

インターフェロンにより誘導される IBP は IFITM1 と結合し、特定のウイルス感染を抑制する

Interferon-induced protein IBP interacts with IFITM1 and prevents particular viral infection

(日本栄養・食糧学会推薦)

代表研究者 福岡女子大学 奥村 文彦 Fukuoka Women's University Fumihiko OKUMURA

協同研究者 カリフォルニア大学サンディエゴ校 Dong-Er ZHANG University of California San Diego
Dong-Er ZHANG

ドイツ霊長類センター Alexander Hahn Deutsches Primatenzentrum GmbH Alexander HAHN

九州大学・東京医科歯科大学 中山 敬一 Kyushu University・Tokyo Medical and Dental
University Keiichi NAKAYAMA

To analyze IBP of unknown function, which is induced by interferon stimulation, we generated anti-IBP polyclonal antibody and found that IBP is an unstable protein with a half-life of approximately 10 minutes. The accumulation of IBP by the proteasome inhibitor MG132 suggested that IBP is induced by interferon stimulation but is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome pathway.

To elucidate the physiological role of IBP, IBP-binding proteins were analyzed by immunoprecipitation and mass spectrometry. Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1), whose expression is induced by interferon stimulation, is one of the candidate proteins, and IFITM1 has been shown to prevent Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) and Related rhesus monkeyrhadinovirus (RRV) infection. It has also been reported that IFITM1 localizes to lysosomes. Immunostaining analysis suggested that a small fraction of IBP localizes to lysosomes. Immunoprecipitation experiments showed that overexpressed IBP coimmunoprecipitates with endogenous IFITM1 and lysosomal protein LAMP1. Furthermore, it has been suggested that knockdown of IBP increases the rate of certain viral infections, which is being analyzed in detail.

研究目的

ウイルスや細菌感染などで発現誘導される ISG15 は様々なタンパク質を修飾する。タンパク質の ISG15 修飾は自然免疫に寄与していると示唆されているが、詳細は不明である。最近、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のプロテアーゼ PLpro は脱 ISG15 酵素であることが相次いで報告されており、SARS-CoV-2 の増殖には「ISG15 修飾」を除去することが必要なかもしれない(1-3)。

本申請課題では、メッセンジャーRNA (mRNA) キャップ構造結合タンパク質 4EHP の ISG15 修飾に焦点を絞り解析し、ISG15 修飾による自然免疫応答の制御メカニズムを明らかにする。

4EHP は ISG15 修飾を受けるとキャップ構造結合力が増し、特定の mRNA に結合することで、そのタンパク質翻訳を選択的に抑制すると考えられる(4)。予備実験の結果より、その候補遺伝子として IBP を同定しており、本申請課題でさらに解析する。IBP は

機能未知であるため、まず IBP の結合タンパク質を同定し、IBP の生理的役割を解明する。その後、ISG15 修飾を受けた 4EHP による選択的な IBP 翻訳の抑制が、どのような生理的役割を担うのかを明らかにする。

研究経過

HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した IBP-3FLAG を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて IBP-3FLAG を免疫沈降した。共沈降した IBP 結合タンパク質を質量分析機を用いて同定した。それらの IBP 結合タンパク質のうち、Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) は特定のウイルス感染を抑制することが知られており(5)、その発現制御は抗ウイルス活性に重要であるため、さらに解析した。

HEK293T 細胞に HA タグを付加した IFITM1-3HA と、IBP-3FLAG を発現させた。抗 FLAG 抗体を用いて IBP-3FLAG を免疫沈降した結果、IFITM1-3HA が共沈降することを確認した。次に内在性発現レベルでの結合を解析するために市販の抗 IBP 抗体をいくつか試したが、いずれも IBP を検出あるいは免疫沈降出来なかった。そこで抗 IBP 抗体を作製し、以降の解析に用いた。

