

抗ウイルス自然免疫応答における脱ユビキチン化酵素の機能解析



CHIBA UNIVERSITY

鈴木 優佑¹, 坂井 美友¹, 宮本 江理¹, 尾野本 浩司¹, 藤井 雅寛², 米山 光俊^{1,3}

1) 千葉大学 真菌医学研究センター 感染免疫分野

2) 新潟大学 医歯学総合研究科 ウィルス学分野

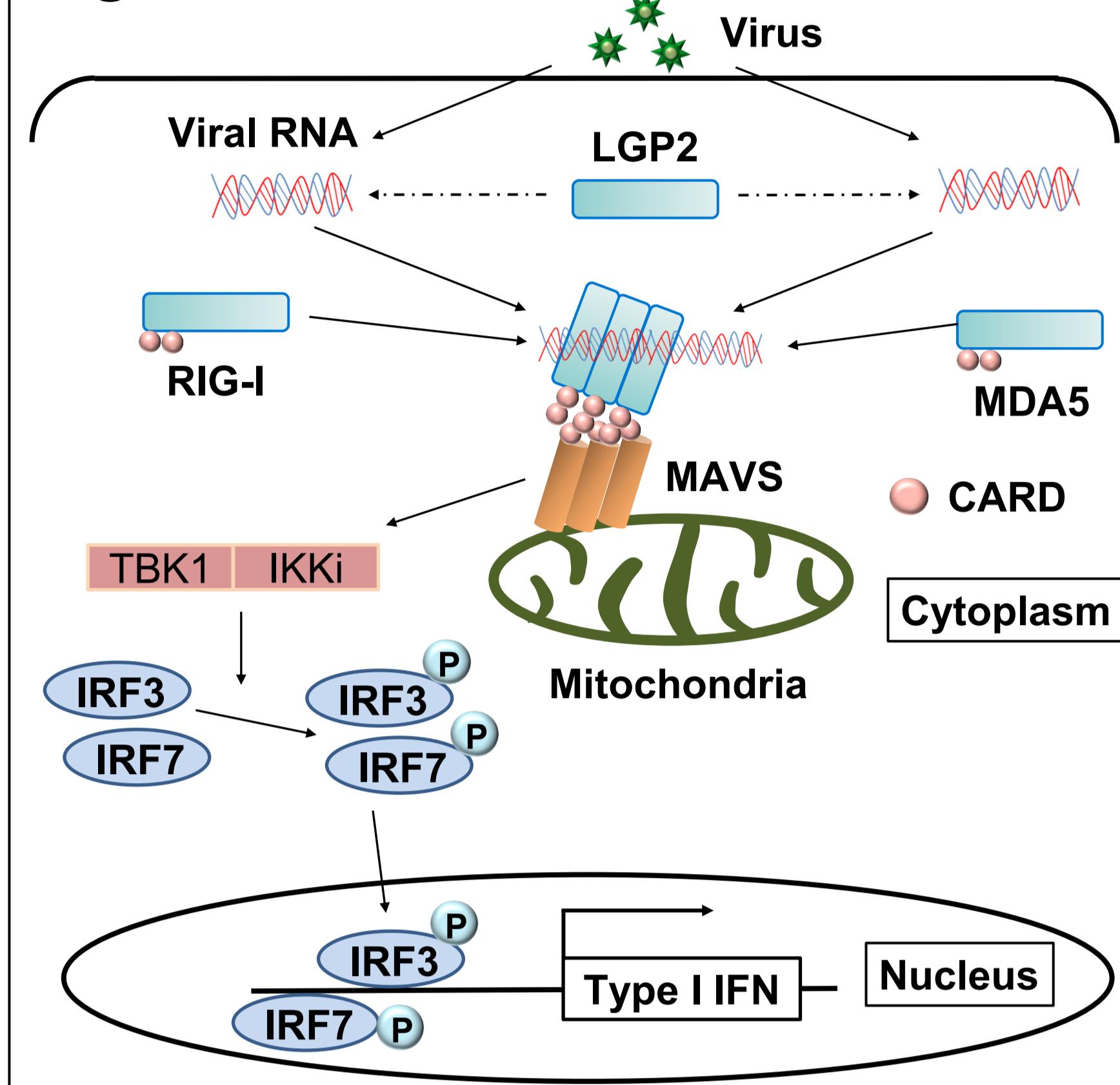
3) 千葉大学 災害治療学研究所



序論

Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs) は、抗ウイルス自然免疫応答における主要な細胞内ウイルスセンサーである。RLR は、細胞内に侵入した RNA ウィルスを認識し、下流のシグナル伝達分子の活性化を介して、I型インターフェロン(IFN) を中心としたサイトカインの産生を誘導する。産生された IFN は、周囲の細胞を活性化し、感染細胞を迅速に排除する。一方、ユビキチン・脱ユビキチン反応は、可逆的なタンパク質翻訳後修飾であり、標的タンパク質の厳密な機能制御に関与している。本研究では、脱ユビキチン化酵素である Ubiquitin-specific protease 10 (USP10) が RLR シグナルの正の制御因子として機能することを見出し、その分子制御機構の解明を行った。

