

- 11) Steinbacher, S., Kaiser, J., Gerhardt, S., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., & Rohdich, F. (2003) *J. Mol. Biol.*, **329**, 973–982.
- 12) de Ruyck, J., Rothman, S.C., Poulter, C.D., & Wouters, J. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1515–1518.
- 13) Unno, H., Yamashita, S., Ikeda, Y., Sekiguchi, S., Yoshida, N., Yoshimura, T., Kusunoki, M., Nakayama, T., Nishino, T., & Hemmi, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 9160–9167.
- 14) Maclean, J. & Ali, S. (2003) *Structure*, **11**, 1499–1511.
- 15) Edmondson, D.E., Mattevi, A., Binda, C., Li, M., & Hubalek, F. (2004) *Curr. Med. Chem.*, **11**, 1983–1993.

邊見 久

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

A unique flavoenzyme: type 2 isopentenyl diphosphate isomerase

Hisashi Hemmi (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan)

RIG-I 様受容体シグナルの負の制御

1. はじめに

ウイルス等の病原体に対する感染防御機構の第一段階として、病原体由来構造物 (pathogen associated molecular patterns: PAMPs) を異物として認識することが必須である。それらを検知する受容体として Toll 様受容体 (TLR), RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptor: RLR), NOD 様受容体 (NLR) ファミリーなどの多くのタイプの受容体が同定されている^{1,2)}。いずれのタイプの受容体においても PAMPs の検知がサイトカイン等の分泌/危険信号, 病原体の駆逐につながり, 我々を感染症からまもっている。その一方, サイトカイン分泌の制御にブレーキがかからない状態に陥るとショック, 慢性的な細胞毒性, 自己免疫疾患に陥ることも示されており, 不必要となったサイトカイン分泌は速やかに中断されなければならない³⁾。2004年に同定された RNA ウイルス由来の RNA 細胞内受容体である RIG-I の発見以来⁴⁾, その RNA 認識から 1 型インターフェロンの産生までのシグナリングに関わる因子, 特に活性化に関わる因子の同定とそのメカニズムの解明は飛躍的に進んでいる。一方それと同時にそのブレーキをかける負の制御因子においても近年その同定が進んでいる⁵⁾。

本ミニレビューでは RLR の負の制御因子, 特に最近注

目され, 多くの負の制御因子が同定されているユビキチン化に関わる制御を中心に述べてみたい。

2. RLR によるウイルス, RNA の認識

RLR ファミリーは, DExD/H box RNA ヘリカーゼである RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1), MDA5 (melanoma differentiated-associated gene-5), LGP2 (laboratory of genetics and physiology-2) の三つからなっており (図 1A), 細胞内で二本鎖 RNA ウイルス由来のゲノミック RNA, 一本鎖 RNA ウイルス由来の複製の中間体として産生される二本鎖 RNA を結合する。共通の構造として, DExD/H box RNA ヘリカーゼドメインと C 末端側に存在する RNA 結合に重要な C 末端ドメイン (CTD) があげられる^{1,2)}。RIG-I, MDA5 の N 末端側には IPS-1 (interferon positive stimulator-1) の活性化に必要なドメインである二つの CARD ドメイン (caspase activation and recruitment domain) が存在するのに対し, LGP2 には存在しないことから, LGP2 は RIG-I, MDA5 の負の制御因子と考えられていた⁵⁾。ところがその後の研究により正の制御因子であることが明らかになった^{6,7)}。それぞれの RLR はウイルスの種類によってその仕事分類されている。RIG-I はセンダイ, インフルエンザウイルスなどの認識, MDA5 はピコナウイルスの認識に必須である¹⁾。LGP2 は RIG-I, MDA5 による認識を助けていると考えられている。

3. RLR シグナリング

シグナルの第一ステップとして, RIG-I がウイルス由来の RNA を CTD により認識すると立体構造の変化を起こし, 活性化ドメインである N 末端の CARD ドメインが IPS-1 にアクセスしやすい状態になると考えられている。その後ユビキチンリガーゼである TRIM25, Ripet がユビキチンの Lys63 がアミド結合する (K63) 結合様式で CARD ドメインをユビキチン化し^{1,2)}, それがミトコンドリアアダプタータンパク質である IPS-1 との結合を誘導する。さらに E3 ユビキチンリガーゼ TRAF3, アダプタータンパク質 TRADD, STING (stimulator of interferon genes) が IPS-1 と結合し, FADD, RIP, カスパーゼ 8/10 との複合体を形成し, 下流のリン酸化酵素である TBK1, IKKi の活性化により, 1 型 IFN プロモーターを誘導する転写因子群 NF- κ B, IRF-3, IRF-7 の活性化につながり, インターフェロンの発現を誘導する^{1,2)} (図 1B)。

