

機関番号：32503
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790477
 研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼによる I 型インターフェロン誘導制御の分子機構解析
 研究課題名(英文) Functional analysis of molecular mechanism of type I interferon production regulated by ubiquitin ligases
 研究代表者
 舟見 健児 (FUNAMI KENJI)
 千葉工業大学・附属総合研究所・研究員
 研究者番号：00421983

研究成果の概要(和文)：本研究において掲げた目標の中で、TRIM25 の機能解析に関しては残念ながら特筆すべき成果が得られなかった。そこで、TRIM25 以外のユビキチンリガーゼについての機能解析をあわせて行った。この結果、RIG-I をユビキチン化することで一型インターフェロン産生を負に制御する RNF125 の C 末端領域に新たな機能が存在することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：In my project, I have no progression in the field of TRIM25 function. So I performed the functional analyses of ubiquitin ligases other than TRIM25. From these analyses, I identified the new function of C-terminal region of RNF125, which is ubiquitin ligase regulating type-I interferon production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫・ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

I 型インターフェロン(interferon, IFN)は、HCV 等のウイルス感染に対する抗ウイルス作用を担うサイトカインである。ウイルスやその他の微生物に特異的に存在する核酸の分子構造は、Toll-like receptor (TLR)や RIG-I-like RNA helicases (RLR)といった受

容体によって認識される。TLR に対しては MyD88 や TRIF, RLR に対しては IPS-1 といったアダプター分子が細胞内にシグナルを伝え、TBK1 や IKK α といったキナーゼが IRF3 が活性化する結果、I 型 IFN の転写が誘導される。I 型 IFN は強い生理活性を有するため、

過剰に発現すると自己免疫反応や炎症反応といった生体にとって有害な応答を示す。そのため、シグナル伝達経路のさまざまな分子を標的とした内在性の制御機構が存在する。また、I 型 IFN のシグナルを制御するウイルス由来因子が数多く知られている。

細胞質でウイルス由来の核酸を認識するレセプターである RIG-I は、多くの RNA ウイルスの感染に伴う I 型 IFN 誘導に重要な役割を果たしている。RIG-I による I 型 IFN 誘導シグナルは様々な分子修飾によって制御を受けているが、ユビキチン化による制御はとりわけ重要な役割を果たしている。RIG-I を直接ユビキチン化する分子としては、RNF125 と TRIM25 が知られている。RNF125 はユビキチンのアミノ酸配列中で 48 番目のリジン残基を介したユビキチン化によってプロテアソーム依存性に RIG-I を分解することでシグナルを負に制御している。TRIM25 は 63 番目のリジン残基を介したユビキチン化によってシグナルを正に制御している。

他にも、CYLD, DUBA, Pin1 等の分子が、RIG-I シグナルの様々な経路を標的として、ユビキチン化を介した制御を行っていることが知られている

一方、TBK1 や IKK α のキナーゼ活性を制御するようなユビキチンリガーゼはこれまで知られていなかった。

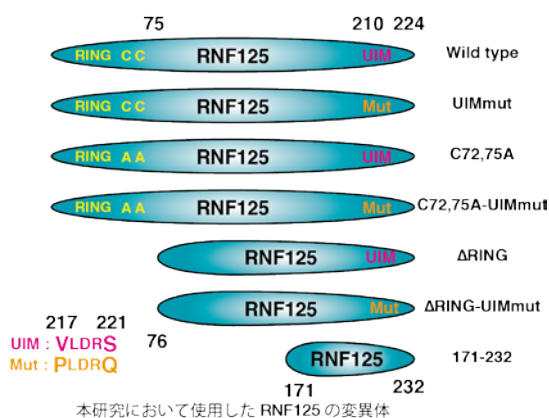
2. 研究の目的

TRIM25 を始めとするユビキチンリガーゼによる TBK1/IKK α のキナーゼ活性の制御機構を解析する。具体的には、1) TRIM25 によってユビキチン化される分子の同定 (ユビキチン化される分子は TBK1/IKK α なのか、もしくは他の制御因子なのか)、2) TRIM25 によってユビキチンのどのリジン残基がユビキチン化を受けるか (48 番目か 63 番目か、も

しくはその他のリジン残基か)、3) ユビキチン化による TBK1/IKK α のキナーゼ活性の制御機構、そして 4) TRIM25 による TBK1/IKK α の制御の生理的意義などに焦点を当てて解析を進める。

