

され、そのようなメカニカルストレスのシグナルを細胞内に伝えることが明らかになった。これらのメカニカルストレスのシグナルを解明することは、これらの疾患の研究において重要な課題である。

Src ファミリーの各組織における機能を正確に理解するには、その場でリン酸化を受ける基質の同定と、基質が下流に伝えるシグナルを明らかにすることが極めて重要である。その方向からのアプローチが遅れている背景には、このような基質蛋白質の機能解析に現在主流となった DNA チップのような発現量解析では情報を得るのが難しい幾つかの情報、すなわち 1) 蛋白質のチロシンリン酸化の状態、2) 蛋白質の複合体形成とその結合相手、3) 蛋白質の細胞内局在、等の情報が必要不可欠である事がある。我々はこの目的の遂行のために効率的にチロシンリン酸化を含む蛋白質群を精製し、質量分析に持ち込むため新しい技術の開発を行ってきた。この手法と、プロテオーム解析や古典的な細胞生物学的解析をうまく組み合わせる研究を押し進めることにより、各種刺激により骨・軟骨細胞に起こる細胞内変化に蛋白質発現-蛋白質修飾-複合体形成-細胞内局在の 4 つの側面からアプローチし、その結果を総合的に評価して実際に起きている現象を理解することを試みる。また、蛋白質の解析にはサンプル量が増やせることが必要になってくる場合が多いので、機能を解析する実験は骨肉腫細胞を初めとする固形腫瘍細胞を用いて、骨・軟骨系においても高発現している個々の Src の基質群の機能の詳細を明らかにして、骨・軟骨系のモデル系を構築することを行ってきた。

最終的には骨・軟骨細胞系における Src ファミリーの活性化、各々の基質分子のリン酸化のメカニズムと、その媒介する細胞内シグナルの情報に基づいて、破骨細胞の細胞内 Src キナーゼ活性あるいは

シグナルの制御により、その機能を調節する系をデザインする。

以上のような解析により、病態と Src ファミリーのシグナルの関わりをできる限り正確に把握し、骨粗鬆症・OA の診断や、分子レベルでの治療法の開発に結びつけることをめざすものである。

B. 研究方法

これまで何年間も続けてきたリン酸化蛋白質の総合的解析の過程で、疾患に関わる数多くの Src キナーゼの基質分子の発現変化やチロシンリン酸化の変化を見だし、その機能解析を行ってきたが、疾患治療のための分子標的を見つけるといふ最終的な目的に沿って、その中から骨軟骨系において極めて重要な役割を果たす可能性のある幾つかの蛋白質をこの最後の 1 年研究を進めてきている。

(1) コルタクチンのチロシンリン酸化の役割

種々の細胞において RNAi によってコルタクチンの発現を抑制して生物学的機能を解析する実験を行っていたが、スキルス胃がんの細胞においてコルタクチンの発現抑制が細胞運動能に大きな影響を与えることが分かった。ただ、面白いことにコルタクチンのチロシンリン酸化の状態によって発現抑制の効果が大きく異なることに気づいた。このようなチロシンリン酸化の有無によるコルタクチンの働きの変化は podosome におけるコルタクチンの役割の解析でも報告されていることで、そのメカニズムに興味を持って解析を進めた。

具体的にはチロシンリン酸化したコルタクチンを抑制したときに細胞内のチロシンリン酸化蛋白質の変化を解析し、複合体形成や局在解析などによりチロシンリン酸化したコルタクチンの働きについて Cas との関わりで新たな知見を得ることができた。

(2) メカニカルストレスと Src の基質分

子 Cas との関わりを解析

その Cas は 1) インテグリンシグナルにおける Src の主要な基質として破骨細胞の分化・機能維持に重要である。2) エストロゲン受容体と直接結合してその nongenomic 作用に関わる分子である可能性がある。3) 乳癌における BCAR1/Cas の過剰発現が、タモキシフェン耐性獲得につながる、等のこれまでの研究から、骨粗鬆症や変形性関節症等の骨・軟骨疾患においても、その成因に関与するのではないかと以前から考えていた。そのため、単純に RNAi を用いた発現抑制を用いて Cas のシグナルが腫瘍の特性にどのような影響を与えているか解析するとともに、Src との結合部位のみを発現するアデノウイルスベクターを用いて、Src から Cas に来るシグナルだけを選択的にブロックする系の樹立を試みてきた。一方で、米コロンビア大学の澤田泰宏先生との共同研究で、細胞に物理的な外力すなわちメカニカルストレスをかけたときに、細胞内の Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が大きく変化する現象について解析を進めてきた。そのようなメカニカルストレスのシグナル伝達における Cas 蛋白質の役割を、澤田先生の開発した細胞外基質の伸長による解析法と、我々の樹立した Cas の各ドメインに対する抗体やリン酸化特異的抗体、RNAi の手法を用いて解析を進めた。