以上の活性化シグナルをふまえ, RLR の負の制御因子について以下に紹介したい。

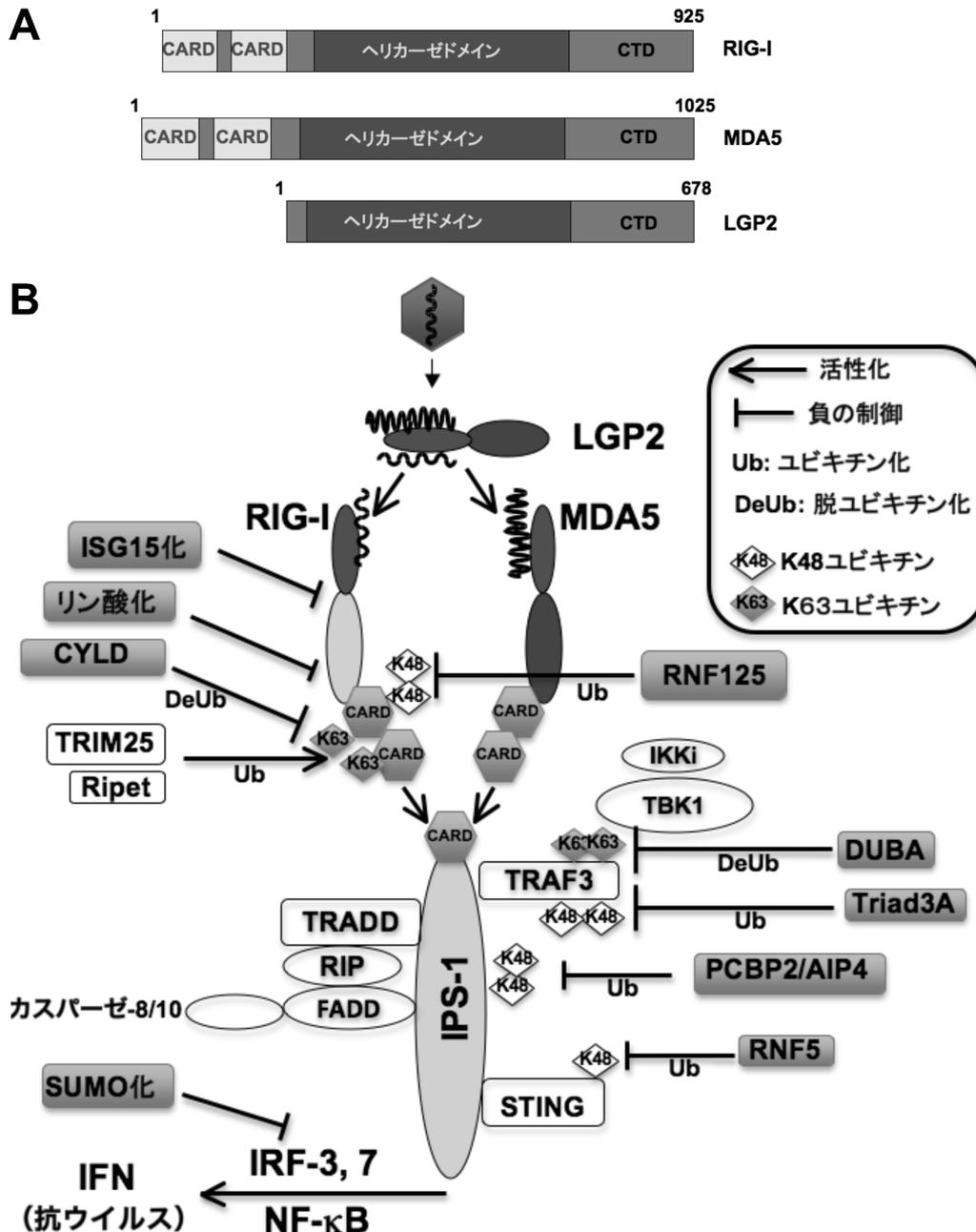


図1 RLRファミリータンパク質の構造とその活性化シグナルと負の制御シグナリング

A, RLRファミリータンパク質の構造

B, ウイルスRNAの存在をRLRが検知することによって抗ウイルスの活性化シグナルが作動する。主要なイベントとしてRIG-IのK63様式のユビキチン化、IPS-1との結合、IRF-3, 7の活性化、1型インターフェロンの産生があげられる。ウイルスが存在しない場合、ウイルス感染後のインターフェロンが不必要な状況においては負の制御因子が作用し、シグナルのブレーキ役、監視役を担っている。

