

119. ISG15 修飾による自然免疫の制御

奥村 文彦

Key words : ISG15, 4EHP, タンパク質翻訳制御,
ユビキチン様分子, インターフェロン

名古屋大学 大学院理学研究科
生命理学専攻
分子修飾制御学グループ

緒言

1979年に Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) はインターフェロン刺激で誘導されるユビキチン様分子として発見されたり、その後現在に至るまで、ISG15 修飾が担う生理的役割はほとんど解明されていない。しかしながら、ISG15 欠損マウスを用いた研究により ISG15 修飾は特定のウイルス（インフルエンザやヘルペスウイルスなど）に対する抗ウイルス活性があることが報告され、免疫制御に関与することが示されている²⁾。

一方で、ショウジョウバエにおいてメッセンジャー RNA のキャップ結合タンパク質 eIF4E homologous protein (4EHP) は選択的に Caudal のタンパク質翻訳を抑制する³⁾。哺乳類においてはインターフェロンやウイルス感染などによって ISG15 が誘導されていない場合は、4EHP は非常に弱いキャップ結合活性しか有していないために eIF4E 依存性の一般的なタンパク質翻訳に影響を与えることはない^{4,5)}。

しかしながらわれわれは、インターフェロンなどの刺激により 4EHP は ISG15 修飾を受け、強いキャップ構造結合活性を獲得することを既に報告した⁶⁾。このことは ISG15 修飾を受けた 4EHP が eIF4E と競合してキャップ構造を奪い合い、タンパク質翻訳を抑制する可能性を示唆している。ISG15 修飾を受けた 4EHP はショウジョウバエで報告されているように、ある特定の遺伝子のタンパク質翻訳を選択的に阻害する可能性があり、その標的となる遺伝子の同定を試みた。この遺伝子の同定により、ISG15 修飾を受けた 4EHP が担う自然免疫における役割が明らかになると考えられる。

方法および結果

1. 4EHP ノックダウン RAW264.7 細胞株の樹立

われわれは既に ISG15 修飾を受けた 4EHP により選択的にタンパク質翻訳が抑制される遺伝子として、マイクロアレイを用いた網羅的解析によりインターフェロン応答タンパク質 IFI を候補遺伝子として同定している。本研究では詳細に検討するために RAW264.7 細胞を用いることとした。RAW264.7 細胞は大腸菌細胞壁構成成分リポポリサッカライド (LPS) に反応し、ISG15 の発現とさまざまな基質分子の ISG15 修飾を誘導する。また、IFI も LPS 刺激により発現誘導すると考えられた。コントロール細胞あるいは、4EHP や ISG15 をノックダウンした細胞株を樹立し、LPS で刺激後、各タンパク質をウェスタンブロットティングで比較定量した (図 1)。

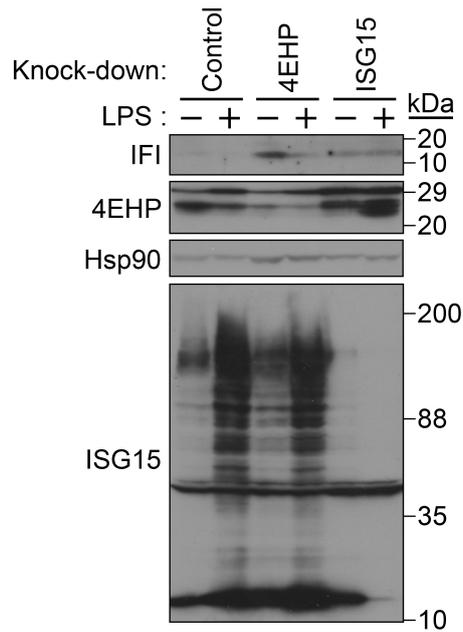


図1. 4EHP あるいは ISG15 のノックダウンにより IFI の発現量が増加する.

