



C-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity

後藤, 栄治

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3379

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003379>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 105 】

氏 名・(本 籍) 後藤 栄治 (京都府)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1658号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月31日

【 学位論文題目 】

c-MIR, a Human E3 Ubiquitin Ligase, Is a
Functional Homolog of Herpesvirus Proteins
MIR1 and MIR2 and Has Similar Activity
(新規ヒトE3 ユビチキン連結酵素 c-MIR はヘルペス
ウイルス蛋白 MIR1, MIR2 の機能性相同分子であり,
同様の活性を持つ)

審 査 委 員

主 査 教 授 寺 島 俊 雄
教 授 山 村 博 平
教 授 片 岡 徹

緒言

Jung, 石戸ら及び Ganem らにより、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) のもつ新たな E3 ユビキチン連結酵素 (K3/MIR1, K5/MIR2) が同定された。これらの分子 K3/MIR1, K5/MIR2 は特徴的な二次構造を持っており、plant homeodomain (PHD) ドメインの亜系である BKS (bovine herpesvirus 4, Kaposi's sarcoma associated-herpes virus, and Swinepox virus)-PHD ドメインを E3 活性ドメインとしている。K3/MIR1, K5/MIR2 は抗原提示分子である MHC class I をユビキチン化し、その細胞表面における発現を著明に抑制する。この抑制によって、KSHV 感染細胞が細胞傷害性 T 細胞から免疫回避出来る可能性が考えられている。KSHV を含め、DNA ウイルスは多くの宿主分子 (IL-6, macrophage inflammatory protein (MIP) 等) の遺伝子を取り込み、それらの分子を改変し、免疫回避に利用していると考えられている。これらの事から我々は、MIR1, MIR2 も同様に宿主分子を起源としていると仮定し、ヒトゲノム上にそれらの類似分子が存在するか否かを検討した。

方法と結果

1. ヒトゲノムにおける KSHV MIR1, MIR2 の機能類似分子の同定

KSHV は多くの宿主類似分子 (vIL-6, vMIP 等) を持っており、ウイルスの病原性に重要な役割を果たしている。そこで我々は、E3 ユビキチン連結酵素である MIR1, MIR2 においてもその類似分子がヒトゲノム上に存在すると考え、米セラジェノミクス社から公開されている Human protein database を検討した。その結果、MIR1, MIR2 に類似の二次構造と BKS-PHD ドメインを持つ hCP36279 という機能未知分子の存在が明らかとなった。BJAB 細胞株より、hCP36279 cDNA をクローニングし、アミノ酸配列を比較したところ、hCP36279 は全体としては MIR1, MIR2 とそれぞれ 12%, 18% の相同性しか持たないが、BKS-PHD ドメインのみでは、それぞれ 36%, 42% と高い相同性を持っていた。hCP36279 と MIR1, MIR2 との機能類似性を検討するため、hCP36279 cDNA を発現ベクターに組み込み、BJAB 細胞に一過的に導入し、抗原提示関連分子の細胞表面における発現を調べた。その結果、B7-2 の細胞表面における発現が特異的に抑制された。MHC class I, ICAM-1 は抑制されなかった。よって、我々は、構造的及び機能的に MIR1, MIR2 と類似している事より、この分子を c-MIR (cellular-MIR) と名付けた。さらに、c-MIR が恒常的に発現する細胞を作成し検討したところ、一過性発現による実験結果と同様に、B7-2 の細胞表面における特異的な発現抑制が見られた。このことから、c-MIR は MIR1, MIR2 と構造的にも機能的にも類似していることが明らかとなった。

2. c-MIR の発現プロファイル

c-MIR は BJAB 細胞において、B7-2 の細胞表面における発現を特異的に抑制することから、c-MIR が抗原提示機能に関与していると考え、ヒト組織における c-MIR mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した。その結果、新生児脳、リンパ節、脾臓及び胎盤において c-MIR mRNA の発現が見られた。心臓、肺、肝臓および腎臓においては発現が見られなかった。c-MIR mRNA の発現がリンパ組織において見られることから、ヒト末梢血リンパ球、単球及び単球から分化させた樹状細胞において c-MIR mRNA の発現を検討した結果、末梢血リンパ球では発現が見られなかったが、抗原提示細胞である樹状細胞において発現が見られた。樹状細胞における c-MIR 蛋白の発現を検討するため、c-MIR ポリクローナル抗体を作成し免疫沈降法を行った。その結果、ヒト単球から分化させた樹状細胞において、c-MIR 蛋白の発現が確認された。これらのことから、c-MIR は樹状細胞における機能分子であることが示唆された。

3. c-MIR による B7-2 のエンドサイトーシスとリソソームにおける分解の促進

MIR1, MIR2 は標的分子である MHC class I のエンドサイトーシスを促進し、最終的にリソソームにおいて分解することが知られている。そこで、c-MIR による B7-2 の発現抑制においても同様の機構で行われているかどうかを検討した。c-MIR が恒常的に発現している細胞において B7-2 のエンドサイトーシスを FACS と共焦点顕微鏡を用いて検討した。その結果、c-MIR 発現細胞において、わずか 10 分後に細胞表面から細胞内への B7-2 の取り込みが見られた。さらに、c-MIR が恒常的に発現している細胞において B7-2 分子の安定性を pulse-chase 法を用いて検討した。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン及び $[^{35}\text{S}]$ システインで pulse ラベルし、0, 1, 3 及び 6 時間チェイスした結果、コントロールの細胞では B7-2 蛋白の減少は見られなかったが、c-MIR 発現細胞においてはチェイス 3 時間から B7-2 蛋白の顕著な減少が見られた。また、リソソームの機能阻害剤である bafilomycin A1 を添加し、同様の実験を行ったところ、c-MIR 発現細胞における B7-2 蛋白の分解は見られなくなった。これらのことから、c-MIR は MIR1, MIR2 と同様に、標的分子である B7-2 を細胞表面から急速にエンドサイトーシスし、最終的にリソソームで分解することが示唆された。

4. c-MIR は B7-2 を標的とする E3 ユビキチン連結酵素である

MIR1, MIR2 は BKS-PHD ドメインを E3 活性部位とする E3 ユビキチン連結酵素であ

る。そこで、MIR1, MIR2 に類似の BKS-PHD ドメインを持つ c-MIR においても同様に E3 ユビキチン連結酵素活性を持つかどうかを検討した。野生型 MIR1 及び c-MIR の PHD ドメインを持つキメラ MIR1 分子を作製し、A7 細胞に導入後、細胞表面における MHC class I の発現を検討したところ、野生型 MIR1 及びキメラ MIR1 分子それぞれにおいて MHC class I の発現抑制が見られた。次に、野生型及び E3 活性を持たない変異型 BKS-PHD ドメインと GST との融合蛋白を作成し、in vitro において自己ユビキチン化を検討した。その結果、GST のみ、あるいは変異型 BKS-PHD ドメインとの融合蛋白においてはユビキチン化は見られなかったが、野生型 BKS-PHD ドメインとの融合蛋白においては顕著なユビキチン化が見られた。さらに、c-MIR によって B7-2 がユビキチン化されるかどうかを検討したところ、野生型 c-MIR を発現している場合のみ同様に、B7-2 の顕著なユビキチン化が見られた。これらのことから、MIR1, MIR2 と同様に、c-MIR は BKS-PHD ドメインを E3 活性部位とする E3 ユビキチン連結酵素であることが明らかとなった。

5. B7-2 の細胞表面における発現抑制には B7-2 のユビキチン化が必要である

そこで、c-MIR による B7-2 のユビキチン化が、B7-2 の細胞表面における発現抑制に関与しているかどうかを検討した。BKS-PHD ドメインに変異を入れた E3 活性を持たない c-MIR (mt-c-MIR) を作成し、BJAB 細胞に導入後、細胞表面における B7-2 の発現を調べたところ、B7-2 の抑制は見られなかった。次に、c-MIR によるユビキチン化を受けない変異体 B7-2 を作成した。MIR1, MIR2 によるユビキチン化には標的分子の細胞質領域のリジン残基が必要であることが知られているため、B7-2 の細胞質領域のリジン残基をすべてアルギニンに置換した変異体を作成し、同様にユビキチン化を検討した。その結果、c-MIR による B7-2 のユビキチン化は見られなかった。また、上記の変異体 B7-2 を c-MIR が恒常的発現している BJAB 細胞に導入し、B7-2 の細胞表面における発現を検討した結果、コントロールの細胞と同等の発現が見られ、c-MIR による抑制を受けていないことが明らかとなった。これらのことから、c-MIR による B7-2 の細胞表面における発現抑制には、B7-2 の細胞質領域のリジン残基のユビキチン化が必要であることが示唆された。