4. RLRの負の制御 (図1B)

4-1 脱ユビキチン化を介した制御

CYLD—筆者をふくむ二つのグループから、がん抑制遺伝子であり DUB (deubiquitinase) ファミリータンパク質である CYLD (cylindromatosis) が RIG-I の負の制御因子であることが報告されている^{8,9)}。TRIM25 によって K63 様式ユビキチン化された RIG-I の CARD ドメインに CYLD が結合し、脱ユビキチン化することによって RIG-I を不活性化する (図2)。培養細胞系での CYLD siRNA によるノックダウン実験では、センダイウイルスによる IFN β 誘導が増大し、CYLD 欠損繊維芽細胞、樹状細胞で恒常的な

TBK1, IKKi の活性化がみられる。また RIG-I のユビキチン化の蓄積が起き、このことはユビキチン化-脱ユビキチン化のサイクルにおいて、定常状態では脱ユビキチン化の方が優勢に働いていることを示唆する。内在性 CYLD レベルはウイルス感染後減少することがみられる。以上のことから、CYLD は定常状態と活性化状態両方における負の制御因子であることが考えられる。

DUBA—DUBA (deubiquitinase A) は DUB ファミリーの siRNA を用いたスクリーニングにより抗ウイルスシグナリングの負の制御因子として同定された¹⁰⁾。siRNA による DUBA のノックダウン培養細胞系においては TLR3, 4, 7, RIG-I, MDA5 を介した 1 型インターフェロンの誘導が