3. 研究の方法

研究代表者の所属研究室においてクローニングされた RNF125 遺伝子を用いて下図に示した変異体を作成した。ヒト胎児腎臓由来細胞株である HEK293 細胞に各変異体を導入し、機能解析を行った。

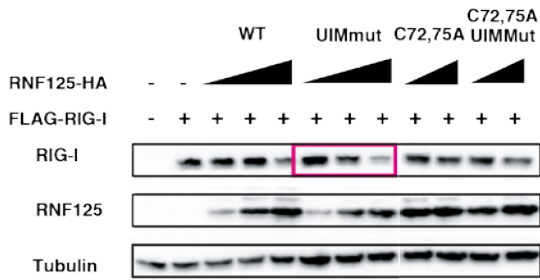


4. 研究成果

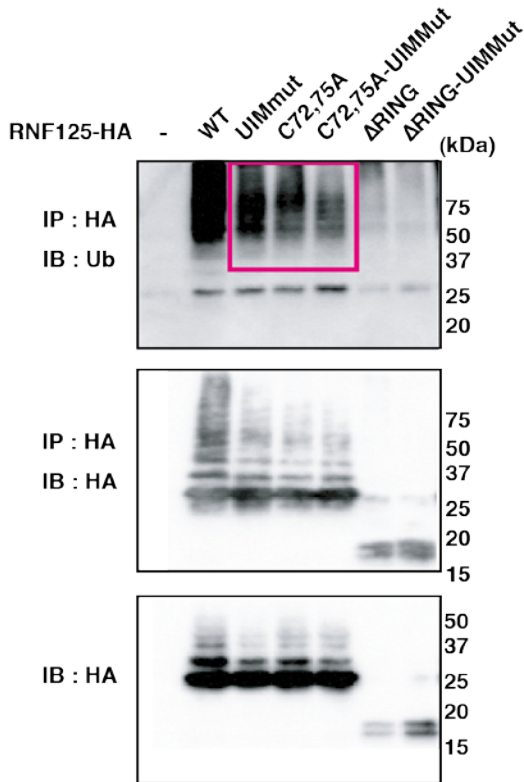
TRIM25 を介した一型インターフェロン産生の制御機構については、報告するに値するだけの結果が得られなかった。しかし、平行して一型インターフェロン産生を負に制御するユビキチンリガーゼである RNF125 の機能解析を行った結果、C 末端領域に一型インターフェロン産生を正に制御すると思われる新たな機能を見いだした。この制御は RIG-I が RNF125 以外の未同定のユビキチンリガーゼによって活性化することによって行われることが示唆された。以下に得られた結果を抜粋して示す。