(3) ephrin-B 1 のマトリックスメタロプロテアーゼ分泌における新規の役割

ephrin-B ファミリーはもともと受容体型チロシンキナーゼである Eph のリガンドとして取られたものであるが、それ自体が膜貫通領域を持ち、Src によってチロシンリン酸化を受けることから、Src の基質としての機能に興味を持たれてきた。ephrin-B ファミリーの分子の中でも ephrin-B1 は骨肉腫細胞の転移性とその発現量に相関を認め、またヒトにおける遺伝子変異は頭蓋骨形成異常などの異常が

見られ、発生過程で神経堤由来の細胞の運動能や運動方向を制御していると考えられる。最近、破骨細胞の細胞膜で発現する ephrin-B と骨芽細胞の表面で発現する EphB が細胞間接着により同時に活性化され、破骨細胞を分化誘導の方向に、骨芽細胞を分化抑制の方向に導くことが示され、骨代謝における EphB と ephrin-B の重要性があらためて浮き彫りになった。

我々も Src キナーゼの基質としての ephrin-B1 の機能については以前から幅広く研究を進めてきており、ephrin-B1 が EphB の刺激に応じて Rac 蛋白質の活性化を引き起こし細胞運動の制御に関わること、細胞膜上の claudin と結合して EphB の刺激無しにも細胞間接着によるチロシンリン酸化を引き起こし、細胞間接着の程度を調節する働きがあること、等を見出し報告してきた。最近になって 2 細胞間の EphB と ephrin-B の相互作用で起こる生理作用についてさらに解析を進めたところ、ephrin-B1 が EphB の刺激によって特定のメタロプロテアーゼ分泌を促すことがわかった。ephrin-B1 によってメタロプロテアーゼ分泌が制御されるという観察は、それを発現する破骨細胞においても極めて重要な機能と考えられるので、そのメカニズムの詳細について解析を拡げた。

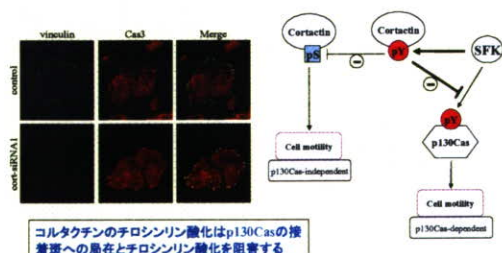
C. 研究結果

(1) コルタクチンのチロシンリン酸化の役割

コルタクチンは、胃がん細胞に普遍的に発現しているが、そのチロシンリン酸化レベルには大きな違いが認められた。チロシンリン酸化レベルが低い一群のスキルス胃がん細胞ではコルタクチンの抑制は細胞運動能の低下をもたらした。これに対しチロシンリン酸化レベルが高い細胞群では RNAi によるコルタクチンの発現抑制がさらに細胞運動能の亢進を引き起こした。この際に細胞内のチロシン

リン酸化蛋白質の変化を観察すると、コルタクチンの発現低下に伴って 130kD の蛋白質のチロシンリン酸化が顕著に誘導されることに気づいた。分子量とバンドの形状からこの蛋白質が Cas ではないかと推測し、特異的抗体を用いて解析したところ、実際に Cas のチロシンリン酸化が強く誘導されていた。コルタクチンのチロシンリン酸化の少ない MCF-7 細胞に Fyn キナーゼを入れてコルタクチンのチロシンリン酸化を誘導した際も、コルタクチンの RNAi により Cas に同様の変化が認められた。共焦点レーザー顕微鏡による観察ではチロシンリン酸化したコルタクチンがピンキュリンと共局在して接着斑にいると考えられるが、この状態で Cas の接着斑への局在とそこにおけるチロシンリン酸化が抑えられており、コルタクチンの発現抑制とともに一部の Cas 蛋白質が接着斑に移動しチロシンリン酸化されることが観察された。Cas が細胞運動に重要な蛋白質であることは、我々を含め多くのグループが既に報告しており、コルタクチンの機能の少なくとも一部は Cas と競合して、それを接着斑から排斥することによるのではないかと考えられた(図 1)。

図1 コルタクチンのチロシンリン酸化による細胞運動能の阻害

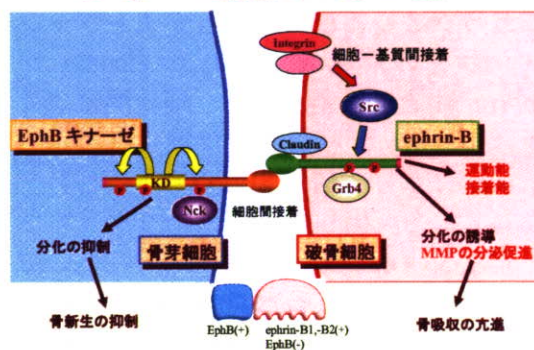


(2)メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関りの解析

Src キナーゼが活性化した癌細胞などでは Cas 蛋白質の広範な恒常的なリン酸化が観察されるが、正常細胞における Cas 蛋白質のチロシンリン酸化は、接着斑な

どにごく限られた部位に局限してみられる。線維芽細胞などで細胞の足場をストレッチすることにより、メカニカルストレスを加えると、Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進することが観察されるが、昨年までの解析で Cas が実際に外力により伸長しうる構造であることが示された。またストレッチによる刺激で活性化される Rap1 蛋白質などの活性は、Cas 蛋白質の発現を RNAi の手法により抑えることでストレッチによる活性化が抑えられるので、Cas 蛋白質が外力による細胞の伸長を分子の構造変化として受け止め、Src キナーゼによるリン酸化の受けやすさが変化することにより、下流にメカニカルストレスのシグナルを伝える分子であることが明らかになった(図 2)。

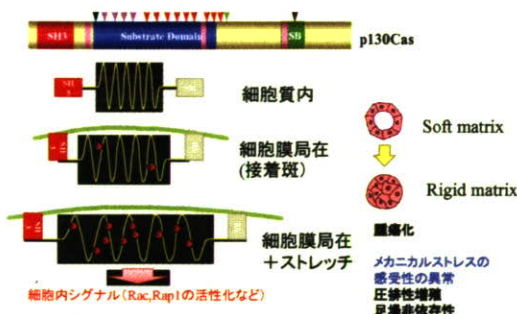
図2 ephrin-Bの破骨細胞における活性化と機能



いくつかの癌細胞においてもストレッチによる Cas 蛋白質のチロシンリン酸化の変化を解析しているが、細胞を Confluent の状態で細胞間接着が強い状態でのストレッチにより Cas のチロシンリン酸化が誘導されることが実際に観察された。このような癌細胞において Cas のリン酸化依存的シグナルを抑える変異体 Cas-CT の影響を解析している。これまでの解析でこの領域(Cas-CT)を欠損した変異体は Src との結合能を失うばかりでなく、チロシンリン酸化のレベルも顕著に低下することが分かっている。Cas-CT をアデノウイルスを用いて大量に発現する系を用いて Cas から伝わるシグナルを選択的にブロックすることにより、造腫

瘍能やメカニカルストレス受容の変化を観察して Cas の下流シグナルの生物学的意義をさらに解析している(図 3)。

図3 Srcの主要基質Casによるメカニカルストレスの受容機構



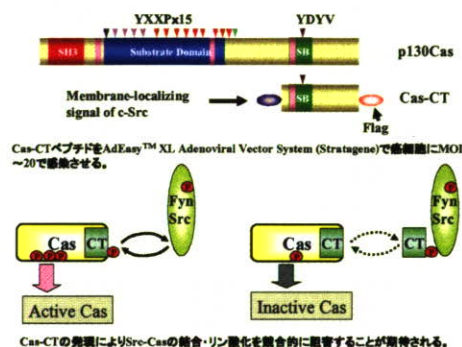
(3) ephrin-B 1 のマトリックスメタロプロテアーゼ分泌における新規の役割

これまでに ephrin-B1 のリン酸化メカニズムや、新規の結合分子の同定などから、Src の基質としての ephrin-B1 の機能に迫ろうとしてきた。最近タイトジャンクションの構成成分である claudin が ephrin-B1 と結合能を持ち、細胞間接着に伴い claudin が膜表面に集積することで ephrin-B1 がリン酸化するという新しいメカニズムを見出した。このような受容体を介さない ephrin-B1 の活性化は、他の機序によっても起こると考えられ、その 1 つとして細胞-基質間接着でインテグリンが活性化することにより、Src ファミリーを介して ephrin-B1 がリン酸化するメカニズムがあると考えている。

ephrin-B1 を高発現する膵癌細胞で、EphB の刺激により ephrin-B1 の細胞外ドメインの切断が著明に誘導されることを発見した。各種阻害剤を用いてその切断がマトリックスメタロプロテアーゼ、特に MMP8 の働きによることが分かった。ところが、EphB で細胞を処理しても MMP8 の mRNA や蛋白質レベルでの変動は認められず、蛋白質合成阻害剤を用いてもその切断はブロックできなかったことから、このような MMP8 の活性化は転写・翻訳の活性化を伴わないシグナルによるものではないかと考えられた。実際、