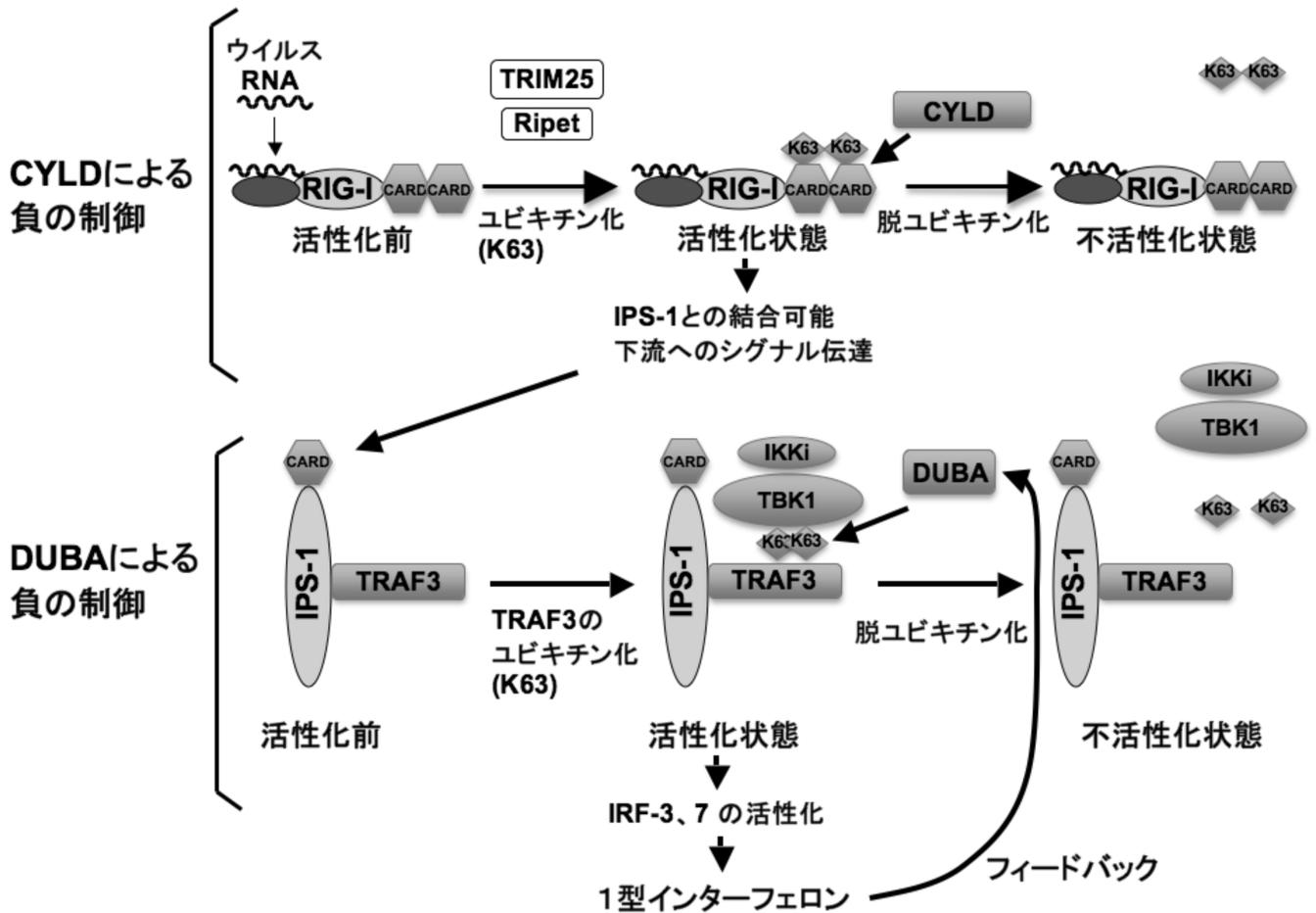


図2 CYLD, DUBA による抗ウイルスシグナルの負の制御

ウイルス RNA の存在により RIG-I の TRIM25, Ripet による K63 様式ユビキチン化が起き、IPS-1 への結合、下流シグナルの活性化が起きる。ウイルスが存在しない場合、ウイルス感染後のインターフェロンが不必要な状況において、CYLD が RIG-I 上のユビキチンを除去し、負の制御を行う (上)。IPS-1 の活性化により、TRAF3 と IPS-1 の結合が起き、TRAF3 の K63 様式ユビキチン化が起きる。そのユビキチン化により TBK1, IKKi をリクルートし、IRF-3, 7 の活性化につながり 1 型インターフェロンの産生につながる。DUBA は CYLD と同様にウイルスが存在しない場合、ウイルス感染後のインターフェロンが不必要な状況において TRAF3 上の脱ユビキチン化を行いシグナルの負の制御を行う (下)。

増大する。阻害メカニズムとして DUBA は IPS-1 に結合し下流の IRF-3, 7 リン酸化酵素 (TBK1, IKKi) と複合体を形成する TRAF3 と結合し, K63 様式でユビキチンされた TRAF3 の脱ユビキチン化を行い, シグナルを不活性化 (図 2)。DUBA を強制発現させると TRAF3 と TBK1 の相互作用が弱くなることから, TRAF3 のユビキチン化がリン酸化酵素複合体形成をコントロールしていると考えられる。DUBA はマクロファージにおいて刺激誘導がかかることから, ネガティブフィードバック制御因子と考えられる。

4-2 プロテアソームタンパク分解系による制御

RNF125, RNF5—RIG-I が活性化に必須な K63 様式のユビキチン化を受けることは上記したが, プロテアソーム分解系に誘導するユビキチン化も E3 ユビキチンリガーゼ RNF125 (ring-finger protein 125) により制御を受けることが報告されている¹¹⁾。RNF125 は酵母ツーハイブリッド法により E2 酵素である UbcH8 と相互作用するタンパク質として同定された。培養細胞中で RNF125 の強制発現は RIG-I のユビキチン化と不安定化を起し, RNF125 のノックダウンではユビキチン化の減少と安定化を引き起こす。さらに MDA5, IPS-1 も RNF125 によりユビキチン化されることが示されている。その発現によりウイルス感染による 1 型インターフェロン分泌は阻害され, ノックダウンにより増大する。シグナルの活性化後一定時間を過ぎると RNF125 の蓄積とともに RIG-I のタンパク質量が減少することより, RNF125 はネガティブフィードバック制御因子であることが考えられる。

また RLR シグナルを活性化し細胞内 DNA シグナルにも必須な ER アダプター分子 STING も, ファミリータンパク質である RNF5 により K48 様式のユビキチン化による負の制御を受けることが示されている¹²⁾。