6. B7-2 のユビキチン化と発現抑制には c-MIR と B7-2 との結合が必要である

E3 ユビキチン連結酵素は標的分子と特異的に結合することにより、その機能を発揮することが知られている。そこで、c-MIR においても同様に B7-2 と結合するかどうかを

免疫沈降法を用いて検討した。その結果、c-MIR と B7-2 との特異的結合が見られた。また、mt-c-MIR についても野生型 c-MIR と同様に B7-2 との結合が見られた。次に、B7-2 の細胞表面における発現抑制が c-MIR との結合によるものかどうかを検討するため、B7-2 と c-MIR による抑制を受けない MHC class I についても同様に結合とユビキチン化の関連を検討した。その結果、MHC class I においては c-MIR との有意な結合及びユビキチン化は見られなかった。これらのことから、B7-2 のユビキチン化及び細胞表面における発現抑制には c-MIR と B7-2 との特異的な結合が必要であることが示唆された。

考察

Human protein database を探索し、ヒトにおける K3/MIR1, K5/MIR2 の構造的及び機能的類似分子 c-MIR を見出した。c-MIR は BKS-PHD ドメインを活性ドメインとする新規 E3 ユビキチン連結酵素であり、抗原提示関連分子の B7-2 を標的とすることが明らかとなった。さらに、c-MIR は B7-2 の細胞内領域のリジン残基をユビキチン化することにより、B7-2 の細胞表面におけるエンドサイトーシスの誘起、細胞表面における発現抑制、リソソームにおける分解を促進させる事が明らかとなった。これらのことから、我々は次のような仮説を考えている。

最初の仮説は、ウイルスの持つ免疫制御分子が宿主ゲノムより派生したというものである。本研究において示したように、c-MIR の E3 活性ドメインである BKS-PHD ドメインは、MIR1 のものと 36% と相同性が高く、MIR1 においても機能することから、少なくとも MIR1, MIR2 の機能ドメインは宿主ゲノムを起源としているのではないかと考えられた。さらに、MIR1, MIR2 の類似分子が simian 及び bovine γ -herpesviruses, swinepox virus などにおいても同定されていることから、これらのウイルス蛋白はそれぞれの宿主の起源生物から派生したものと考えられる。

二つ目の仮説は、c-MIR が抗原提示関連分子の B7-2 を標的とすること、また、樹状細胞において c-MIR mRNA 及び蛋白質の発現が認められたことから、c-MIR が抗原提示機能に関与しているのではないかというものである。動物モデルにおいてこのことを検証するため、我々はすでに、マウス c-MIR をクローニングし、マウス c-MIR においても同様の機能があることを確認している。さらに、RT-PCR による mRNA の発現解析から、マウス c-MIR は胸腺を除く他の臓器においてユビキチンに発現が認められた。B7-2 は胸腺において発現が強いことから、この結果は、我々の考えを支持するものであると考えている。現在、c-MIR ノックアウトマウスを作成し、この仮説の検証を行っている。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第 1676号	氏名	後藤 栄治
論文題目	c-MIR, a Human E3 Ubiquitin Ligase, Is a Functional Homolog of Herpesvirus Proteins MIR1 and MIR2 and Has Similar Activity (新規ヒト E3 ユビキチン連結酵素 c-MIR はヘルペスウイルス蛋白 MIR1, MIR2 の機能性相同分子であり、同様の活性を持つ)		
審査委員	主 査 寺 島 俊 雄 副 査 山 手 野 平 副 査 片 岡 徹		
審査終了日	平成 17 年 2 月 16 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

