



## 抗ウイルス因子インターフェロンの新たな活性制御メカニズムを解明

### 研究成果のポイント

- ・インターフェロン(IFN)信号伝達分子チロシンキナーゼ2(TYK2)の新規結合タンパク質としてタンパク質分解系を担う Jun activation domain-binding protein 1(JAB1)を同定した。
- ・JAB1が調節するタンパク質分解系分子群を抑制する低分子化合物を作用させた場合、IFN受容体タンパク量の増加(分解低下)が認められ、IFN刺激による下流信号伝達の活性化や抗ウイルス活性・増殖抑制作用の増強が観察された。
- ・JAB1およびそのタンパク質分解系は抗ウイルス薬や抗がん剤開発の新規標的としての可能性が期待できる。

### 研究成果の概要

生体内の細胞はウイルスなど病原体の侵入や腫瘍細胞の増殖に対抗して、液性タンパク質であるサイトカイン、特にインターフェロン(IFN)を産生します。IFNは抗ウイルス因子としてウイルス増殖の阻止や腫瘍細胞増殖の抑制だけでなく、免疫系および炎症の調節などの働きを有し、生体の恒常性維持に重要な分子です。IFNはすでに臨床の場において、抗ウイルス薬や抗がん剤として広く使用されています。

IFNで細胞を刺激すると、IFN受容体が分解されることでIFNの効果が限定されます。今回、私たちは、JAB1というタンパク質分解系を調節する分子がIFN受容体分解を抑制することを発見しました。実際、JAB1が調節するタンパク質分解系分子群を抑制する低分子化合物を作用させた場合、IFN受容体タンパク量の増加(分解低下)が認められ、IFN刺激による下流信号伝達の活性化や抗ウイルス活性・増殖抑制作用の増強が観察されました。JAB1タンパク質やそのタンパク質分解系を標的とした新たな薬剤を開発できれば、IFN作用を人為的に操作することが可能となり、IFN治療成績の向上に繋がることが期待されます。

本研究は生物学分野で権威ある雑誌「The Journal of Biological Chemistry」のPapers in pressで9月17日に公表されました。

## 論文発表の概要

研究論文名 : Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1) is required for the optimal response to interferons (JAB1 はインターフェロン活性の適正化に必要である)

著者 : 氏名 (所属) 室本竜太, 中嶋麻衣子, 平島洸基, 平尾 徹, 今 重之, 松田 正 (北海道大学大学院薬学研究院), 下田和哉 (宮崎大学医学部), 織谷健司 (大阪大学大学院医学系研究科)

公表雑誌 : The Journal of Biological Chemistry (<http://www.jbc.org/>)

公表日 : 日本時間 (現地時間) 2013 年 9 月 17 日 (火) (米国東部時間 2013 年 9 月 16 日)

Papers in press に公表

## 研究成果の概要

### (背景)

インターフェロン (IFN) は抗ウイルス作用, 抗腫瘍作用, 免疫調節作用を有する液性タンパク質サイトカインの一つとして知られており, 抗ウイルス薬や抗がん剤として, すでに臨床の場においても広く使用されています。IFN の種類としては特にタイプ I 型 (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  など) とタイプ II 型 (IFN- $\gamma$ ) が知られており, それぞれの作用は特異的受容体 (I 型および II 型) を介した細胞内信号伝達によって発揮されます。また, IFN 受容体は, I 型および II 型の両者とも 2 つ以上の異なるサブユニットから構成されています (I 型 IFN 受容体は IFNAR1 と IFNAR2, II 型 IFN 受容体は IFNGR1 と IFNGR2)。IFN 受容体は, IFN の作用を発揮するための信号伝達のため, JAK (Janus キナーゼ) ファミリー<sup>(1)</sup> を利用します。特に I 型 IFN 受容体の IFNAR1 サブユニットは JAK ファミリーの一つである TYK2<sup>(2)</sup> タンパク質と結合し, IFNAR2 サブユニットは JAK1 タンパク質と結合します。IFN の結合によって IFN 受容体が活性化されると, 受容体サブユニットが二量化<sup>(3)</sup> し, TYK2 と JAK1 が自己リン酸化により活性化し, さらに転写因子 STAT タンパク質 (STAT1, STAT2) をリン酸化して活性化します。リン酸化された STAT1 と STAT2 タンパク質は IRF9 タンパク質 とともに ISGF3 と呼ばれる複合体を形成し, ISGF3 複合体は核内に移動し DNA 上に存在する ISRE (IFN-Stimulated Response Elements) に結合することで IFN 活性化遺伝子群 (プロモーターに ISRE を含有) の転写を誘導します。(図 1) IFN の信号伝達系の活性化制御機構の解明はウイルス感染やがんの治療薬開発に向けて, 重要な手掛かりになると考えられます。