Triad3A—Triad3A は K48 様式のユビキチン化をする E3 リガーゼで, TLR-4, TLR-9 の負の制御因子として知られていたが, TRAF 相互作用ドメインを介して TRAF3 と相互作用することが見出された。Triad3A は TRAF3 の K48 様式のユビキチン化を促進し TRAF3 の不安定化を促す¹³⁾。その発現により 1 型インターフェロンの活性が押さえられ, RNAi による発現の抑制下ではウイルスによるインターフェロンの活性化が増大する。ウイルス感染の初期段階 (4-8 時間) において, TRAF3 は K63 様式でユビキチン化される。このユビキチン化はシグナル活性化に必要な TBK1 との相互作用に必須であるが, 感染持続期間の後半 (12-16 時間) において Triad3A タンパク質の誘導がみら

れ TRAF3 と相互作用, K48 様式でのユビキチン化を引き起こしプロテアソームによる分解に導く。Triad3A はネガティブフィードバック制御因子であることが考えられる。**PCBP2/AIP4**—酵母ツーハイブリッド法により IPS-1 結合タンパク質として同定された PCBP2 (poly (rC) binding protein2) は, HECT (homologous to E6-associated protein C-terminus) ドメイン-E3 ユビキチンリガーゼ AIP4 (Akt-atrophin-interacting protein 4) を IPS-1 にリクルートすることによりユビキチン化を引き起こし, プロテアソーム分解系に導くことが示された¹⁴⁾。AIP4 の発現は IPS-1 の部分的な分解と 1 型インターフェロンの発現の阻害を引き起こすが, PCBP2 との共発現によりその効果は増大する。野生型マウス胎児繊維芽細胞をセンダイウイルスに感染させると IPS-1 は時間とともに分解を受けるが, AIP4 欠損繊維芽細胞 (*Itch* -/-) では全く分解を受けなくなる。したがって AIP4 欠損細胞ではウイルスの増殖効率が野生型に比べ高くなる。AIP4 タンパク質は, ウイルス感染持続期間の後半 (16 時間) に誘導されその発現が長く維持される (24-32 時間) ことより, ネガティブフィードバック因子であることが示唆される。

4-3 RIG-I のリン酸化を介した制御

二つの研究グループが, RIG-I のリン酸化がシグナルの阻害に結びつくことを示している^{15,16)}。TRIM25 による RIG-I の Lys172 のユビキチン化は 1 型インターフェロン誘導に必須であるが, 生化学的実験により Lys172 の近傍に存在する Thr170, Ser8 がリン酸化されていることが見出された。この両アミノ酸をリン酸化もしくはそれぞれのアミノ酸残基を酸性アミノ酸で置換すると, TRIM25 結合能, Lys172 のユビキチン化, IPS-1 結合能が低下し, 最終的には下流のシグナルが著しく低下する。非感染状態ではこのリン酸化は存在するが, ウイルス感染後には減少する。すなわち二つの RIG-I リン酸化は少なくとも定常状態において負の制御をしていることが示された。

4-4 ユビキチン様タンパク質による制御

SUMOylation—RLR シグナルにおいて 1 型インターフェロン分泌に関わる転写因子である IRF-3, 7 の活性化はウイルス駆逐に必須のものである。ウイルス感染後, IRF-3 に存在する K152, IRF-7 に存在する K406 が SUMO 化されることが見出された¹⁷⁾。この両リジン残基をアルギニンに変えた IRF-3, IRF-7 を発現させた細胞にウイルス感染させると 1 型インターフェロン mRNA の誘導が増大する。IRF-3, 7 の活性化に必要なリン酸化に関係なく, この SUMO 化が起きていることが示されている。以上のこと

から、このSUMO化はRLRシグナルの負の制御の一つと考えられている。

ISG15ylation—RIG-Iはもう一つのユビキチン様タンパク質であるISG15により修飾されることが知られている。ISG15発現によりウイルス感染に誘導されたインターフェロン活性の阻害がみられる¹⁸⁾。ISG15特異的E1であるUBEL1 (ubiquitin-conjugating enzyme E2L 1) の欠損細胞においてmRNAの量はかわらないが、RIG-Iやその他のISG (interferon stimulated gene) タンパク質の定常状態の量が上昇する。ウイルス感染によるUBEL1の欠損細胞においては野生型細胞に比べインターフェロンの産生が増大することから、ISG15は負の制御因子として考えられている。