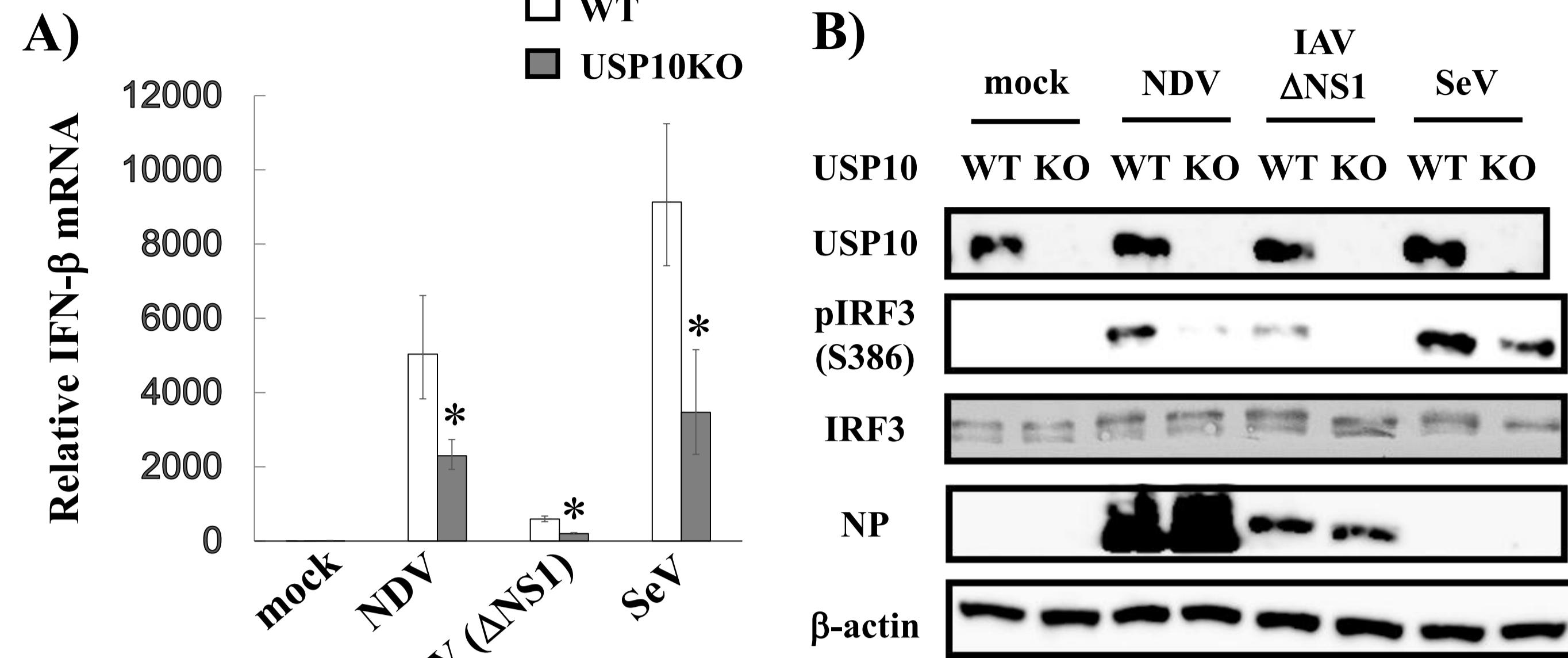
Figure 1



RLR シグナル経路

ヒトにおいて RLRs は、RIG-I, Melanoma Differentiation Associated gene 5 (MDA5) および Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LGP2) で構成される。RIG-I および MDA5 は、ウイルス RNA を認識すると、ATP 依存的に活性化型へと立体構造を変化させ、N 末端 Caspase recruitment domains (CARD) を介してアダプター分子である Mitochondrial antiviral signaling (MAVS) と結合する。その後プリオノン様凝集体を形成した MAVS は、下流の TANK-binding kinase 1 (TBK1) や Inducible IκB kinase (IKK1) を活性化し、IFN regulatory factor 3 (IRF3) および IRF7 をリン酸化する。リン酸化した IRF3/7 は、二量体を形成し核移行することで IFN 遺伝子を活性化する。

Figure 2

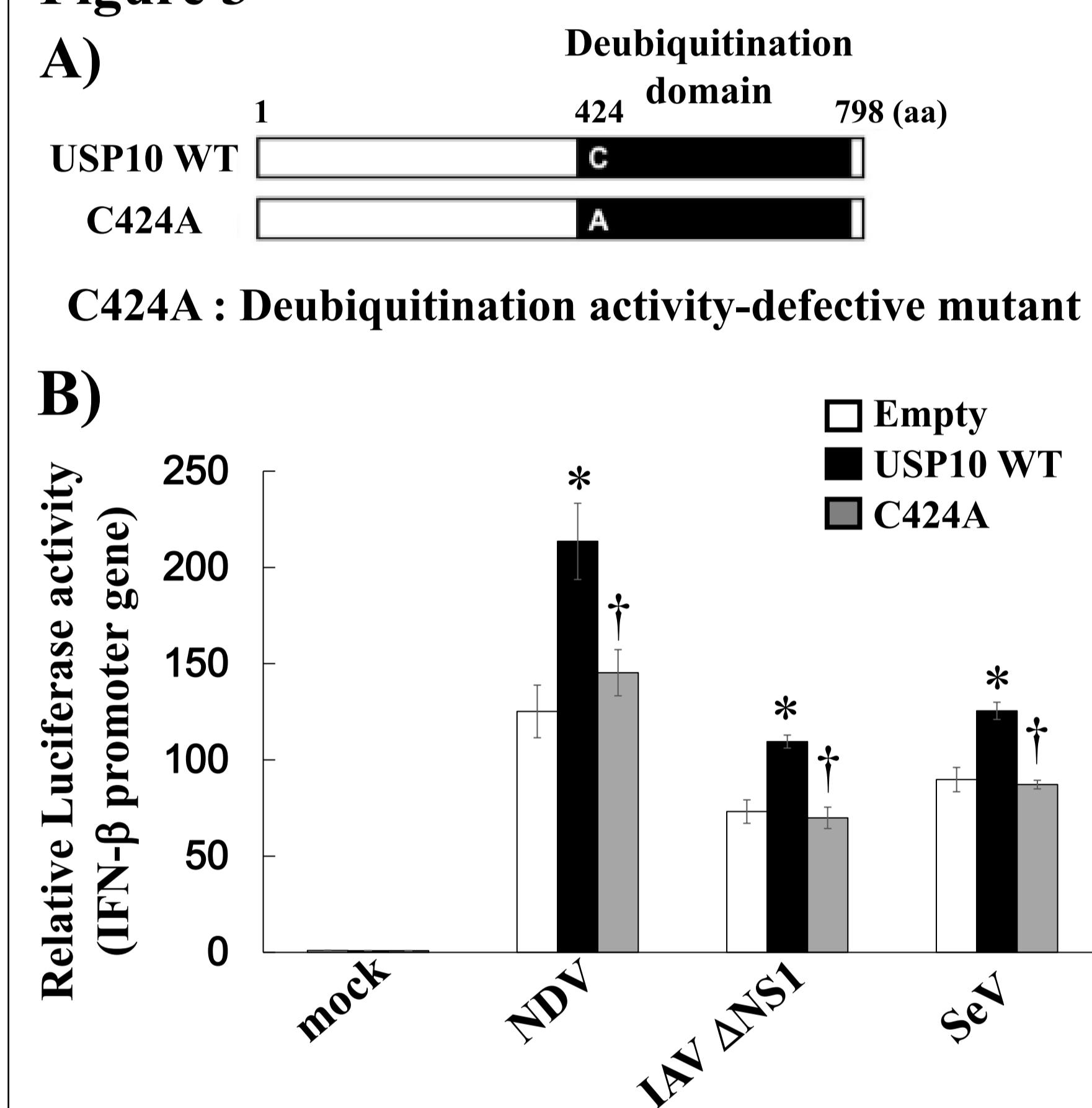


USP10 は抗ウイルス自然免疫応答の正の制御因子である。

- A) HeLa WT または USP10KO 細胞に対し mock, Newcastle disease virus (NDV), Influenza A virus (IAV) ΔNS1 または Sendai virus (SeV) を感染させ、9 時間後の IFN- β の mRNA 発現量を qRT-PCR により測定した。
B) HeLa WT または USP10KO 細胞に対し mock, NDV, IAV ΔNS1 または SeV を感染させ、9 時間後に細胞からタンパク質を抽出した。抗体を用いて Western blotting (WB) により各タンパク質の発現を検出した。

*p<0.05 compared with WT.