IBP はインターフェロン刺激により発現が誘導されることが知られている。そこで、MCF10A 細胞をインターフェロン刺激し、作製した抗 IBP 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより確認したところ、想定される分子量にバンドを検出した。次に、IBP ノックダウン MCF10A 細胞株を作製し、抗 IBP 抗体の特異性を確認した。IBP ノックダウン細胞溶解液を、抗 IBP 抗体を用いて解析した結果、IBP ノックダウン細胞では IBP に相当するバンドが検出できなかった。一方、HEK293T 細胞に発現させた IBP-3FLAG を検出できたことから、作製した抗 IBP 抗体は内在性 IBP を検出できることを確認した。しかしながら、この抗 IBP 抗体は IBP を免疫沈降出来なかった。したがって、作製した抗 IBP 抗体が認識するエピトープは立体構造の内部に位置するか、別のタンパク質との相互作用により表面に露出していない可能性などが考えられる。

IBP が安定タンパク質である場合、仮に 4EHP が

IBP の翻訳を抑制してもその発現量はすぐには減らないため、細胞に与える影響は少ないと考えられる。そこで、内在性 IBP の半減期を、リボソーム阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて解析した結果、約 10 分と非常に不安定であることを見出した。また、プロテアソーム阻害剤は IBP の分解を抑制した。したがって、IBP はインターフェロン刺激依存的に発現誘導されるが、急速にプロテアソーム依存的に分解されるタンパク質であることが示唆される (Figure 1)。

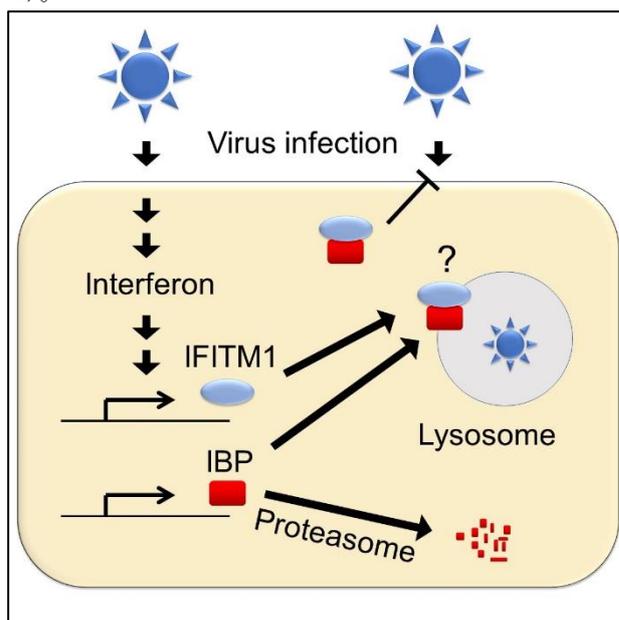


Figure 1. A schematic diagram of the antiviral activity by interferon-induced IBP and IFITM1.

Production of interferon by viral infection induces expression of IBP and IFITM1. The IBP and IFITM1 complex partially localizes to lysosomes, which may include virus. The IBP and IFITM1 complex may suppress certain viral infections. IBP is rapidly degraded in a proteasome-dependent manner.

IFITM1 はリソソームに局在することが知られているため(6, 7)、IBP ノックダウンが IFITM1 の局在に影響を及ぼすのかを解析した。IBP ノックダウン細胞をインターフェロン刺激し、IFITM1 の局在を共焦点顕微鏡を用いて解析したところ、IBP ノックダウンは IFITM1 の局在に影響を及ぼさないことが明らかとなった。次に、IBP の細胞内局在を解析した。抗 IBP 抗体は免疫染色に適さなかったため、HEK293T 細胞に IBP-3FLAG を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いてその局在を解析した。IBP-3FLAG は過剰発現状況下で、一部 IFITM1 と共局在する可能性

があるが、主に細胞質に局在することが判明した。そこで、IBP-3FLAG を安定発現する MCF10A 細胞株を作製し、IBP と内在性 IFITM1 との結合を解析した。その結果、安定発現した IBP-3FLAG と内在性 IFITM1 が共沈降することを見出した。また、リソソームに局在することが知られている Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)も IBP-3FLAG と共沈降したため、IBP と IFITM1 はリソソーム膜上で共局在する可能性が示唆される (Figure 1)。