5. おわりに

2004年のRIG-Iの細胞内RNA受容体としての発見以来、ウイルス由来RNAの認識メカニズム、シグナル伝達分子の同定をはじめ抗ウイルス自然免疫の解明は飛躍的に発展した。それと同時に特に近年、多くの負の制御因子が同定され、定常時、病原体感染時、感染後における過度のインターフェロン分泌のサーベイランスシステムの重要性がうかがえる。本ミニレビューではユビキチン関連を中心とした制御のみを紹介したが、紙面の都合上その他の重要な制御については他の総説を参照していただきたい¹⁻³⁾。この多くのブレーキシステムの解明により、その情報を利用したワクチン、医薬品の開発、特に自己免疫疾患の治療開発が期待される。

謝辞

本研究は米国ノースウェスタン大学 Curt Horvath 教授のもと、マイアミ大学 Glen Barber 教授、マウントサイナイメディカルセンター Adrian Ting 教授との共同研究で行われましたことを感謝します。また紙面スペースの都合上、本来引用すべき論文、またその他多くの論文を引用できなかったことをお詫びいたします。

- 1) Takeuchi, O. & Akira, S. (2010) *Cell*, 140, 805–820.
- 2) Yoneyama, M. & Fujita, T. (2010) *Rev. Med. Virol.*, 20, 4–22.
- 3) Komuro, A., Bamming, D., & Horvath, C.M. (2008) *Cytokine*, 43, 350–358.
- 4) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004) *Nat. Immunol.*, 5, 730–737.
- 5) Komuro, A. & Horvath, C.M. (2006) *J. Virol.*, 80, 12332–12342.

- 6) Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., & Takeuchi, O. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 1512–1517.
- 7) Venkataraman, T., Valdes, M., Elsby, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., & Barber, G.N. (2007) *J. Immunol.*, 178, 6444–6455.
- 8) Friedman, C.S., O'Donnell, M.A., Legarda-Addison, D., Ng, A., Cardenas, W.B., Yount, J.S., Moran, T.M., Basler, C.F., Komuro, A., Horvath, C.M. Xavier, R., & Ting, A.T. (2008) *EMBO Rep.*, 9, 930–936.
- 9) Zhang, M., Wu, X., Lee, A.J., Jin, W., Chang, M., Wright, A., Imaizumi, T., & Sun, S.C. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 18621–18626.
- 10) Kayagaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R., Quan, C., O'Rourke, K.M., Eby, M., Pietras, E., Cheng, G., Bazan, J.F., Zhang, Z., Arnott, D., & Dixit, V.M. (2007) *Science*, 318, 1628–1632.
- 11) Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., & Shimotohno, K. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 7500–7505.
- 12) Zhong, B., Zhang, L., Lei, C., Li, Y., Mao, A.P., Yang, Y., Wang, Y.Y., Zhang, X.L., & Shu, H.B. (2009) *Immunity*, 30, 397–407.
- 13) Nakhaei, P., Mesplede, T., Solis, M., Sun, Q., Zhao, T., Yang, L., Chuang, T.H., Ware, C.F., Lin, R., & Hiscott, J. (2009) *PLoS Pathog*, 5, e1000650.
- 14) You, F., Sun, H., Zhou, X., Sun, W., Liang, S., Zhai, Z., & Jiang, Z. (2009) *Nat. Immunol.*, 10, 1300–1308.
- 15) Gack, M.U., Nistal-Villan, E., Inn, K.S., Garcia-Sastre, A., & Jung, J.U. (2010) *J Virol* 84, 3220–3229.
- 16) Nistal-Villan, E., Gack, M.U., Martinez-Delgado, G., Maharaj, N.P., Inn, K.S., Yang, H., Wang, R., Aggarwal, A.K., Jung, J. U., & Garcia-Sastre, A. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 20252–20261.
- 17) Kubota, T., Matsuoka, M., Chang, T.H., Tailor, P., Sasaki, T., Tashiro, M., Kato, A., & Ozato, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 25660–25670.
- 18) Kim, M.J., Hwang, S.Y., Imaizumi, T., & Yoo, J.Y. (2008) *J. Virol.*, 82, 1474–1483.

小室 晃彦

(東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野)

Negative regulation of RIG-I-like receptor (RLR) signaling
Akihiko Komuro (Department of Neuropathology, Medical
Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-
5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan)