

ユビキチン様分子 ISG15 による免疫反応制御

奥村文彦

ISG15 (interferon stimulated gene, 15 kDa) はインターフェロン刺激依存的に分子量約 17 kDa の前駆体として合成されるタンパク質である。ISG15 分子は二つのユビキチン様ドメインから構成されており、C 末端側の数個のアミノ酸 (ヒト ISG15 では 8 個) が取り除かれることで成熟型ユビキチンと同じアミノ酸配列 (-LRLRGG) を持ち、基質タンパク質に共有結合できる成熟型 ISG15 になる。タンパク質のユビキチン修飾は主にプロテアソーム依存的なタンパク質分解に寄与していることは広く知られているが、ISG15 修飾の生理的な役割は現在までのところあまり解明されていない。我々はメッセンジャー RNA のキャップ構造結合タンパク質である 4EHP (eIF4E homologous protein) が ISG15 修飾を受けることや、4EHP の ISG15 修飾がキャップ構造への結合を安定化させることを見出した。また、効率的な ISG15 修飾が起こるために ISG15 は一酸化窒素 (NO) による制御を受けていることも明らかにした。本稿においては、ISG15 における過去の知見と ISG15 修飾の機能に関する最近のトピックスを紹介する。

1. ISG15 の歴史

ISG15 は 1979 年に Farrell らにより発見された初めてのユビキチン様分子である。二つのユビキチン様ドメインからなっており (図 1A), 1984 年に Korant らにより、そのタンパク質発現がインターフェロン誘導性であることが示された。1988 年には、Knight らにより 165 アミノ酸からなる前駆体 ISG15 は、C 末端の 8 個のアミノ酸がプロセシングにより取り除かれ、成熟型 ISG15 となることが示された (図 1B)。その他にも、多くのユビキチン様分子は前駆体として合成された後、C 末端側の数残基がプロセシングを受けることで成熟型となることが知られている¹⁾。成熟型ユビキチンと ISG15 はまったく同じアミノ酸配列 (-LRLRGG) を C 末端に有する²⁾。また交差反応性により、

ISG15 は抗ユビキチン抗体によって認識されたことから、ubiquitin cross-reactive protein (UCPR) ともよばれる。2005 年には立体構造が明らかとなりアミノ末端側、カルボキシ末端側のそれぞれのユビキチン様ドメインがやはりユビキチンに似ていることが報告された³⁾。現在までのところ、ISG15 遺伝子は脊椎動物にのみ存在しており、進化的に新しい遺伝子であることが推測される。

2. ISG15 の発現制御

ISG15 のタンパク質発現は、A549 細胞をインターフェロン β 刺激後、約 2 時間で確認され、約 24 時間後に最大の発現量を示す⁴⁾。図 2 に示すように I 型インターフェロン受容体である IFNAR1/IFNAR2 ヘテロダイマーにインターフェロン α/β が結合することにより、Janus kinase 1 (Jak1), protein-tyrosine kinase 2 (Tyk2), インターフェロン受容体のチロシン残基のリン酸化が起こる。その後、signal transducers and activators of transcription (STAT) の Src ホモロジドドメインを介して STAT1/2 が受容体に結合する。STAT1/2 は Jak1 や Tyk2 によりリン酸化されヘテロダイマーを形成し、さらに IFN regulated factor (IRF) 9 と結合し、核内に移行する。この複合体 (ISGF3) はインター

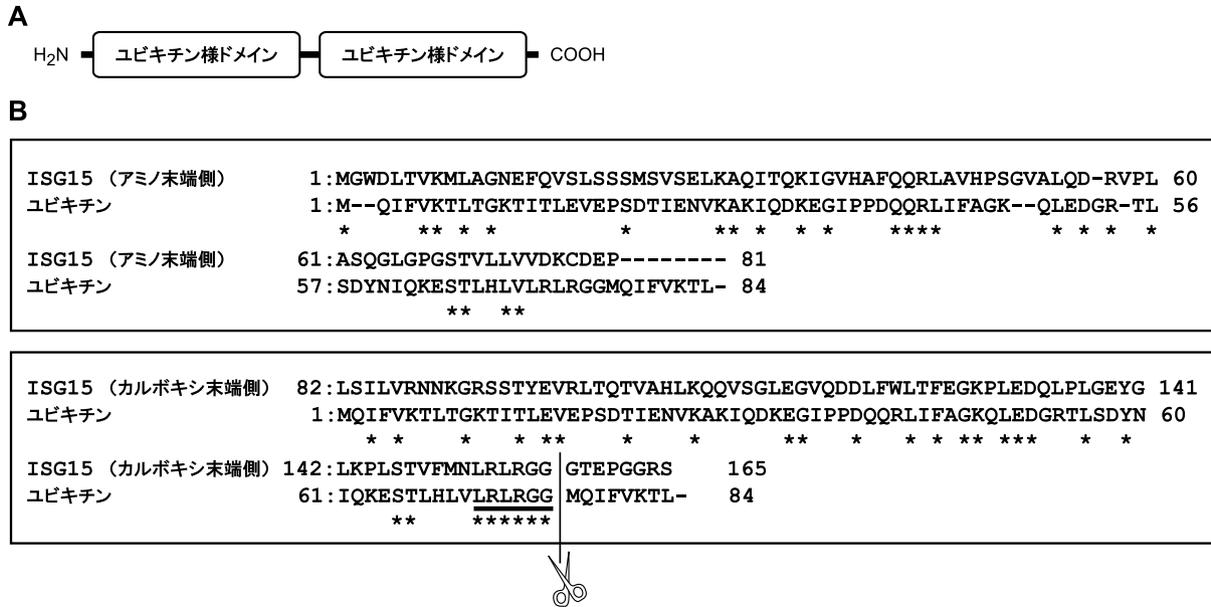


図1 ISG15 とユビキチンの相同性

A, ISG15 は二つのユビキチン様ドメインを持つ。B, ヒト ISG15 のアミノ末端側, カルボキシ末端側のそれぞれのユビキチン様ドメインとヒトのユビキチンの一次配列を比較した。*は保存されているアミノ酸を示している。ISG15 もユビキチンも前駆体として合成されたのち, 特異的酵素により切断されC末端側に-LRLRGG配列を持つ成熟型となる。

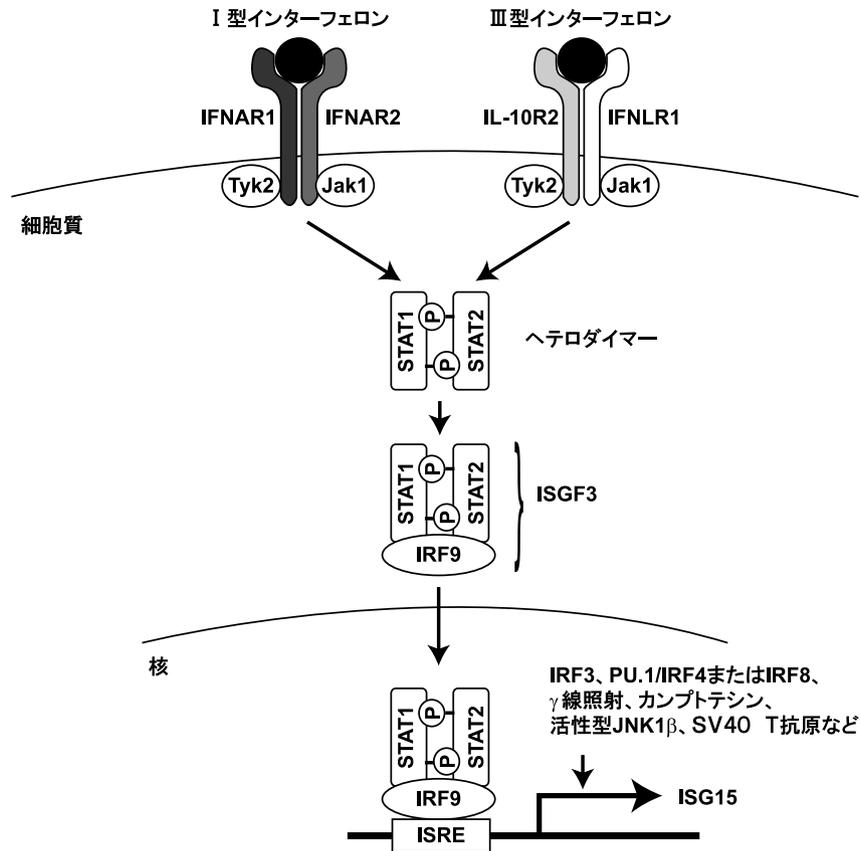


図2 インターフェロンなどによる ISG15 の発現誘導

フェロン誘導性分子の IFN-stimulated response element (ISRE) に結合し ISG15 の発現を制御する⁵⁻⁷⁾。その他にも、ISG15 遺伝子発現は IRF3 の制御も受けている⁸⁾。つまり、インターフェロンやウイルス感染などで IRF3 はリン酸化を受け核内に移行し ISG15 の転写を誘導する⁸⁾。ISG15 プロモーターは PU.1 結合領域も有する⁹⁾。PU.1 は Ets ファミリーに属する B 細胞、骨髄細胞特異的な転写因子である¹⁰⁻¹²⁾。PU.1 は、IRF4 あるいは IRF8 と協調して ISG15 の転写を亢進する。一方、IRF8 欠損マウスを使用した解析により、マクロファージに ISG15 分子の発現亢進が認められることが報告されている¹²⁾。

また、ISG15 は様々なストレスに応答して誘導される。細菌やウイルスの感染は、IRF3 と ISGF3 を活性化することで ISG15 の発現を誘導する¹³⁾。その他に γ 線照射¹⁴⁾、抗がん剤であるカンプトテシン¹⁵⁾、毛細血管拡張性失調症 (ataxia telangiectasia)¹⁶⁾、活性型 JNK1 β ¹⁷⁾ や SV40 T 抗原¹⁸⁾ の発現などにより、ISG15 の発現が誘導されることが知られている。

3. ISG15 修飾システム

これまでに 150 種を超えるタンパク質が ISG15 修飾を受けることが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。様々な分子の ISG15 修飾のメカニズムはユビキチン修飾メカニズムと酷似している。図 3 に示すようにユビキチンはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) という 3 種類の酵素による一連の触媒反応を経てさまざまな基質タンパク質の主にリジン残基に共有結合する²²⁾。

ISG15 修飾はユビキチン修飾とほぼ同様のシステムを用いて起こる。すなわち、ubiquitin activating enzyme E1-like (UBE1L)²³⁾、E2 (UbcH6 と UbcH8)²⁴⁻²⁶⁾、ISG15 リガーゼという 3 種類の酵素により触媒される²⁷⁾。またユビキチンがいくつも連なった「ポリユビキチン鎖」のような「ポリ ISG15 鎖」は現在報告されていない。

4. UBE1L

UBE1L はユビキチン E1 と約 45% の相同性を持ち、酵素としての活性中心であるシステインも保存されている²⁸⁾。酵母ツーハイブリッドシステムを用いて B 型インフルエンザウイルスの NS1B 分子が ISG15 と結合することが示されている²⁹⁾。NS1B は ISG15 と結合することにより、ISG15 が他の分子の翻訳後修飾に用いられることを抑制する²⁹⁾。UBE1L は ISG15 専用の活性化酵素であり、ユビキチン化特異的な活性化酵素 E1 は ISG15 修飾には用いられない²⁵⁾。UBE1L のプロモーター領域にも ISRE が存在しインターフェロン α あるいは β で発現が誘導される²⁵⁾。UBE1L は E1 と同じく ATP 結合ドメインを持ち、ATP の

エネルギーを用いて ISG15 とチオエステル結合を形成する。

5. E2

UBE1L により活性化された ISG15 は、UbcH6 あるいは UbcH8 に転移される。UbcH6/H8 はともに、インターフェロン α あるいは β により発現が誘導される分子である^{25,26)}。UbcH8 が最初に ISG15 結合酵素として同定されたので多くの場合 UbcH8 を用いて研究が行われているが、UbcH6/H8 ともに ISG15 とジスルフィド結合を形成し得る。一方、UbcH7 は一次構造上、最も UbcH8 に類似した E2 であるが ISG15 とジスルフィド結合を形成できず²⁴⁾、ISG15 修飾を亢進することもできない²⁵⁾。UbcH8 は、ユビキチンとも ISG15 ともジスルフィド結合を形成し得る²⁴⁾ことは、ユビキチンシステムと ISG15 システムが非常に密接に関係していることを想像させる。実際 ISG15 あるいは ISG15 修飾システムが、タンパク質のポリユビキチン化を阻害するという報告がある¹⁸⁾。しかしながら多くのデータはトランスフェクション実験に基づいており、また内在性 ISG15 に対して約 10% 程度の強制発現で約 90% 程度ポリユビキチン化が阻害されていることなどから、今後の詳細な検討が必要と思われる。さらに ISG15 システムによるユビキチンシステムの阻害効果の生理的役割は明らかになっておらず、さらなる解析が必要とされる。

6. ISG15 リガーゼ

基質タンパク質を認識している ISG15 リガーゼにより、UbcH6 あるいは UbcH8 にエステル結合した ISG15 は、基質タンパク質のリジン残基の ISG15 修飾に用いられる。UbcH6/H8 がユビキチンシステムと ISG15 システムの間の密接な関係の橋渡しをしていることから、UbcH6/H8 と結合するユビキチンリガーゼは ISG15 リガーゼとしても機能する可能性がある。ユビキチンリガーゼである double ring-finger protein (Dorfin)、E6AP、human homologue of *Drosophila* ariadne (HHARI)、UbcH7-associated protein 1 (H7-AP1)、Parkin などは UbcH6/H8 と結合できるため ISG15 リガーゼとしても機能する可能性がある³⁰⁻³⁴⁾。実際に ISG15 リガーゼとしても機能するユビキチンリガーゼとして estrogen-responsive finger protein (EFP)³⁵⁾、HECT and RCC1 domain protein 5 (Herc5)^{21,36,37)}、HHARI³⁸⁾ が報告されている。EFP は 14-3-3 σ に対する ISG15 リガーゼであり、HHARI は 4EHP に対する ISG15 リガーゼである (後述)。Herc5 は様々な基質分子の ISG15 修飾を著しく亢進する基質非特異的な ISG15 リガーゼとして機能するが、詳細な分子メカニズムは解明されていない。EFP と Herc5 はインターフェロン誘導性の分子である。ISG15 リガーゼは、ISG15 の C 末端の-LRLRGG モチーフのカルボキシル基と

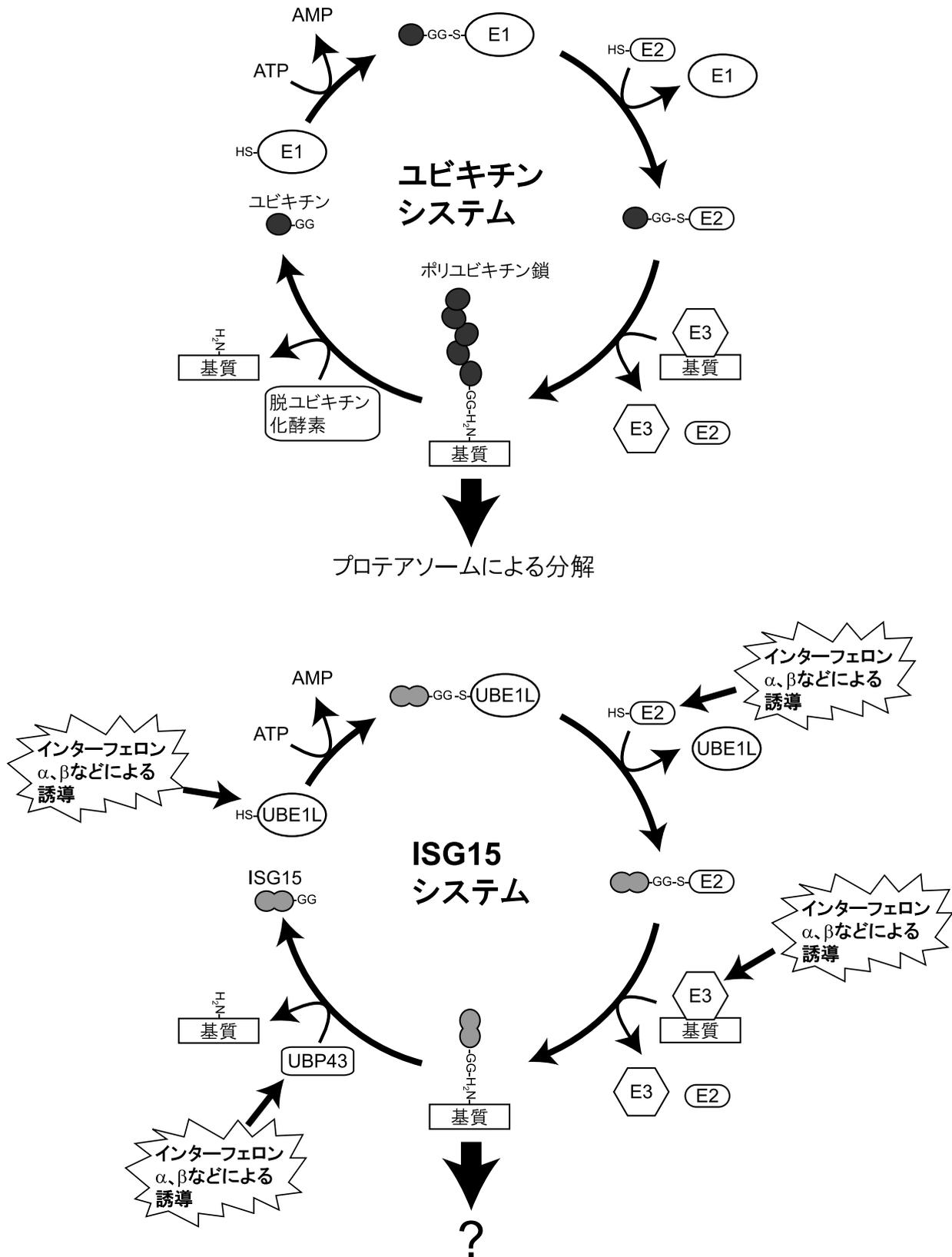


図3 ISG15 システムによるタンパク質の ISG15 修飾とユビキチンシステムによるユビキチン修飾の類似性

基質分子のリジン残基のε位のアミノ基との間の共有結合の形成を促進する。

これまで報告された ISG15 修飾を受ける基質タンパク質として Jak1, STAT1, phospholipase C (PLC)-γ1, extracellular regulated kinase (ERK) 1/2 などが報告されている³⁹⁾。特に Jak1, STAT1 は I 型インターフェロンや、様々なサイトカインによるシグナル伝達に重要な分子であり⁴⁰⁾、ISG15 修飾がそれらの機能制御に関与することが示唆されている。

7. UBP43

脱ユビキチン酵素が基質タンパク質からユビキチンを取り除くように、脱 ISG15 酵素が存在し ISG15 修飾を受けた基質タンパク質から ISG15 を取り除くことができる。この酵素は、UBP43 あるいは USP18 と呼ばれる^{41,42)}。UBP43 もインターフェロン誘導性のタンパク質である。先に述べたように ISG15 は前駆体として合成された後、C 末端の数個のアミノ酸が取り除かれ-LRLRGG の配列を C 末端側に持つ成熟型となるが、このプロセシング酵素として酵母の Ubp1 の ortholog が示唆されている⁴³⁾。UBP43 もプロセシング酵素の候補の一つであるが UBP43 欠損マウスが前駆体 ISG15 のプロセシングを起こすことから UBP43 は主要な酵素ではないと考えられている。

UBP43 欠損マウスは野生型マウスに比べて寿命が短く、約 20 週間目には死に至る⁴⁴⁾。その多くは脳細胞障害によるものと考えられており、ISG15 修飾が脳細胞のホメオスタシスに関与していることが示唆されている。UBP43 欠損細胞は野生型細胞に比べて ISG15 の発現、基質分子の ISG15 修飾、共に亢進している⁴⁴⁾。UBP43 欠損骨髄細胞をインターフェロンβで刺激すると約 70% の細胞がアポトーシスを起こす⁴⁵⁾。その原因として Jak-STAT 経路の持続的な活性化が示唆されている⁴⁵⁾。野生型骨髄細胞をインターフェロンβで刺激すると、1 時間後には STAT1 のリン酸化がみられるが、12 時間後にはほとんど確認できない。一方、UBP43 欠損骨髄細胞では 24 時間後でも STAT1 のリン酸化が確認でき、STAT1 のリン酸化は野生型よりも亢進している⁴⁵⁾。脱 ISG15 化に必要なシステイン残基を変異させた UBP43 (C61S) を UBS43 欠損細胞に発現させるとインターフェロン依存性の Jak1, Tyk2, STAT1 のリン酸化を抑制できることから Jak-STAT 経路の異常な亢進は UBP43 の脱 ISG15 化活性に依存しないことが報告されている⁴⁶⁾。実際には、UBP43 は Jak1 と Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 (IFNAR2) の間の相互作用を競合阻害する機能を有することが明らかとなっている⁴⁶⁾。

8. 翻訳後修飾としての役割

ISG15 は主に I 型インターフェロンにより誘導され、

様々なタンパク質が ISG15 修飾を受けるが、その生理的役割はほとんど明らかになっていない¹⁹⁻²¹⁾。ISG15 は通常発現が抑制されており、I 型インターフェロンで急速に発現が誘導されることから免疫システムにおいて重要な働きを担っていると考えられている。タンパク質の翻訳後修飾としては、ユビキチン化、リン酸化、SUMO 化、NEDD8 化、アセチル化、メチル化などが挙げられ、それぞれの修飾によって基質タンパク質は様々な機能制御を受けている。ISG15 はその発見後約 30 年が経とうとしているが、未だに機能未知の翻訳後修飾として扱われている。ISG15 修飾を受ける基質タンパク質候補群が網羅的に同定されているが¹⁹⁻²¹⁾、それぞれの基質分子に対する個々の研究は進んでおらず ISG15 修飾がある程度共通の役割を担っているのか、それとも多種多様な役割を担っているのか判明していない。ISG15 は基質タンパク質への翻訳後修飾に用いられるだけではなく、単体としても存在しえることから様々な可能性を秘めている。

ISG15 欠損マウスはインフルエンザ A/WSN/33、インフルエンザ B/Lee/40 ウイルス、1 型単純ヘルペスウイルス、マウスγヘルペスウイルス 68、Sindbis ウイルスに対する抵抗性が野生型に比べて低下している⁴⁷⁾。特に Sindbis ウイルスに対する抵抗性は野生型 ISG15 (C 末端配列が LRLRGG) の強制発現によって回復したが、基質タンパク質に修飾できない変異体 ISG15 (C 末端配列が LRLRAA) では回復しなかった⁴⁷⁾。これらの結果は、何らかの基質タンパク質の ISG15 修飾が抗 Sindbis ウイルス活性に重要であることを示唆しているが、未だその基質タンパク質は同定されていない。しかしながら、この知見は、ISG15 修飾システムが免疫システムの調節系であることを示す上で非常に重要と思われる。

9. 翻訳後修飾以外の役割

1991 年に ISG15 が細胞外に分泌されることが報告された⁴⁸⁾。リンパ球や単球はインターフェロンβ刺激によって ISG15 を細胞外に分泌し、24 時間後には約 50% の ISG15 が細胞外に存在することが報告されている⁴⁸⁾。ヒト単球細胞株 THP-1 も同様にインターフェロンβ刺激により ISG15 を分泌する。THP-1 細胞株以外にも様々な細胞株が ISG15 を分泌することが報告されている。B 細胞株 (Burkitt's lymphoma, Raji 細胞株)、T 細胞株 (Jurkat 細胞株)、肺がん細胞株 (A549 細胞株)、卵巣腺がん細胞株 (OVCAR-3 細胞株) などが、ISG15 を分泌することが知られている⁴⁹⁾。またマクロファージ細胞株 (RAW264.7 細胞株) は大腸菌成分であるリポポリ多糖体 (LPS) 刺激により ISG15 を発現し、細胞外に分泌する²⁷⁾。健康人にインターフェロンβを投与するとその投与量依存的に、血清中に分泌された ISG15 が確認された⁴⁹⁾。ISG15 はウシの子

宮内膜からも分泌されることが報告されている⁵⁰。妊娠後18日以降にはその分泌が確認され、妊娠していないウシではISG15の分泌は確認されなかった。

ISG15は分泌タンパク質に特徴的なシグナル配列がなく、他のサイトカインとも一次構造上類似しない。従って、ISG15は本当に細胞から生理的に分泌されているのか明らかではないが、新規のメカニズムにより分泌されているのか、アポトーシスなどで死滅した細胞などから漏れ出ているのか、今後検討する必要がある。

大腸菌を用いて合成したISG15をCD3⁺細胞培養液に加えるとCD3⁺細胞から産生されるIFN γ が増加する^{51,52}。リコンビナントISG15はnatural killer (NK) 細胞の増殖を亢進し細胞障害活性も増加させるが、interleukin-2やinterleukin-12の産生増加はみられない⁵¹。また、プロセシングを受けた成熟型ISG15は細胞外へと放出されるが未成熟ISG15は放出されない⁴⁹。細胞外に放出されたISG15は好中球に対する走化性因子として機能することが報告されているが、ISG15に対する受容体が存在するのかということに関しては未だ明らかになっていない⁵³。しかしながら、これらの報告はISG15が細胞外でサイトカイン様の役割を担っている可能性を示唆している。

ISG15はHECT型ユビキチンリガーゼNedd4とUbcH6との結合を阻害することでNedd4の機能を抑制する^{54,55}。Nedd4のユビキチンリガーゼ活性が抑制されるとエボラウイルスのマトリックスタンパク質であるVP40のユビキチン修飾が抑制されvirus-like particle (VLP)の産生が阻害される^{54,55}。NEDL1, NEDL2, WWP2もNedd4と同様にVLPの産生を亢進するが、ISG15の存在下ではその効果は著しく減少する⁵⁴。またISG15はHIVの複製を抑制することも報告されている⁵⁶。

10. 4EHPはISG15修飾によりキャップ構造結合活性が増大する

当初ISG15リガーゼに関する情報がほとんどなかったので、我々はまずISG15リガーゼの同定を試みた。先に述べたようにISG15修飾に必要な酵素であるE2(当時はUbcH8のみ知られていた)はユビキチン修飾にも用いられる。従って、UbcH8に結合することが知られていたHHARIとその基質であるメッセンジャーRNAキャップ構造結合分子eIF4E homologous protein (4EHP)に着目した⁵⁷。ヒトのメッセンジャーRNAキャップ構造結合タンパク質は現在3種類のファミリーが報告されている。eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-1, 2, 3の3種類が存在し、それぞれキャップ構造に結合することができる⁵⁸。多くの場合、タンパク質翻訳はeIF4E-1に依存していると考えられている。eIF4E-2は4EHPとも呼ばれる。図6に示すように、eIF4E-1とeIF4Gの結合はタンパク質

翻訳過程において非常に重要なステップである。eIF4Gはpoly-A binding protein (PABP)と結合し、メッセンジャーRNAはキャップ構造に結合したeIF4E-1, ポリAテールに結合したPABP, その両方に結合するeIF4Gにより環状構造をとる。メッセンジャーRNAのこのような環状化はタンパク質翻訳開始に重要であることが示唆されている。一方、eIF4E-3に関してはほとんど解析が進んでいない。3種類のeIF4Eのうち4EHPのみeIF4Gと結合できないため、上記のようなメッセンジャーRNAの環状化が起こらないことから、4EHPの生理的な役割は不明であった。2005年Choらにより、ショウジョウバエの4EHPはBicoidと呼ばれるRNA結合分子と結合し、選択的にCaudalのタンパク質翻訳を抑制していることが示された⁵⁹。BicoidはeIF4Gのような役割を担いメッセンジャーRNAの非翻訳領域に存在するBicoid binding region (BBR)に結合し、メッセンジャーRNAの環状化を引き起こす。従って、eIF4E-1を含むタンパク質翻訳開始複合体がキャップ構造に結合できないためにCaudalのタンパク質翻訳が選択的に阻害される。彼らの提唱するモデルをもとに我々は

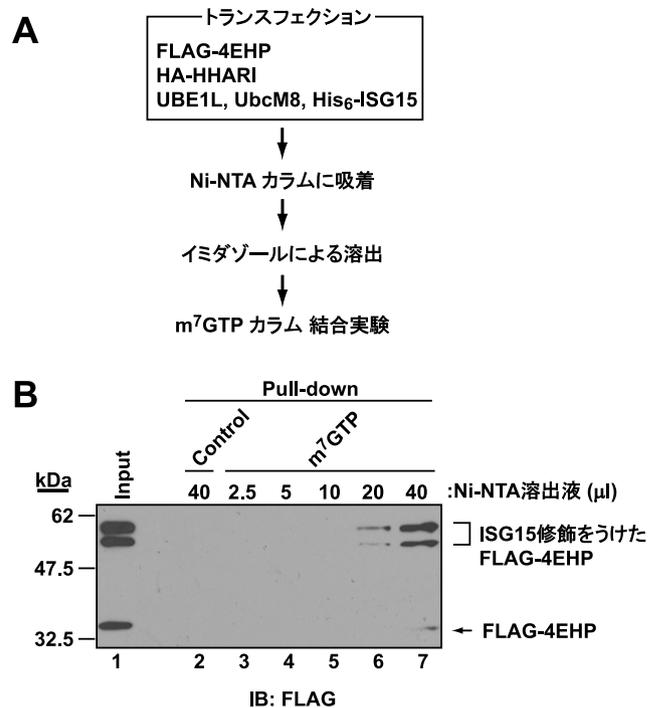


図4 4EHPはISG15修飾を受けると安定にキャップ構造に結合する

A, 293T細胞に図に示す分子を発現させ、Ni-NTAカラムでHis₆-ISG15修飾を受けた分子を精製し、キャップ構造を模したカラム(m⁷GTPカラム)によりFLAG-4EHPのキャップ構造結合活性を検討した。B, 未修飾の4EHPとISG15修飾を受けた4EHPをほぼ等量含む粗精製画分(input)をm⁷GTPカラムで精製するとISG15修飾を受けた4EHPが優位に得られた。すなわち4EHPのISG15修飾はキャップ構造結合活性を増強することが示された。

以下の実験を進めた。

HHARIがUbcH8に結合できることから³⁴⁾、ISG15リガーゼとしても機能する可能性を検討した結果、4EHPはHHARI依存的にISG15修飾を受けることが明らかとなった³⁸⁾。内在性の4EHPはインターフェロン α 刺激によりISG15修飾を受け、質量分析を用いた解析によりその修飾部位は134番目、あるいは222番目のリジン残基であることが判明した。おそらく立体構造上の位置関係のため二つのリジン残基が同時にISG15修飾を受けることはなく、どちらか一方のリジン残基のみISG15修飾を受けることがわかった。次に、4EHPはキャップ構造結合タンパク質であるので、4EHPのISG15修飾がキャップ構造結合にどのように影響を与えるかを検討した。その結果、ISG15修飾を受けた4EHPは未修飾のものに比べて、非常に安定にキャップ構造に結合することが判明した(図4)。このことは4EHPとISG15の融合タンパク質を用いた実験からも証明された(図5)。特にC末端側にISG15を融合させた4EHP-ISG15は、4EHPよりも約20倍安定してキャップ構造に結合した。さらに、ヒト4EHPが標的とするメッセンジャーRNAが不明であったためショウジョウバエのモデ

ルを用いてさらに検討することを試みた(図6)。幸運なことにヒトの4EHPがショウジョウバエのBicoidに結合することが分かったのでChoらの*in vitro*のアッセイシステムを用いてタンパク質翻訳に対するISG15修飾の効果を解析した。ショウジョウバエの4EHPの代わりにヒトの4EHPを用いた場合でもショウジョウバエCaudalのタンパク質翻訳を約25%抑制した³⁸⁾。4EHP-ISG15融合タンパク質を用いた場合、約50%翻訳抑制することがわかった³⁸⁾。4EHPや4EHP-ISG15融合タンパク質を293T細胞に過剰発現させても一般的なタンパク質翻訳は影響を受けなかったため、やはりショウジョウバエのようにある特異的なメッセンジャーRNAのタンパク質翻訳を抑制していると考えている。今後の課題としてはBicoidに相当する分子を同定すること、また標的となるメッセンジャーRNAを同定することが挙げられる(図6)。

11. ISG15のニトロ化

既に紹介したように150を超える分子がISG15修飾を受けることが示されている。すなわち、ISG15修飾が様々な機能に影響を与える可能性を示唆している。ISG15が免

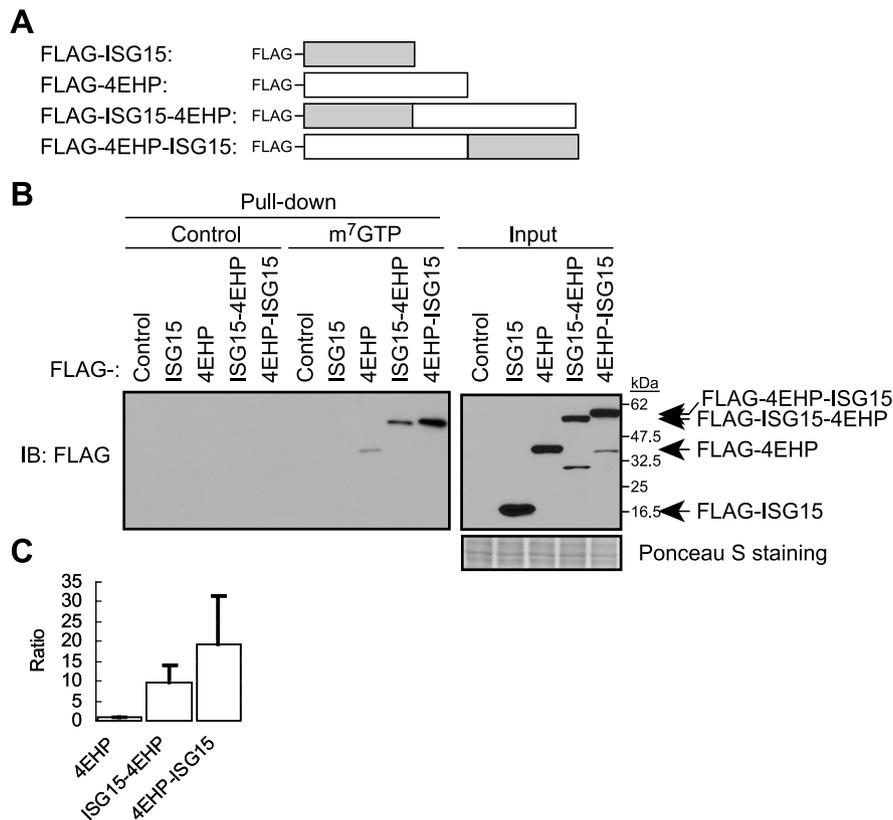


図5 4EHPとISG15の融合タンパク質は4EHPよりも安定にキャップ構造に結合する。A, 実験に用いたISG15, 4EHPと融合タンパク質。B, Aに示したそれぞれの分子を用いてキャップ構造結合活性を検討した。C, 3回繰り返したBの定量データ。FLAG-4EHP-ISG15が最も安定にキャップ構造に結合した(4EHPのキャップ構造結合量を1とした)。

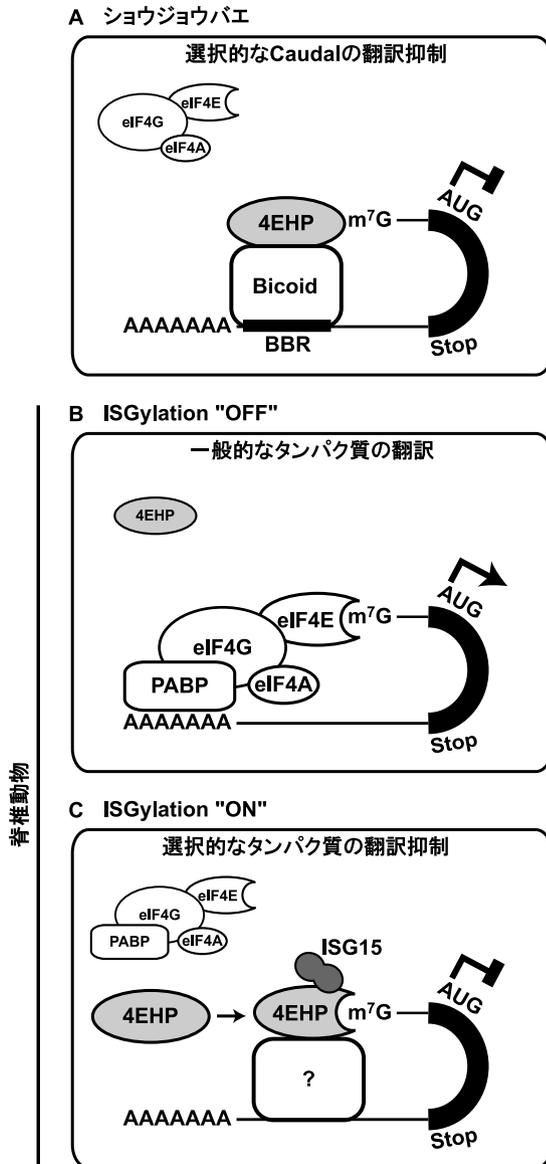


図6 4EHP 依存的な選択的タンパク質翻訳抑制

A, ショウジョウバエの4EHPとBicoidは選択的にCaudal分子のタンパク質翻訳を抑制する。B, 脊椎動物の4EHPはキャップ構造結合力がeIF4E1に比べて約100-200倍程度弱いためタンパク質翻訳を抑制しない。C, ISG15修飾システムが誘導されると4EHPはISG15修飾を受け、未修飾の4EHPよりも安定にキャップ構造に結合し、特定のタンパク質翻訳を抑制すると予想される。標的メッセンジャーRNA, Bicoidに相当する分子は未だ同定されていない。

疫反応の初期応答に重要であることが示唆されていることから、効果的なISG15修飾もまた免疫システムに重要であることが想像される。高濃度のISG15は二量体を形成しやすく⁶⁰, ISG15がシステイン残基を有していることからジスルフィド結合による二量体形成が起きているのではないかと考えた。システインをセリンに変異させたISG15を用いて検討した結果、ジスルフィド結合を介した二量体が形成されていることが判明した⁶¹。また、ISG15と類似の環境下で誘導される分子の一つにinducible nitric oxide synthase (iNOS)が知られている。iNOSはNOを合成し様々なタンパク質の主にシステイン残基のニトロ化に寄与している。タンパク質のニトロ化は非常に重要な翻訳後修飾の一つであり、タンパク質-タンパク質相互作用や酵素活性などに影響を与えることが多数報告されている⁶²。ISG15の二量体形成もタンパク質のニトロ化も共にシステイン残基が用いられていることから、我々はISG15のシステイン残基のニトロ化が二量体形成を阻害し、ISG15単体を増加させることで効果的なISG15修飾に貢献している可能性を検討した。その結果、ISG15のシステイン残基はニトロ化を受けることが分かり、iNOSの発現によりISG15修飾の効率が增大することが分かった⁶¹。また、NOS活性をS-ethylisothiourrea (ETU)で阻害すると内在性のISG15修飾は減少した。ISG15は二量体を形成するがiNOSを発現させるとISG15同士の相互作用が抑制された⁶¹。このことは、iNOS, NO, システイン残基のニトロ化の少なくとも一つ、あるいは二つ以上が共同して、ISG15のジスルフィド結合による二量体形成を阻止していることを示唆している。以上より、ISG15のニトロ化はISG15の二量体形成を抑制しISG15単体を増加させ効果的なISG15修飾に寄与していることが判明した(図7)⁶¹。

12. 謎の分子 ISG15

ISG15修飾の生理的な役割は不明なところが多く、ISG15修飾自体もニトロ化を含む様々な制御を受けている可能性がある。ISG15は最初に発見されたユビキチン様分子であるが、その解析は他のユビキチン様分子に比べて非常に遅

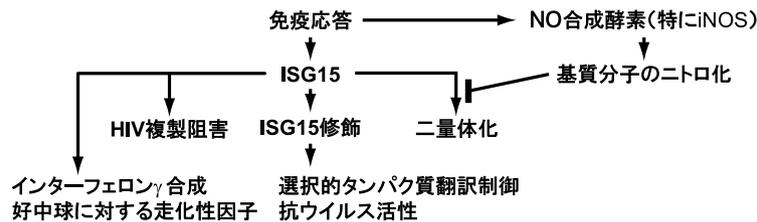


図7 ISG15のニトロ化は二量体形成を阻害しISG15の機能を制御する

ニトロ化によりISG15の二量体形成は阻害され、単体のISG15が増加する。このことは効果的なISG15修飾を介してタンパク質の選択的翻訳抑制や抗ウイルス活性に貢献するものと思われる。また、単体のISG15が増加することでHIVの複製阻害やインターフェロン γ 合成、好中球に対する走化性などに影響を及ぼす可能性がある。

れており、生理的に重要な分子であるのかどうかも意見が分かっている。ISG15の解析が進まない一つの理由として、ISG15修飾率の低さが挙げられる。これまでに調べられた限りにおいて基質タンパク質の数パーセント程度しかISG15修飾を受けておらず、大部分の基質は未修飾のまま存在する。ISG15修飾を受けた微量の基質タンパク質を単離精製し解析することはきわめて困難である。また、*in vitro*でISG15修飾を起こす手法がユビキチンのように確立していないことも今後の課題として挙げられる。

ISG15修飾酵素群 (ISG15, UBE1L, UbcH6, UbcH8など)と脱ISG15修飾酵素UBP43はインターフェロン誘導性タンパク質であり、その発現は厳密に制御されている。このことは、やはりISG15修飾システムの免疫システムにおける重要性を想像させる。今後、ISG15の生化学的解析のみならず、複雑な制御系である免疫システムを理解する上でISG15の機能に関する研究の進展は非常に重要であると思われる。

文 献

- Jentsch, S. & Pyrowolakis, G. (2000) *Trends Cell Biol.*, **10**, 335-342.
- Knight, E., Jr., Fahey, D., Cordova, B., Hillman, M., Kutny, R., Reich, N., & Blomstrom, D. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 4520-4522.
- Narasimhan, J., Wang, M., Fu, Z., Klein, J.M., Haas, A.L., & Kim, J.J. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 27356-27365.
- Loeb, K.R. & Haas, A.L. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 7806-7813.
- Wesoly, J., Szweykowska-Kulinska, Z., & Bluysen, H.A. (2007) *Acta Biochim. Pol.*, **54**, 27-38.
- Kessler, D.S., Levy, D.E., & Darnell, J.E., Jr. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 8521-8525.
- Sadler, A.J. & Williams, B.R. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 559-568.
- Au, W.C., Moore, P.A., Lowther, W., Juang, Y.T., & Pitha, P. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 11657-11661.
- Meraro, D., Gleit-Kielmanowicz, M., Hauser, H., & Levi, B.Z. (2002) *J. Immunol.*, **168**, 6224-6231.
- Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., & Zhang, D.E. (1997) *Blood*, **90**, 489-519.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G. E., Paige, C.J., & Maki, R.A. (1996) *EMBO. J.*, **15**, 5647-5658.
- Rosenbauer, F., Waring, J.F., Foerster, J., Wietstruk, M., Philipp, D., & Horak, I. (1999) *Blood*, **94**, 4274-4281.
- Nicholl, M.J., Robinson, L.H., & Preston, C.M. (2000) *J. Gen. Virol.*, **81**, 2215-2218.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B. (1997) *Mol. Cell*, **1**, 3-11.
- Desai, S.D., Mao, Y., Sun, M., Li, T.K., Wu, J., & Liu, L.F. (2000) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **922**, 306-308.
- Siddoo-Atwal, C., Haas, A.L., & Rosin, M.P. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 443-447.
- Han, S.Y., Kim, S.H., & Heasley, L.E. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 47167-47174.
- Desai, S.D., Haas, A.L., Wood, L.M., Tsai, Y.C., Pestka, S., Rubin, E.H., Saleem, A., Nur, E.K.A., & Liu, L.F. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 921-928.
- Zhao, C., Denison, C., Huijbregtse, J.M., Gygi, S., & Krug, R. M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 10200-10205.
- Giannakopoulos, N.V., Luo, J.K., Papov, V., Zou, W., Lenschow, D.J., Jacobs, B.S., Borden, E.C., Li, J., Virgin, H.W., & Zhang, D.E. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **336**, 496-506.
- Takeuchi, T., Inoue, S., & Yokosawa, H. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 473-477.
- Pickart, C.M. & Eddins, M.J. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 55-72.
- Pitha-Rowe, I., Hassel, B.A., & Dmitrovsky, E. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18178-18187.
- Zhao, C., Beaudenon, S.L., Kelley, M.L., Waddell, M.B., Yuan, W., Schulman, B.A., Huijbregtse, J.M., & Krug, R.M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7578-7582.
- Kim, K.I., Giannakopoulos, N.V., Virgin, H.W., & Zhang, D.E. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9592-9600.
- Takeuchi, T., Iwahara, S., Saeki, Y., Sasajima, H., & Yokosawa, H. (2005) *J. Biochem.*, (Tokyo) **138**, 711-719.
- Dao, C.T. & Zhang, D.E. (2005) *Front. Biosci.*, **10**, 2701-2722.
- Kok, K., Hofstra, R., Pilz, A., van den Berg, A., Terpstra, P., Buys, C.H., & Carritt, B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 6071-6075.
- Yuan, W. & Krug, R.M. (2001) *EMBO. J.*, **20**, 362-371.
- Kumar, S., Kao, W.H., & Howley, P.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 13548-13554.
- Chin, L.S., Vavalle, J.P., & Li, L. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 35071-35079.
- Tanaka, K., Suzuki, T., Chiba, T., Shimura, H., Hattori, N., & Mizuno, Y. (2001) *J. Mol. Med.*, **79**, 482-494.
- Niwa, J., Ishigaki, S., Doyu, M., Suzuki, T., Tanaka, K., & Sobue, G. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 706-713.
- Moynihan, T.P., Ardley, H.C., Nuber, U., Rose, S.A., Jones, P. F., Markham, A.F., Scheffner, M., & Robinson, P.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 30963-30968.
- Zou, W. & Zhang, D.E. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 3989-3994.
- Wong, J.J., Pung, Y.F., Sze, N.S., & Chin, K.C. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 10735-10740.
- Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R.M., & Huijbregtse, J.M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 4334-4338.
- Okumura, F., Zou, W., & Zhang, D.E. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 255-260.
- Malakhov, M.P., Kim, K.I., Malakhova, O.A., Jacobs, B.S., Borden, E.C., & Zhang, D.E. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 16608-16613.
- Aaronson, D.S. & Horvath, C.M. (2002) *Science*, **296**, 1653-1655.
- Liu, L.Q., Ilaria, R., Jr., Kingsley, P.D., Iwama, A., van Etten, R.A., Palis, J., & Zhang, D.E. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 3029-3038.
- Schwer, H., Liu, L.Q., Zhou, L., Little, M.T., Pan, Z., Hetherington, C.J., & Zhang, D.E. (2000) *Genomics*, **65**, 44-52.
- Potter, J.L., Narasimhan, J., Mende-Mueller, L., & Haas, A.L.

- (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 25061–25068.
- 44) Ritchie, K.J., Malakhov, M.P., Hetherington, C.J., Zhou, L., Little, M.T., Malakhova, O.A., Sipe, J.C., Orkin, S.H., & Zhang, D.E. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 2207–2212.
- 45) Malakhova, O.A., Yan, M., Malakhov, M.P., Yuan, Y., Ritchie, K.J., Kim, K.I., Peterson, L.F., Shuai, K., & Zhang, D.E. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 455–460.
- 46) Malakhova, O.A., Kim, K.I., Luo, J.K., Zou, W., Kumar, K.G., Fuchs, S.Y., Shuai, K., & Zhang, D.E. (2006) *EMBO J.*, **25**, 2358–2367.
- 47) Lenschow, D.J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R.E., Garcia-Sastre, A., Leib, D.A., Pekosz, A., Knobloch, K.P., Horak, I., & Virgin, H.W.t. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 1371–1376.
- 48) Knight, E., Jr. & Cordova, B. (1991) *J. Immunol.*, **146**, 2280–2284.
- 49) D’Cunha, J., Ramanujam, S., Wagner, R.J., Witt, P.L., Knight, E., Jr., & Borden, E.C. (1996) *J. Immunol.*, **157**, 4100–4108.
- 50) Austin, K.J., Ward, S.K., Teixeira, M.G., Dean, V.C., Moore, D.W., & Hansen, T.R. (1996) *Biol. Reprod.*, **54**, 600–606.
- 51) D’Cunha, J., Knight, E., Jr., Haas, A.L., Truitt, R.L., & Borden, E.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 211–215.
- 52) Recht, M., Borden, E.C., & Knight, E., Jr. (1991) *J. Immunol.*, **147**, 2617–2623.
- 53) Owhashi, M., Taoka, Y., Ishii, K., Nakazawa, S., Uemura, H., & Kambara, H. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **309**, 533–539.
- 54) Malakhova, O.A. & Zhang, D.E. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 8783–8787.
- 55) Okumura, A., Pitha, P.M., & Harty, R.N. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 3974–3979.
- 56) Okumura, A., Lu, G., Pitha-Rowe, I., & Pitha, P.M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 1440–1445.
- 57) Tan, N.G., Ardley, H.C., Scott, G.B., Rose, S.A., Markham, A. F., & Robinson, P.A. (2003) *FEBS. Lett.*, **554**, 501–504.
- 58) Joshi, B., Cameron, A., & Jagus, R. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2189–2203.
- 59) Cho, P.F., Poulin, F., Cho-Park, Y.A., Cho-Park, I.B., Chicoine, J.D., Lasko, P., & Sonenberg, N. (2005) *Cell*, **121**, 411–423.
- 60) Sorensen, C.M., Rempel, L.A., Nelson, S.R., Francis, B.R., Perry, D.J., Lewis, R.V., Haas, A.L., & Hansen, T.R. (2007) *Biochemistry*, **46**, 772–780.
- 61) Okumura, F., Lenschow, D.J., & Zhang, D.E. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 24484–24488.
- 62) Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., & Stamler, J.S. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 150–166.
-