TRIM25 の C 末端領域には、UIM ドメインと呼ばれるユビキチン結合ドメインがそんざいする。RNF125 の C 末端領域の機能解析のた

め、UIM ドメインの機能を失った変異体を作成し、以下の結果を得た。

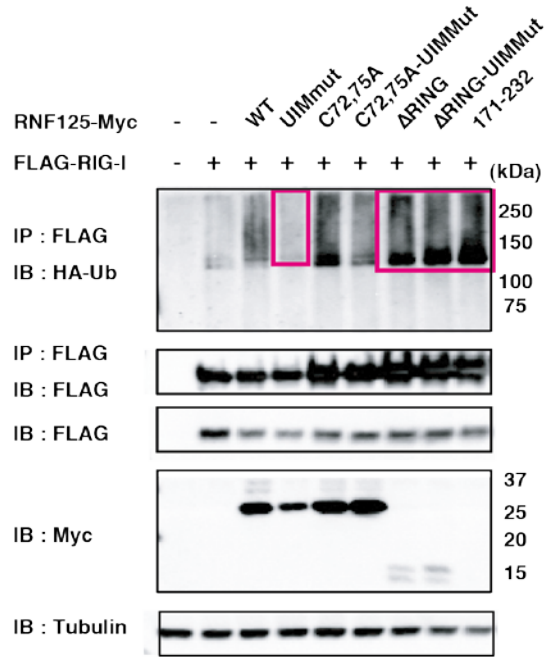


RNF125 の UIM domain 変異体を発現させることで、RIG-I の発現量が減少した



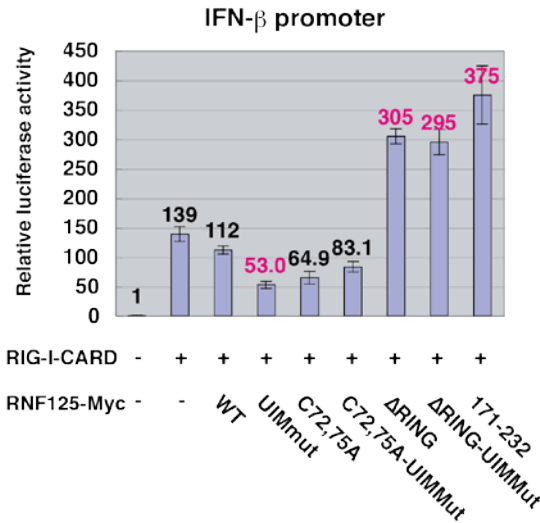
RNF125 の UIM domain 変異体は自己ユビキチン化が減少していた

一方で、RNF125 のユビキチンリガーゼ活性には N 末端領域の RING ドメインが重要である。RING ドメインを欠損した変異体では、ユビキチンリガーゼ活性を持たないにもかかわらず、変異体発現細胞では RIG-I のユビキチン化が亢進していた。更に、RIG-I による一型インターフェロン産生は RNF125 の RING ドメイン欠損変異体の発現によって亢進した。



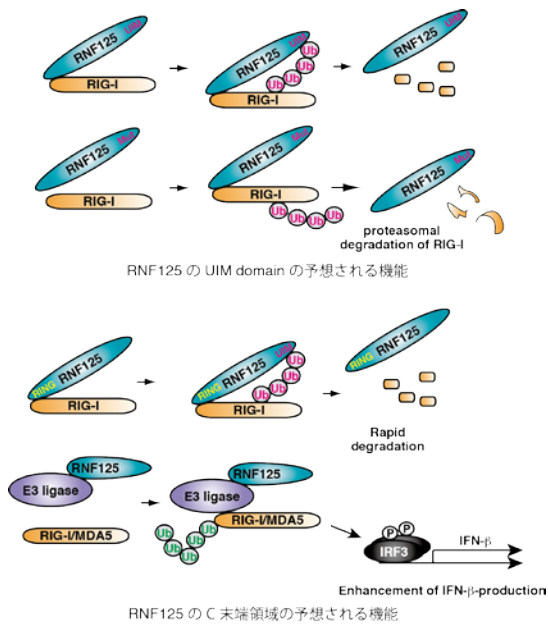
RNF125 の UIM ドメイン変異体発現細胞では RIG-I のユビキチン化が減少していた

RNF125 の RING ドメイン欠損変異体発現細胞では RIG-I に対するユビキチン化が増大していた



RNF125 の RING ドメイン欠損変異体発現細胞では RIG-I による一型インターフェロン産生が亢進した

以上の結果から予想される RNF125 の機能を最後に図示する。



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 4 件)

1. Hishiki, T., Shimizu, Y., Tobita, R., Sugiyama, K., Ogawa, K., Funami, K., Ohsaki, Y., Fujimoto, T., Takaku, H., Wakita, T., Baumert, T. F., Miyanari, Y., and Shimotohno, K. (2010). "Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms." *J Virol* 84(22): 12048-12057, 査読あり
2. Shimizu, Y., Hishiki, T., Sugiyama, K., Ogawa, K., Funami, K., Kato, A., Ohsaki, Y., Fujimoto, T., Takaku, H., and Shimotohno, K. (2010). "Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins." *Virology* 407(1): 152-159, 査読あり

3. Arimoto, K., Funami, K., Saeki, Y., Tanaka, K., Okawa, K., Takeuchi, O., Akira, S., Murakami, Y., and Shimotohno, K. (2010). "Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(36): 15856-15861, 査読あり
4. Sugiyama, K., Suzuki, K., Nakazawa, T., Funami, K., Hishiki, T., Ogawa, K., Saito, S., Shimotohno, K. W., Suzuki, T., Shimizu, Y., Tobita, R., Hijikata, M., Takaku, H., and Shimotohno, K. (2009) "Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro." *J Virology*, 83 (13): 6922-6928, 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

舟見 健児、有元 啓一郎、日紫喜 隆行、清水裕子、小川 和也、杉山 和夫、下遠野 邦忠

Characterization of functional domain at the C-terminal region of RNF125

第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舟見 健児 (FUNAMI KENJI)

千葉工業大学・附属総合研究所・研究員

研究者番号：00421983