Alexander S. Hahn らのグループは、IFITM1 が Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) と Rhesus monkey rhadinovirus (RRV) の感染を抑制することを報告している(5)。IBP ノックダウンはこれらの感染抑制に影響を及ぼす可能性があるため、Alexander S. Hahn らとの共同研究を開始し、数種類のウイルス感染に対する IBP ノックダウンの影響を解析した。その結果、IBP ノックダウンにより、特定のウイルス感染率が増加した。すなわち、IBP はこれらのウイルス感染を抑制することが明らかとなった (Figure 1)。現在、IFITM1 ノックアウト細胞株を用いて解析を行っている。

考察

IBP は疎水性アミノ酸に富むタンパク質であり、細胞膜やオルガネラ膜などに埋もれている可能性が高い。このため、抗 IBP 抗体を作製することは容易ではなく、現在用いている抗 IBP 抗体は特定の条件下でのみ内在性 IBP を検出できる。これらのことが IBP を生化学的に解析することを困難にしている。また、内在性 IBP の細胞内局在を未だ明らかにできていないため、CRISPR-Cas9 システムを用いて、内在性 IBP にタグを付加して、抗タグ抗体を用いて解析する必要がある。

IBP がいくつかのウイルス感染を抑制することが判明しているが、それが IFITM1 依存的なのかは明らかとなっていないため、IFITM1 と IBP ダブルノックダウン/ノックアウト細胞株を用いて解析することは重要である。IBP と IFITM1 複合体が抗ウイルス活性に重要である場合、どのような分子メカニズムでウイルス感染やウイルス増幅を抑制するのか解析することは、新規治療薬の開発にもつながる。

参考文献

1. Freitas BT, Durie IA, Murray J, Longo JE, Miller HC, Crich D, et al. Characterization and Noncovalent Inhibition of the Deubiquitinase and deISGylase Activity of SARS-CoV-2 Papain-Like Protease. *ACS Infect Dis.* 2020;6(8):2099-109.
2. Klemm T, Ebert G, Calleja DJ, Allison CC, Richardson LW, Bernardini JP, et al. Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. *EMBO J.* 2020;39(18):e106275.
3. Shin D, Mukherjee R, Grewe D, Bojkova D, Baek K, Bhattacharya A, et al. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature.* 2020;587(7835):657-62.
4. Okumura F, Zou W, Zhang DE. ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes Dev.* 2007;21(3):255-60.
5. Hornich BF, Grosskopf AK, Dcosta CJ, Schlagowski S, Hahn AS. Interferon-Induced Transmembrane Proteins Inhibit Infection by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and the Related Rhesus Monkey Rhadinovirus in a Cell-Specific Manner. *mBio.* 2021;12(6):e0211321.
6. Li C, Zheng H, Wang Y, Dong W, Liu Y, Zhang L, et al. Antiviral Role of IFITM Proteins in Classical Swine Fever Virus Infection. *Viruses.* 2019;11(2).
7. Narayana SK, Helbig KJ, McCartney EM, Eyre NS, Bull RA, Eltahla A, et al. The Interferon-induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry. *J Biol Chem.* 2015;290(43):25946-59.

研究の発表

ポスター発表

1. 奥村 文彦、仁田 暁大、中山 敬一、Hahn Alexander、Zhang Dong-Er (2023) インターフェロンにより誘導される IBP は IFITM1 と結合し、特定のウイルス感染を抑制する 日本薬学会第 144 年会、横浜
2. 奥村 文彦、仁田 暁大、中山 敬一、Alexander

Hahn, Dong-Er Zhang (2023) インターフェロン誘導タンパク質 ISG は IFITM1 と結合し、特定のウイルス感染を抑制する 第 46 回日本分子生物学会年会、神戸

ンにより誘導される ISG は IFITM1 と結合し、一部リソソームに局在する 第 96 回日本生化学会大会、福岡

3. 奥村 文彦、仁田 暁大、中山 敬一, Hahn Alexander, Zhang Dong-Er (2023) インターフェロ

誌上発表
該当なし