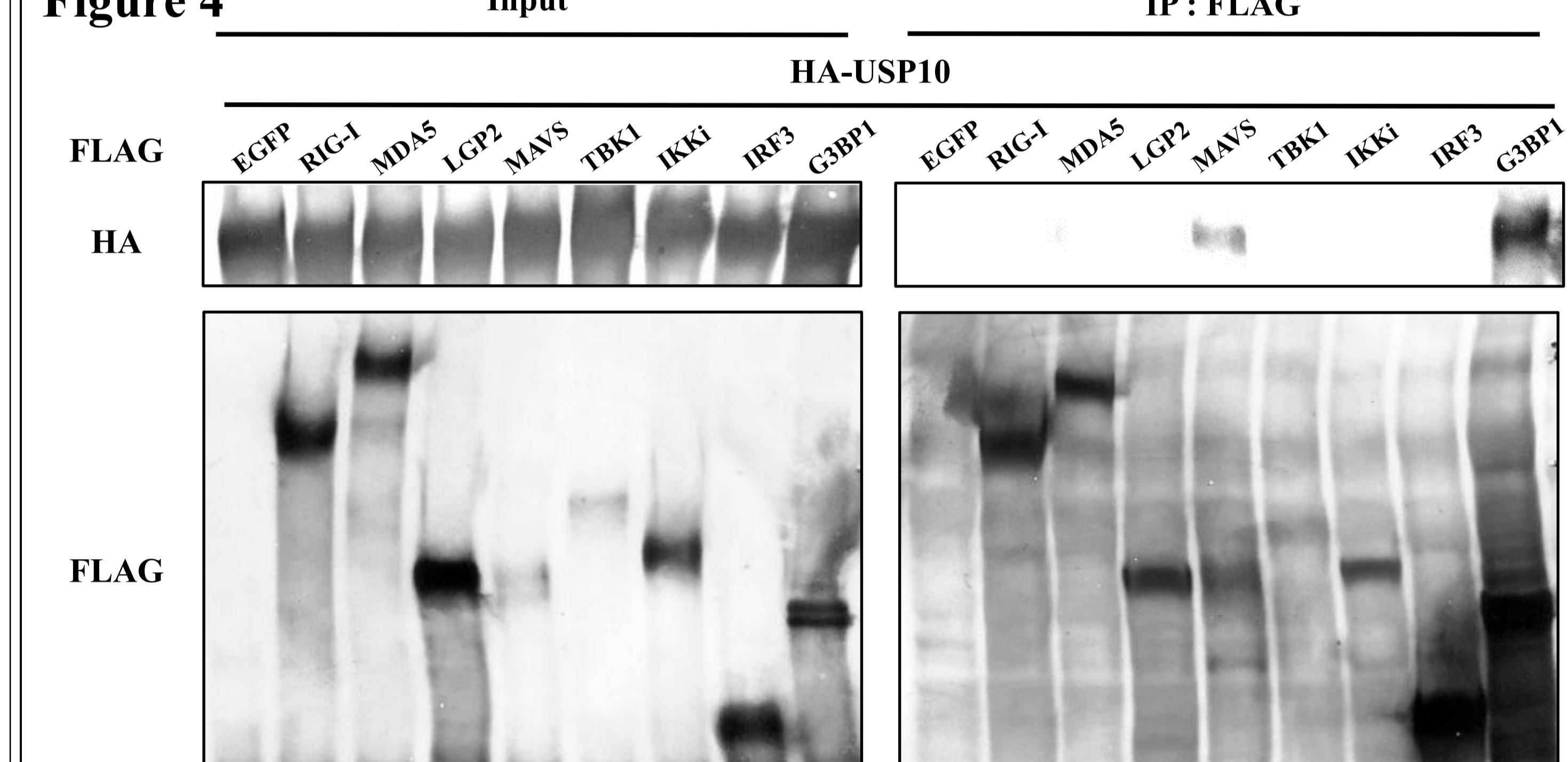
Figure 3



USP10 による抗ウイルス免疫応答の調節には、脱ユビキチン化活性が必要である。

- A) USP10 のドメイン構造。C 末端に脱ユビキチン化ドメインをもつ。C424A は、424 番目のシスティン残基をアラニン残基に置換し、脱ユビキチン化を不活性化した変異体（下側）。
B) L929 細胞にレポータープラスミド (IFN- β プロモーター遺伝子) および empty, USP10WT もしくは C424A 発現ベクターを共トランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後、mock, NDV, IAV ΔNS1 または SeV を感染させ、12 時間後のレポーター活性を測定した。*p<0.05 compared with Empty. †p<0.05 compared with USP10 WT.

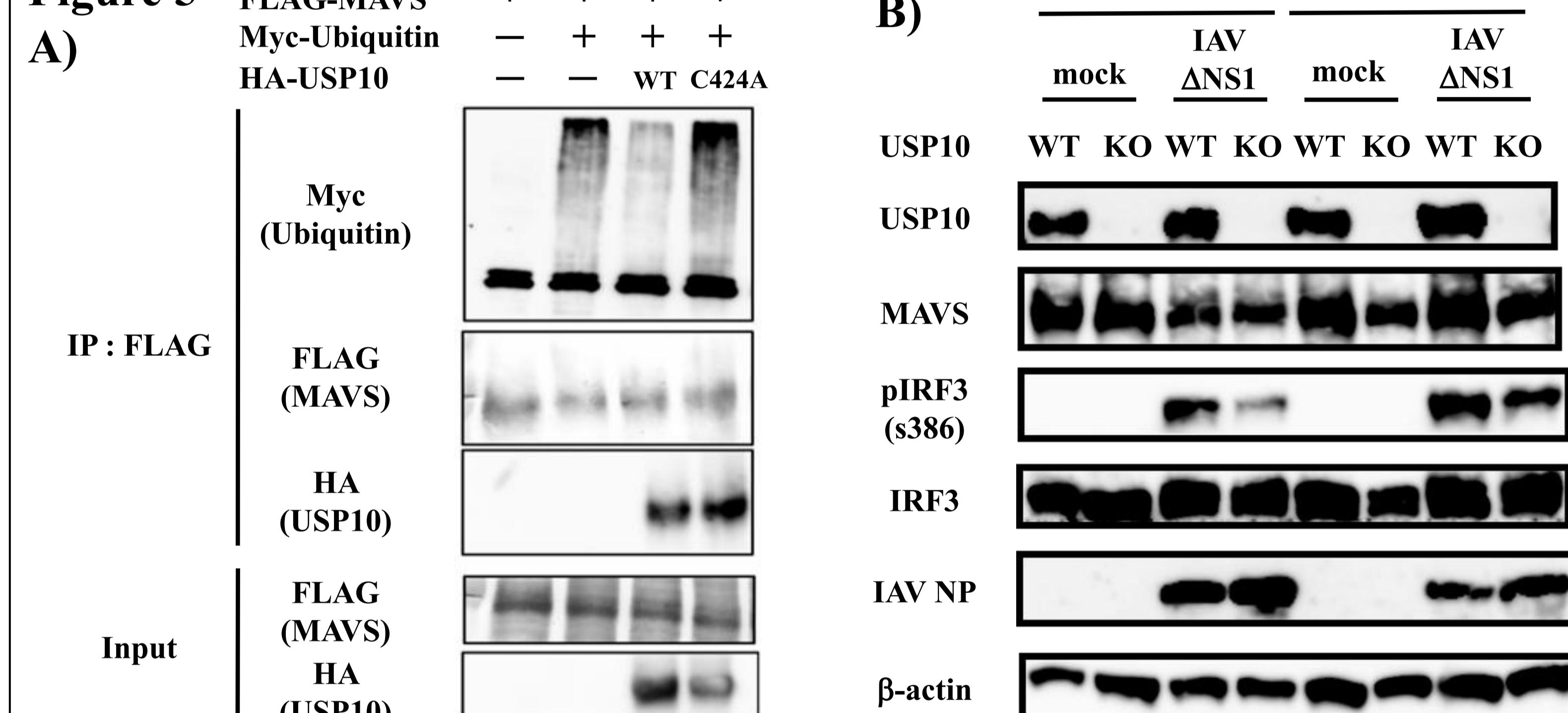
Figure 4



USP10 は MAVS と特異的に結合する。

HEK293T 細胞に FLAG タグ付き EGFP (ネガティブコントロール), Ras GTPase activating protein binding protein 1 (G3BP1) (ポジティブコントロール), RIG-I, MDA5, LGP2, MAVS, TBK1, IKK1 もしくは HA タグ付き USP10 発現ベクターを共トランスフェクションした。48 時間後、細胞からタンパク質を抽出し、anti-FLAG 抗体および Dynabeads protein G bound を用いて免疫沈降法 (IP) により解析した。

Figure 5

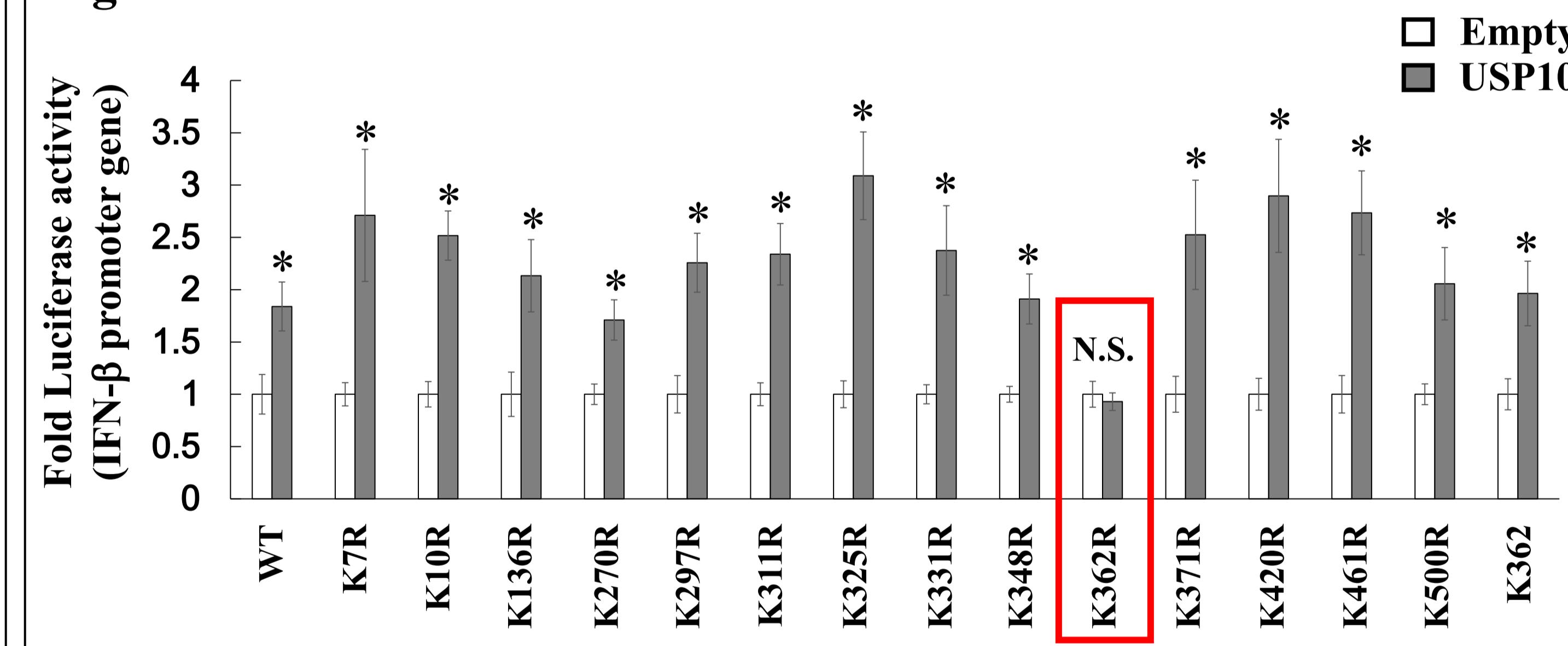


USP10 は MAVS を脱ユビキチン化および安定化する。

- A) HEK293T 細胞に対し、FLAG タグ付き MAVS と Myc タグ付き empty もしくは Ubiquitin と HA タグ付き empty, USP10WT もしくは C424A 発現ベクターを共トランスフェクションした。48 時間後、細胞からタンパク質を抽出し、anti-FLAG 抗体および Dynabeads protein G bound を用いて IP により解析した。

- B) HEK293T WT または USP10KO 細胞に対し、mock もしくは IAV ΔNS1 を 9 時間感染させた。その後、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を 12 時間処理した。