コントロール, あるいは 4EHP, ISG15 をノックダウンした RAW264.7 細胞を LPS で刺激後, ウェスタンブロットティングにより IFI, 4EHP, ISG15 の発現を確認した. ISG15 は約 15 kDa.

通常培養条件では LPS 刺激なしでも弱い ISG15 の発現と ISG15 修飾が認められたが, それは LPS 刺激により著しく増加していた. コントロール細胞においては, IFI の発現は LPS 刺激により低下する傾向があったが, ISG15 のノックダウンによりあまり制御されなくなった. また, 4EHP のノックダウンにより IFI の発現は増加していたが, LPS 刺激により発現抑制がみられた. したがって 4EHP と ISG15 により IFI の発現が抑制されている可能性が示唆された.

2. 4EHP 複合体の解析

われわれは既に免疫沈降と質量分析器を用いることで 4EHP 結合タンパク質として Cep を同定した (図 2).

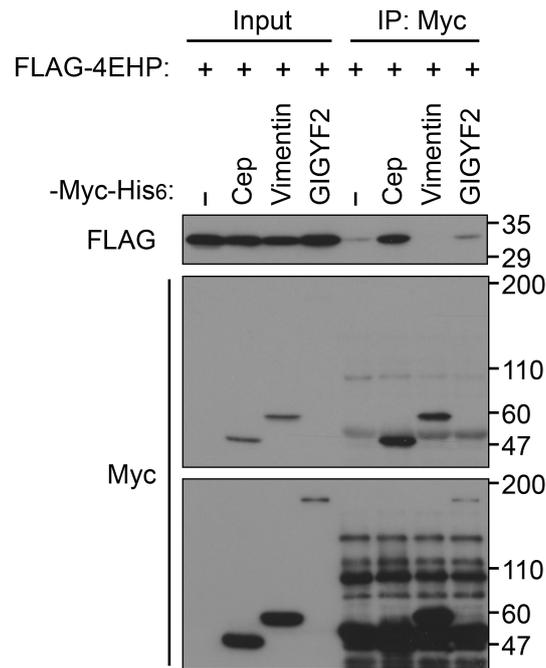


図2. FLAG-4EHP と Cep-Myc-His6 は結合する。

FLAG-4EHP と結合する候補タンパク質である Vimentin, Cep, また既に結合が報告されている GIGYF2 の C 末端側に Myc-His6 タグを付加し, 293T 細胞に発現させ抗 Myc 抗体で免疫沈降し, 4EHP との結合をウェスタンブロットティングにより調べた。

Cep は細胞内の局在から核酸結合活性があることが示唆されているので, 特異的に IFI の mRNA を認識している可能性があるが, 機能未知の分子である。過剰発現状況下では 4EHP との結合を確認できたので, 内在性の結合を確認するために各タンパク質を免疫沈降できる抗体を探索した (図3)。