IFN 受容体タンパクの量は, 細胞の IFN に対する応答性を規定する要因のひとつです。IFN 受容体タンパク量の調節にはユビキチン化が役割をもつことがこれまでに明らかにされてきました。ユビキチン化は 3 種のユビキチン化酵素群 (E1, E2, E3) の働きにより, 標的蛋白質を選択的に認識してユビキチン<sup>(4)</sup> を付加し, その機能を制御する翻訳後修飾です。ユビキチン化されたタンパク質は多くの場合分解されます。また, 3 種の酵素のうち E3 ユビキチン化酵素は選択的な基質識別を担う分子であることから, その活性制御メカニズムは詳細に解析されています。なかでも Cullin 型の多サブユニットからなる E3 ユビキチン化酵素はユビキチン様タンパク質である NEDD8 タンパク質修飾 (NEDD8 化) によって活性化され, 一方で脱 NEDD8 化酵素としてののはたらきを持つ COP9 シグナロソーム (CSN) 複合体によって抑制されることが知られています。

私たちは IFN 信号伝達に重要な TYK2 タンパク質と結合するタンパク質として JAB1 タンパク質を同定しました。JAB1 タンパク質は CSN 複合体を構成する 8 つのサブユニット (CSN1~CSN8) のひとつ (CSN5) であり, E3 ユビキチン化酵素の活性抑制に関わることから, 本研究では IFN 信号伝達において JAB1 を介した転写翻訳後修飾 (NEDD8 化) 調節がどのように働くかを検討しました。

### (実験手法)

酵母ツーハイブリッド法<sup>(5)</sup>により新規 TYK2 結合タンパク質として JAB1 を同定し、ヒト子宮頸癌細胞 HeLa 細胞内でも両者が結合することを免疫沈降法<sup>(6)</sup>や蛍光顕微鏡観察により確認しました。ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞を IFN 刺激すると STAT のリン酸化や活性化, IFN 誘導性の遺伝子発現が観察されます。その際の JAB1 の関与を調べるため, siRNA<sup>(7)</sup>により内在性 JAB1 発現を低下させた HeLa 細胞を用いて, STAT のリン酸化や活性化, IFN 誘導性の遺伝子発現への影響をウエスタンブロット法<sup>(8)</sup>, ルシフェラーゼアッセイ<sup>(9)</sup>, Real-time PCR 法<sup>(10)</sup>により検討しました。また, IFN 活性を担う IFN 受容体タンパク量への JAB1 発現低下による影響もウエスタンブロット法で検討しました。さらに JAB1 の IFN シグナルへの影響の分子メカニズムを検討するために, JAB1 を構成成分とする GSN の脱 NEDD8 化作用に注目し, JAB1 発現低下および NEDD8 発現低下で IFN 受容体タンパク量への影響をウエスタンブロット法で検討するとともに, 合成 NEDD8 化阻害剤を用いて IFN 受容体タンパク量, IFN 誘導性下流信号伝達分子の活性化および遺伝子発現, さらに IFN による抗ウイルス活性や HeLa 細胞の増殖抑制作用への影響を検討しました。また, 合成 NEDD8 化阻害剤の IFN 受容体タンパク量への影響を種々のヒト腫瘍細胞株や正常細胞を用いて検討しました。

### (研究成果)

ヒト子宮頸癌細胞 HeLa 細胞内で TYK2 と JAB1 は特異的に結合しました。ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞において siRNA により内在性 JAB1 タンパク量を低下させると, IFN 誘導性の STAT のリン酸化や活性化, IFN 誘導性の遺伝子発現が低下しました。また, JAB1 低下により IFN 活性を担う IFN 受容体タンパク量も低下しました。さらに JAB1 低下では JAB1 を構成成分とする GSN の脱 NEDD8 化作用が低下し, IFN 受容体タンパク量も低下しました。一方, NEDD8 発現低下では IFN 受容体タンパク量の増加(分解低下)が観察されました。さらに合成 NEDD8 化阻害剤を用いた実験においても IFN 受容体タンパク量の増加(分解低下)や IFN 誘導性下流信号伝達分子の活性化および遺伝子発現, さらに IFN による抗ウイルス活性, HeLa 細胞の増殖抑制作用の増強が観察されました。また, 種々のヒト腫瘍細胞株や正常細胞において合成 NEDD8 化阻害剤による IFN 受容体タンパク量の増加(分解低下)が観察されました。

以上の結果から, JAB1 はタンパク質の転写翻訳後修飾(NEDD8 化)を介して IFN 機能を調節する新たな IFN 信号伝達系制御因子であることが示されました。(図 2)

### (今後への期待)

ウイルス感染やがんの患者さんのための新しい薬の開発を行う際に, JAB1 タンパク質およびそのタンパク質分解系は新たな分子標的となり得ると考えられます。

## お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 助教 室本 竜太 (むろもと りゅうた)

TEL: 011-706-3245 FAX: 011-706-4990 E-mail: muro@pharm.hokudai.ac.jp

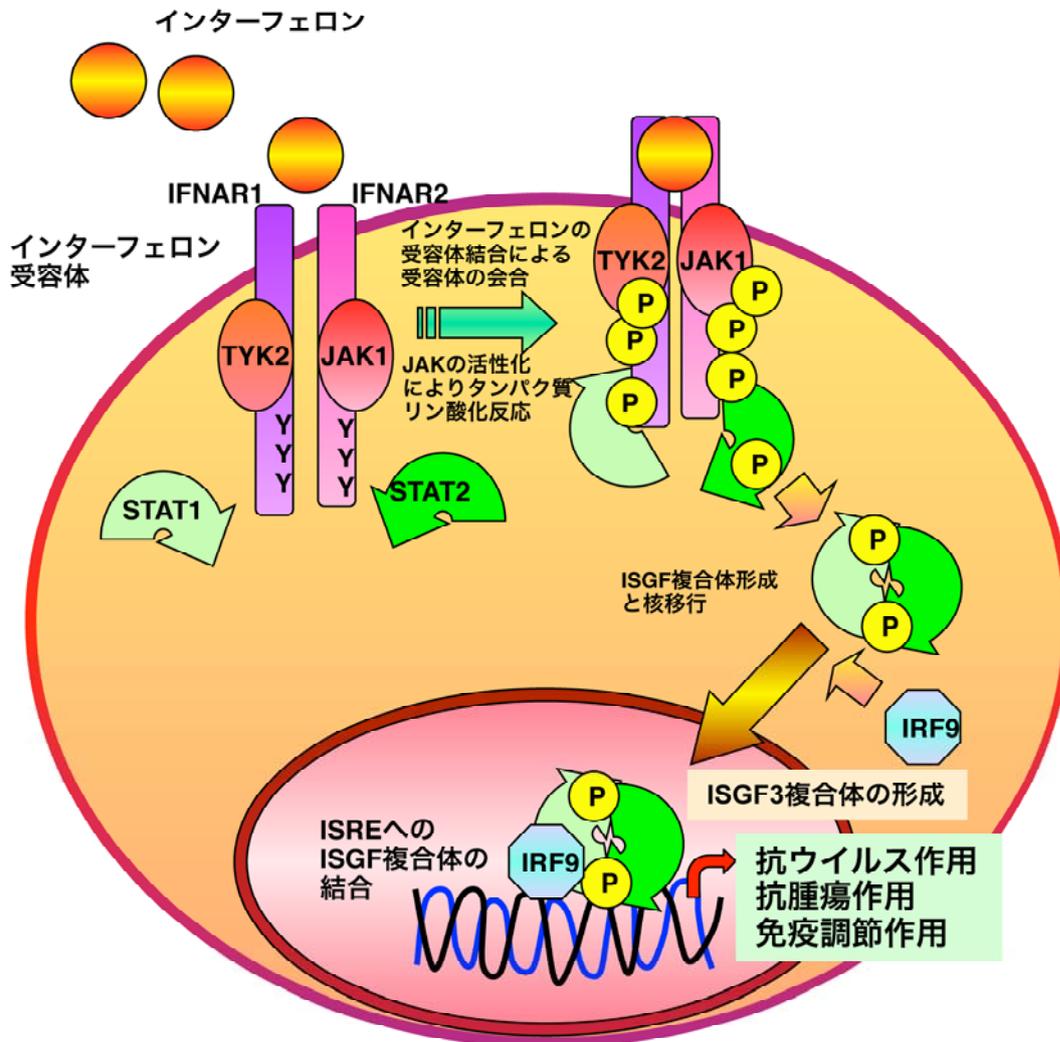
所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 教授 松田 正 (まつだ ただし)

TEL: 011-706-3243 FAX: 011-706-4990 E-mail: tmatsuda@pharm.hokudai.ac.jp

ホームページ：http://www.pharm.hokudai.ac.jp/eisei/index.html

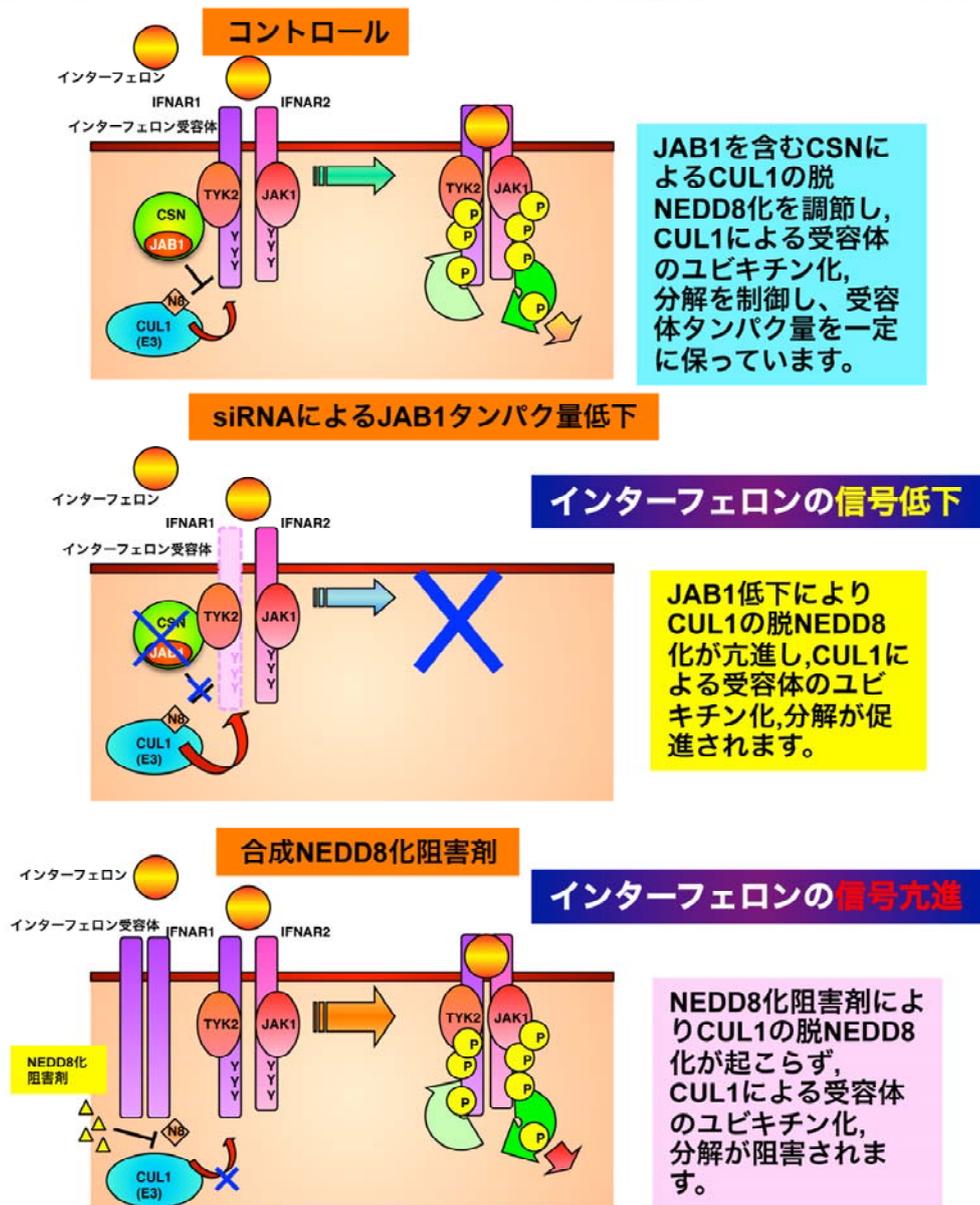
【参考図】

## 図1 インターフェロン(IFN)の信号伝達系



IFNの結合によってIFN受容体が活性化されると、受容体サブユニットが二量化し、関連するJAKが自己リン酸化により活性化し、さらに転写因子STATタンパク質(STAT1, STAT2)を活性化します。リン酸化に続いてSTATの二量体が活性化して核内に移動し、標的遺伝子を転写します。I型IFNはSTAT1とSTAT2, IRF9からなるISGF3複合体の形成も誘導し、ISGF3複合体はISRE (IFN-Stimulated Response Elements) に結合し、さらにIFN活性化遺伝子群(プロモーターにISREを含有)の転写を誘導します。

## 図2 JAB1/CSNを介したタンパク質の修飾（NEDD8化）による信号制御



### 【用語解説】

#### (1) JAK (Janus キナーゼ) ファミリー

ヒトの細胞質内に存在するタンパク質。サイトカイン受容体からの信号伝達に必要とされるリン酸化酵素。JAK1, JAK2, JAK2, TYK2 の4種類がある。

#### (2) TYK2

JAK ファミリーの一つ。インターフェロン受容体のサブユニットである IFNAR1 タンパクと結合しており、インターフェロン応答に関与するタンパク質。

### (3) 二量化

2 つの同種の分子やサブユニット(単量体)が物理的・化学的な力によって複合体となったものを二量体という。二量体を形成することを、二量化という。

### (4) ユビキチン

ヒト細胞内に存在するタンパク質。ユビキチンリガーゼなどの酵素の働きによりユビキチンタンパク質は基質タンパク質に付加される(ユビキチン化)。多くの場合、ユビキチン自身もユビキチン付加を受けて重合し、ポリユビキチン鎖を形成する。ポリユビキチン修飾されたタンパク質は、プロテアソームにより認識されタンパク質分解を受ける。

### (5) 酵母ツーハイブリッド法

細胞内におけるタンパク質 - タンパク質相互作用を調べる手法のひとつ。酵母細胞を使用する系として開発された方法。

### (6) 免疫沈降法

細胞内におけるタンパク質 - タンパク質相互作用を調べる手法のひとつ。

### (7) siRNA

特殊な二本鎖構造をした短い RNA。適切な塩基配列のものを選択して用いると、特定の RNA の機能を抑制することができ、これを用いてさまざまな遺伝子の機能を解析できる。

### (8) ウェスタンブロット法

抗原抗体反応の高い特異性を利用して、タンパク質混合物 から特定のタンパク質を検出する手法のひとつ。

### (9) ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼ遺伝子産物の発光を利用し、遺伝子の転写活性を制御するプロモーター活性を調べる手法。

### (10) Real-time PCR 法

DNA を増幅できる PCR 法を利用し、細胞や組織内における遺伝子発現を解析する手法。