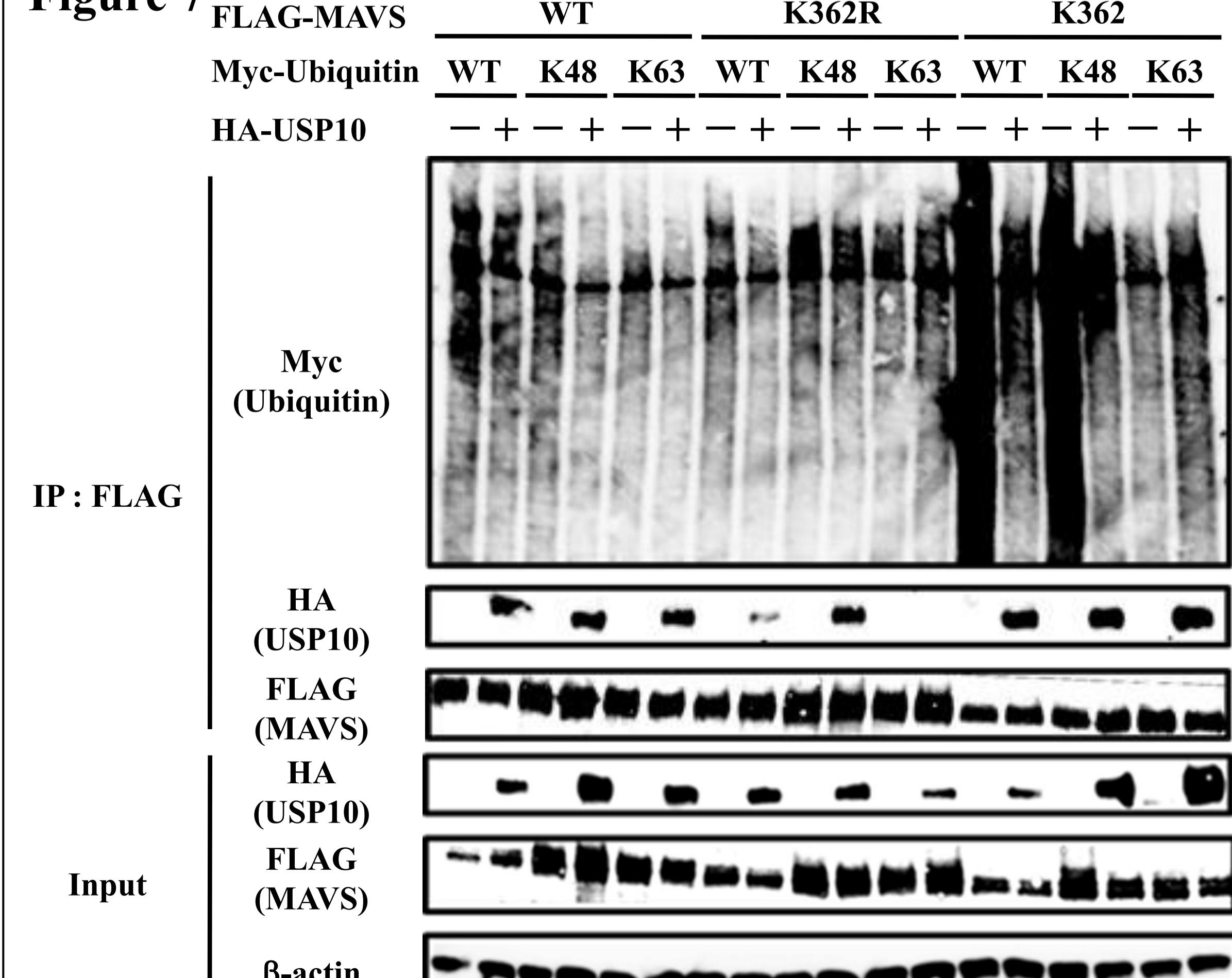
Figure 6



USP10 は MAVS の 362 番目のリジン残基を介して IFN 応答を誘導する。

L929 細胞に対し、レポータープラスミド (IFN- β プロモーター遺伝子) と MAVS WT またはリジン残基変異体と empty または USP10 発現ベクターを共トランスフェクションした。トランスフェクション 36 時間後、レポーター活性を測定した。*p<0.05 compared with each Empty.