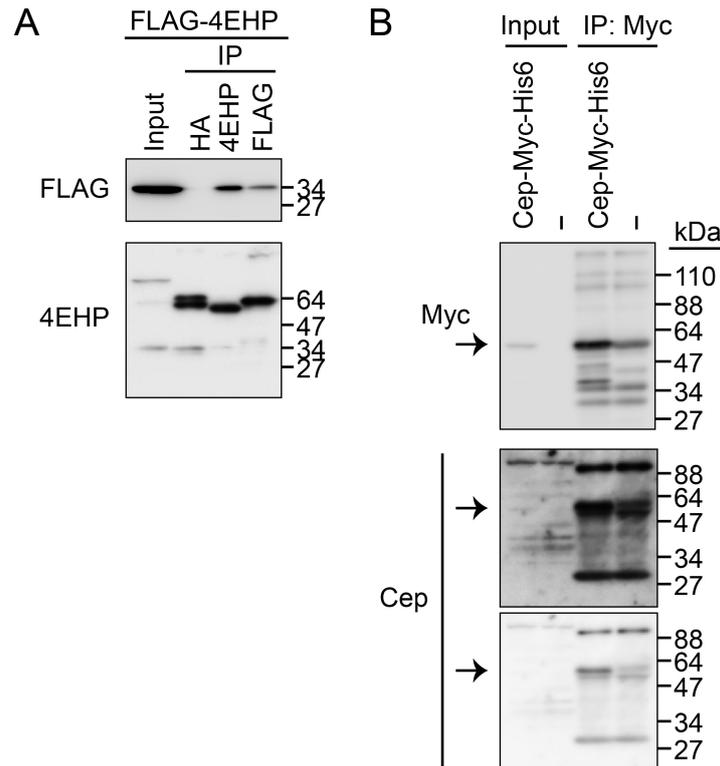


図3. 各種抗体の確認.

A) ウェスタンブロッティングに使用できる抗 4EHP 抗体は既に入手していたが、免疫沈降にはあまり適していないので他の市販抗体を試した。サンタクルズ社の抗体はウェスタンブロッティングには適していないが免疫沈降には適していることが分かった。B) Cep に対する抗体をサンタクルズ社より入手した。免疫沈降には適していなかったが、ウェスタンブロッティングには使用できることが分かった。

サンタクルズ社の抗 4EHP 抗体は免疫沈降に適していること、また抗 Cep 抗体は感度が弱いながらもウェスタンブロッティングに使用できることが分かったので、現在それらを用いて内在性の 4EHP と Cep の結合を確認中である。

3. IFI の選択的翻訳阻害が担う生理的役割を解析する

IFI は機能未知の分子であるが過去の報告ではミトコンドリアに局在することが示されており、アポトーシスへの関与が示唆されている。しかしながらこの報告は過剰発現した IFI で検討されており、生理的な役割を反映しているのかは不明である。現在使用している抗 IFI 抗体はウェスタンブロッティングの結果より、免疫染色に使用できないことが考えられたので、質の良い抗 IFI 抗体の作製を試みた。

検討の結果、IFI はその大部分が疎水性アミノ酸で構成されており、免疫するための抗原ペプチドの合成が困難なことが分かった。したがって、His6 タグを付加した IFI を、大量培養した大腸菌から 8M 尿素存在下で精製し免疫を試みた。これまでに 2 回試みたが、いずれにおいても抗 IFI 抗体は作製できなかった。また、他の市販抗体を試したがいずれもウェスタンブロッティングや免疫染色に適していなかった。したがって IFI が生理的な条件下でミトコンドリアに局在しアポトーシスを制御しているのかはいまだ不明である。今後はポリエチレングリコール (PEG) 修飾により抗原となる合成ペプチドの親水化を図り、抗体の作製を再度行っていきたい。

考 察

ISG15 修飾を受けた 4EHP により IFI の発現量が制御されていることを明らかにすることで、ISG15-4EHP の自然免疫における生理的な役割を明らかにすることができると考えられる。持続的な IFI の発現がアポトーシスを介して慢性炎症などに関与していた場合、新たな治療法方法の確立を試みる事ができる。すなわち、図 4 に示しているように、IFI の持続的な発現が慢性炎症などの疾患につながっている場合、4EHP の ISG15 修飾を受けるリジン残基に変異

があることや、ISG15の発現やISG15修飾機構に異常があることなどが考えられる。この場合はそれらを補う遺伝子治療が有効であると考えられる。また、IFIの活性を抑制するような化合物・手法が得られれば、有効な治療方法を確立できる。