Jung、石戸ら及び Ganem らにより、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) のもつ新たな E3 ユビキチン連結酵素 (K3/MIR1, K5/MIR2) が同定された。これらの分子 K3/MIR1, K5/MIR2 は特徴的な二次構造を持っており、plant homeodomain (PHD) ドメインの亜系である BKS (bovine herpesvirus 4, Kaposi's sarcoma associated-herpes virus, and Swinepox virus)-PHD ドメインを E3 活性ドメインとしている。K3/MIR1, K5/MIR2 は抗原提示分子である MHC class I をユビキチン化し、その細胞表面における発現を著明に抑制する。この抑制によって、KSHV 感染細胞が細胞傷害性 T 細胞から免疫回避出来る可能性が考えられている。KSHV を含め、DNA ウイルスは多くの宿主分子 (IL-6, macrophage inflammatory protein (MIP) 等) の遺伝子を取り込み、それらの分子を改変し、免疫回避に利用していると考えられている。これらの事から本研究者は、MIR1, MIR2 も同様に宿主分子を起源としていると仮定し、ヒトゲノム上にそれらの類似分子が存在するか否かを検討し、以下の結果を得た。

米セララ社から公開されているデータベースを探索し、MIR1, MIR2 に類似の二次構造と BKS-PHD ドメインを持つ hCP36279 という機能未知分子を見出した。B cell line BJAB 細胞株より、hCP36279 cDNA をクローニングし、BJAB 細胞に一過的に導入し、抗原提示関連分子の細胞表面における発現を調べた。その結果、B7-2 の細胞表面における発現が特異的に抑制された。MHC class I, ICAM-I は抑制されなかった。また、この結果は c-MIR 恒常的発現細胞を用いた解析においても同じであった。よって、構造的及び機能的に MIR1, MIR2 と類似している事より、この分子を c-MIR (cellular-MIR) と名付けた。

RT-PCR 法によるヒト c-MIR mRNA の発現解析の結果、新生児脳、リンパ節、脾臓及び胎盤において c-MIR mRNA の発現が見られた。心臓、肺、肝臓および腎臓においては発現が見られなかった。また、ヒト単球から分化させた樹状細胞において、c-MIR mRNA 及び蛋白質の発現が確認された。これらのことから、c-MIR は抗原提示細胞である樹状細胞において機能分子であることが示唆された。

c-MIR 恒常的発現細胞において B7-2 の取り込みを FACS と共焦点顕微鏡を用いて検討した結果、わずか 10 分後に細胞表面から細胞内への B7-2 の取り込みが見られた。さらに、B7-2 分子の安定性を

pulse-chase 法を用いて検討した結果、c-MIR 発現細胞においてチェイス 3 時間から B7-2 蛋白の顕著な減少が見られた。また、リソソームの機能阻害剤である bafilomycin A1 を添加したところ、c-MIR 発現細胞における B7-2 蛋白の分解は見られなくなった。これらのことから、c-MIR は B7-2 を細胞表面から急速に取り込み、最終的にリソソームで分解することが示唆された。

c-MIR の PHD ドメインと GST との融合蛋白を用いた in vitro 自己ユビキチン化実験及び、完全長 c-MIR 用いた B7-2 の細胞内ユビキチン化実験の結果、いずれも顕著なユビキチン化が見られた。このことから、c-MIR は PHD ドメインを E3 活性部位とする E3 ユビキチン連結酵素であることが示唆された。

B7-2 の細胞質領域のリジン残基をすべてアルギニンに置換した変異体 B7-2 は、c-MIR によるユビキチン化及び発現抑制を受けていないことが明らかとなった。このことから、c-MIR による B7-2 の細胞表面における発現抑制には、B7-2 の細胞質領域のリジン残基のユビキチン化が必要であることが示唆された。

c-MIR と B7-2 及び c-MIR による抑制を受けない MHC class I について結合とユビキチン化を検討した結果、B7-2 とのみ特異的な結合が見られた。MHC class I においては c-MIR との有意な結合及びユビキチン化は見られなかった。これらのことから、B7-2 のユビキチン化及び細胞表面における発現抑制には c-MIR と B7-2 との特異的な結合が必要であることが示唆された。

以上、本研究は、c-MIR がヒトにおける新たな膜結合型 E3 ユビキチン連結酵素であり、抗原提示関連分子である B7-2 をユビキチン化し、その細胞表面における発現を抑制する事を明らかにしたものであり、さらに、抗原提示細胞である樹状細胞において発現が見られたことから、c-MIR が新たな生体内免疫制御機構に関与しうる分子である可能性を示唆する新知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。