Figure 7

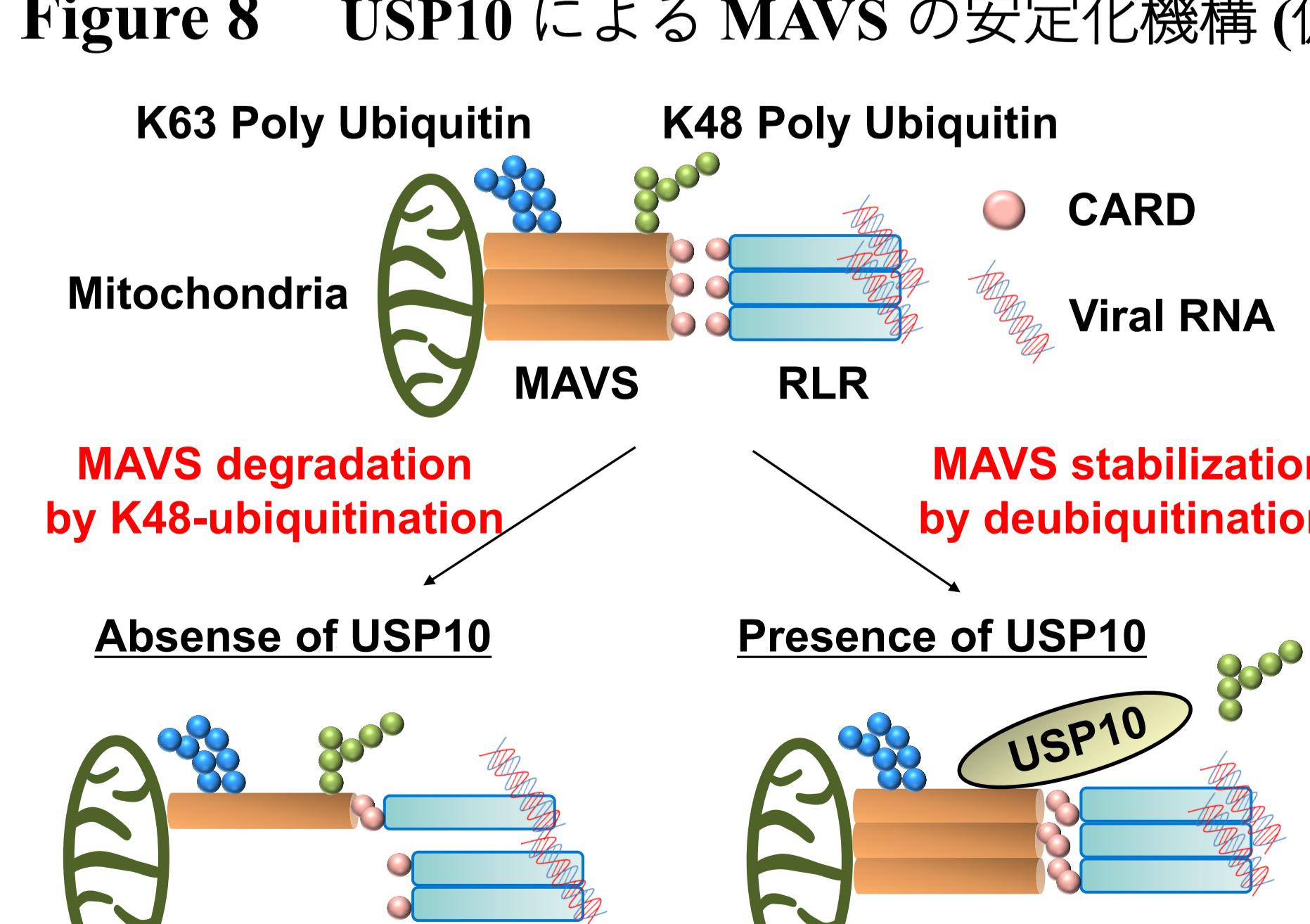


USP10 は MAVS の K48 型ポリユビキチン鎖を脱ユビキチン化する。

HEK293T 細胞に対し、FLAG タグ付き MAVS WT, K362R または K362 と Myc タグ付き Ubiquitin WT, K48 または K63 と HA タグ付き empty または USP10 発現ベクターを共トランスフェクションした。48 時間後、細胞からタンパク質を抽出し、anti-FLAG 抗体および Dynabeads protein G bound を用いて IP により解析した。

結論

Figure 8 USP10 による MAVS の安定化機構 (仮説)



USP10 は、MAVS の K48 型ポリユビキチン鎖を脱ユビキチン化し、安定化することで抗ウイルス自然免疫応答を正に制御する可能性が示唆された。