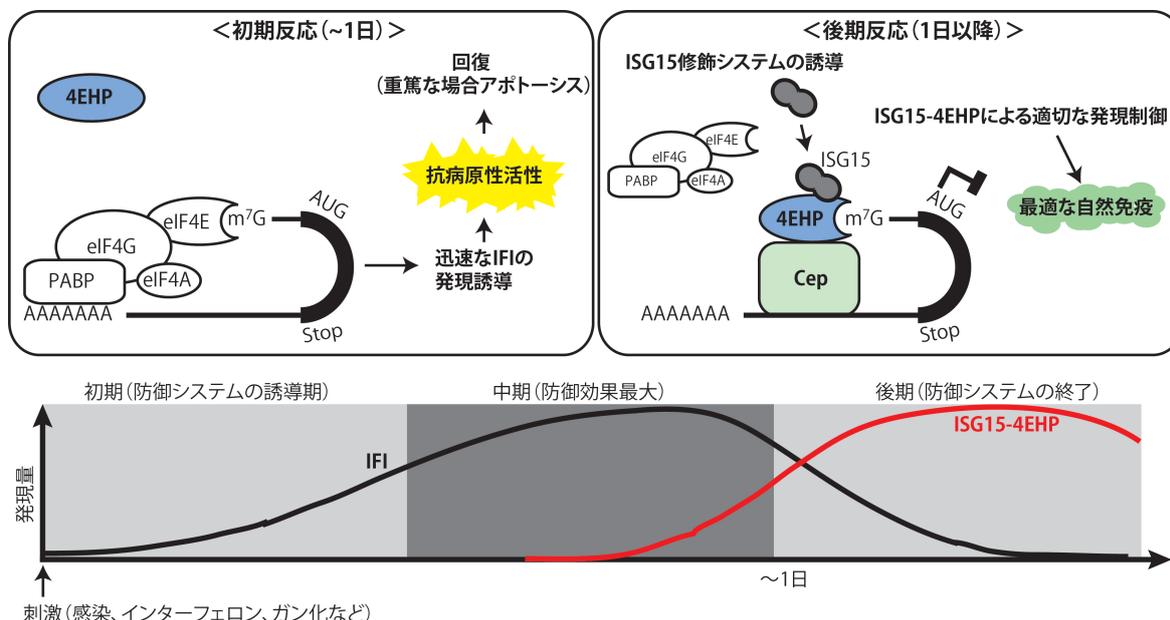


図4. ISG15修飾を受けた4EHPによるIFIの発現制御が担う役割の仮説。

通常状態では4EHPはキャップ構造結合活性が弱いので、eIF4Eによる翻訳を阻害しない。ISG15誘導条件下では4EHPはISG15修飾を受け、強力なキャップ構造結合活性を獲得し、Cepと複合体を形成することで選択的にIFIのタンパク翻訳を阻害する。この過程に異常があると持続的にIFIが発現し慢性炎症を引き起こす可能性がある。

一方で、ISG15修飾の生理的な役割を解明する一つの大きな手掛かりとなるので、多くの研究者のISG15ワールドへの参入を促すことができ、自然免疫を理解するにあたってさまざまな知見が得られる可能性がある。

本研究の遂行に当たりご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Farrell, P. J., Broeze, R. J. & Lengyel, P. : Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature*, **279** : 523-525, 1979.
- 2) Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R. E., García-Sastre, A., Leib, D. A., Pekosz, A., Knobeloch, K. P., Horak, I. & Virgin, H. W. 4th. : IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104** : 1371-1376, 2007.
- 3) Cho, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P. & Sonenberg, N. : A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, **121** : 411-423, 2005.
- 4) Rosettani, P., Knapp, S., Vismara, M. G., Rusconi, L. & Cameron, A. D. : Structures of the human eIF4E homologous protein, h4EHP, in its m7GTP-bound and unliganded forms. *J. Mol. Biol.*, **368** : 691-705, 2007.
- 5) Zuberek, J., Kubacka, D., Jablonowska, A., Jemielity, J., Stepinski, J., Sonenberg, N. & Darzynkiewicz, E. : Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs. *RNA*, **13** : 691-697, 2007.
- 6) Okumura, F., Zou, W. & Zhang, D. E. : ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes Dev.*, **21** : 255-260, 2007.