京都大学	博士（医学）	氏　名	有元　啓一郎
論文題目	Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125 (ユビキチンリガーゼ RNF125 による RIG-I シグナルの抑制)		

（論文内容の要旨）

抗ウイルス応答は主に、急激に誘導されるⅠ型（インターフェロン）IFN によって制御されている。Ⅰ型 IFN である IFNαや IFNβ遺伝子の発現は、それらのプロモーター配列に結合する転写因子である IRF3（Interferon Regulatory Factor 3）や IRF7 によって主に制御されている。

ウイルス感染時、細胞膜やエンドソームでウイルスを認識する TLR(Toll like receptor)が知られていたが、近年、 細胞質内でウイルス二本鎖 RNA を認識するセンサーとして、RIG-I（retinoic acid inducible gene Ⅰ）、MDA5（melanoma differentiation associated gene 5）と呼ばれるヘリケースが報告された。

RIG-I は C 末端で、ウイルスの複製過程でできる二本鎖 RNA を認識し、N 末端に存在する２つの CARD（caspase recruitment domain）ドメインから IFN 誘導シグナルを下流へ伝達すると考えられている。また、最近 RIG-I および MDA5 のアダプター分子として CARD ドメインを持つ IPS1（interferon　β　promoter stimulator 1）（MAVS, VISA, cardif 等他の呼び方もされている）が発見され、その CARD ドメインを介して下流の IFN 産生シグナルに伝達する分子であることが報告された。この様に、TLR シグナルと同様、RIG-I シグナルは抗ウイルス応答に重要な役割を担っていることが示された。一方で、抗ウイルス応答を負に制御する内在性因子も数多く同定されている。IFN や炎症性サイトカイン産生の持続的亢進は細胞あるいは組織にとって望ましくないために、生理的な条件でのこれらの因子の産生は厳密に制御される必要性があると考えられる。

本研究では、RIG-I を介した IFN シグナルを制御する分子の探索を行い、その生理的意義を見いだす事を目的とした。まず、RIG-I が IFN で誘導される分子 ISG15（IFN stimulated gene 15kDa）によって ISG15 化されることを見いだしたので、ISG15 化に働く E2 リガーゼ UbcH8 を bait に yeast two hybrid screening を行い E3 リガーゼの探索を行った。その結果、ユビキチン E3 リガーゼである RNF125（ring finger protein 125）が単離された。次に本蛋白質が RIG-I の ISG15 化に関係しているかを調べたところ、ISG 化は亢進されず、むしろユビキチン化が亢進され、かつ RIG-I のタンパク質量が著しく減少した。このことから、RNF125 が RIG-I のユビキチン E3 リガーゼとして機能して RIG-I をプロテアソーム依存的に分解することが疑われた。実際に RNF125 と RIG-I を強制発現させた細胞では RIG-I のユビキチン化が見られ、プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下ではユビキチン化を受けたタンパク質量の増加が認められた。また、E3 リガーゼ活性を失くした RNF125 点変異体では、RIG-I のユビキチン化は減弱し、タンパク質量の減少も見られなかった。以上から RIG-I の分解に RNF125 の酵素活性が必要であることが明らかになった。また、RIG-I の欠失変異体を用いた実験から、RNF125 は RIG-I の CARD domain に結合しユビキチン化することが明らかになった。さらに、ユビキチン化および分解の程度は異なるが、RNF125 は CARD を持つ MDA5 や IPS1 に対してもユビキチン化修飾をした。RNF125 を強制発現するとセンダイウイルスおよび poly I:C 刺激後の IFN□産生が低下し、逆に siRNA で内在性 RNF125 をノックダウンすると増加が見られた。ウイルス感染により、RIG-I のタンパク質量は増加するが、本蛋白質は、ほぼ同時期に誘導される RNF125 によりユビキチン化され、速やかに分解されると考えられる。つまり、RNF125 は蓄積した RIG-I を分解することにより、RIG-I シグナルを負に制御していると考えられる。以上から、RNF125 はウイルス感染により RIG-I 経路を介して誘導され細胞内で増加したⅠ型 IFN 産生量を速やかに抑制して、生理的な状態のレベルに戻す重要な働きをしていると考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

近年、RIG-I(Retinoic acid inducible gene Ⅰ)シグナルは抗ウイルス応答に重要な役割を担っていることが示されている。

本論文では、翻訳後修飾によって、この RIG-I シグナルを制御する分子を探索した。

その結果、ユビキチン E3 リガーゼである RNF125（Ring finger protein 125）が、その酵素活性依存的に RIG-I をユビキチン化分解する負の制御分子であることを発見した。

また、ウイルス感染時に、内在性の RNF125 をノックダウンした細胞において、RIG-I のタンパク量ならびにインターフェロン(IFN)産生の増加が見られた。つまり RNF125 は、ウイルス感染時に誘導される RIG-I を分解することにより、過剰な IFN の産生を抑制する様に監視している酵素であることが示唆された。IFN はウイルス感染に対する初期防御反応における重要な生理活性物質である一方、恒常的な産生は致死的であるため、RNF125 による IFN 産生抑制は生理的に意義深い。

以上の研究は、翻訳後修飾による RIG-I シグナルの調節機構の一端を解明するものであるとともに、複雑に絡み合う自然免疫ネットワークの全容に影響を与えるものである。すなわち、本論文はウイルス学の進展をすすめる意義を有するだけでなく、免疫学の新たな理解に寄与するところが大きい。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文としての価値があるものとみとめる。なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 1 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降