の解析から、PIASy の AD には疎

水性アミノ酸を中核とする SUMO 結合モチーフ (SUMO interacting motif, SIM) が認められた。そこでこの SIM 様モチーフを置換した点変異体を作成し、SUMO 分子との結合能および I 型 IFN 産生阻害への影響を調べた。その結果、PIASy の AD が SUMO 結合領域として機能すること、また SUMO 結合能を失った PIASy は I 型 IFN 産生抑制能を喪失していることが明らかとなった。SUMO 化 E2 酵素である UBC9 のノックダウン細胞に活性化型 IRF3 を発現させると、コントロール細胞に比べて I 型 IFN の転写は増加し、また UBC9 ノックダウン細胞では PIASy による活性化型 IRF3 依存的な I 型 IFN 産生抑制効果が低下していた。このことは、PIASy による I 型 IFN 産生抑制には PIASy 自身の SUMO E3 活性は必要ないが、何らかの SUMO 修飾反応が関わっており、SUMO 化された標的タンパク質と PIASy の SUMO 分子を介した結合が I 型 IFN 産生抑制効果に必要であることを示唆している。これまでの研究から IRF3 自身も SUMO 修飾を受けること、SUMO 化により IRF3 依存的な転写活性は低下することが明らかになっている。そこで PIASy による I 型 IFN 産生抑制に関わる SUMO 修飾標的因子が IRF3 であること可能性をについて、SUMO 修飾を受けない活性化型 IRF3 の変異体を用いて検討したが、PIASy による I 型 IFN 産生抑制とは無関係であった。PIASy の I 型 IFN 産生抑制に係る SUMO 化タンパク質が何であるのか、その標的タンパク質の SUMO 修飾に必要な SUMO E3 は何か、PIASy は SUMO 化された標的にどのように作用して I 型 IFN 産生の抑制が引き起こされるのか、などについては明らかにすべき疑問として残された。UBC9 のノックダウン細胞では活性化型 IRF3 変異体の発現による I 型 IFN 産生誘導は増強されるが、I 型 IFN 産生経路のより上流に位置する VISA、TRIF、TBK1 および IKK α などの発現により誘導される I 型 IFN 産生は著しく低下する。また UBC9 のノックダウン細胞ではウイルス感染による I 型 IFN 産生誘導も同様に低下する。このことは、SUMO 化経路が IRF3 活性化より上流では正に作用し、一方 IRF3 活性化より下流では負に作用することを示唆している。これらの SUMO 化反応が、共通のタンパク質因子を標的としているのか否かに関しては明らかに出来なかった。この経路の既知の因子が SUMO 化される可能性について検討したところ、TBK1 及び IKK α が SUMO 化されることが明らかになったが、いずれも恒常的に SUMO 化されており、経路の活性化とは無関係であったことから、I 型 IFN 産生の制御とは無関係であると思われる。従って、UBC9 ノックダウンの表現型を実現するためには、

I 型 IFN 産生経路に未知の情報伝達因子あるいは制御因子の存在を想定する必要がある。これらのタンパク質因子が何であるのかについては今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kubota T, Matsuoka M, Xu S, Otsuki N, Takeda M, Kato A, Ozato K. PIASy inhibits virus-induced and interferon-stimulated transcription through distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 査読あり 2011 Mar 11;286(10):8165-75.

[学会発表] (計 1 件)

Kubota T, Matsuoka M, Xu S, Takeda M, Shuai K, Kato A, Ozato K. Piasy inhibits virus induced type I Interferon production. 8th Joint Annual Meeting of the ISC/ISICR, October 3rd-7th, 2010, Chicago, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 耐 (KUBOTA TORU)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任
研究官
研究者番号：10274929

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：
()