細胞外への MMP8 の分泌は EphB によって誘導され、分泌の阻害剤などでブロックされた。以上のことから、ephrin-B1 は EphB の刺激によってマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を誘導するという新しい機能が明らかになり、現在そのシグナルの解明を急いでいる。破骨細胞に発現する ephrin-B1 も骨芽細胞と接触するなどの刺激でマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を介してその機能に関わることが示唆された(図 4)。

図4 Srcの主要基質CasのC末ペプチドによるSrc-Casシグナルブロック



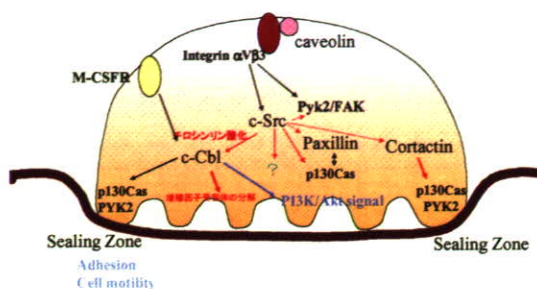
実際に胃癌の細胞株を使って ephrin-B1 を RNAi で抑制すると細胞運動能や浸潤能が顕著に低下し、逆に過剰発現により細胞運動能が増加することが確認された。実際に胃癌細胞の腹腔内注射による腸間膜に対する播種の程度や、同所性に胃の粘膜下に移植した際の、漿膜側への浸潤の速度などが、ephrin-B1 の発現で著明に亢進することが明らかになった。ephrin-B1 による癌の浸潤能の獲得は、メタロプロテナーゼの分泌、細胞運動能の亢進、細胞間接着の抑制等複数の因子によるものと考えられ、同じようなメカニズムによる機能制御が同様に ephrin-B1 を発現する破骨細胞にもあるのではないかと考え研究を進めている。

D. 考察

元来、Src キナーゼはレトロウイルスの中で恒常的に活性化した形になることで腫瘍性異常増殖の原因分子として同定されたもので、正常の Src 蛋白質は細胞の秩

序の取れた増殖や運動を維持する働きがあると考えている。正常細胞では、細胞内の限られた場所で、限られた時間の間活性化することで細胞を正しくコントロールするので、必要がない状態では非活性化型として存在している。活性が強く遷延する場合には腫瘍のような異常増殖につながるし、一方活性或いは蛋白質それ自体が無くなった場合にも、その臓器に他の Src ファミリーの相補的作用がなければ各種の病態を引き起こしうる。その中でもノックアウトマウスの解析から、破骨細胞では Src ファミリーのうち c-Src が機能維持に中心的な役割を果たしていることが明らかになっている。ただ Src ファミリーに属する Fyn や Yes なども広範な組織において発現を認めるため、骨芽細胞・軟骨細胞など他の細胞系において役割を果たしている可能性があるが、現時点では Src ファミリーの使い分けについては明らかになっていない部分が多い。Src ファミリーキナーゼはチロシンキナーゼの酵素としてその生理機能を発揮すると考えられるが、数多くの分子が潜在的に Src ファミリーの基質となりうる。骨・軟骨系において発現する Src ファミリーキナーゼが、臓器特異的に、そして機能特異的に多くの基質のチロシンリン酸化に関わっていると考えられるが、どの基質がどのような骨・軟骨の機能を制御しているのかは未だに明らかにされていない場合が多い。Src キナーゼの基質 c-Cbl や Cas もう一つのチロシンキナーゼ Pyk2 が c-Src の下流分子として機能すること、主として Sealing Zone で $\alpha V\beta 3$ インテグリンを介した細胞接着シグナルが Src、Pyk2、Cas、c-Cbl、Paxillin 等からなるシグナル複合体によって伝えられること等が破骨細胞が機能を発揮するために重要であると考えられており、我々のデータもこれらの分子の重要性を指示している。これまでに分かっている Src を介した破骨細胞のシグナル伝達を図5にまとめる。

図5 破骨細胞におけるSrcを介したシグナル伝達



本研究で骨肉腫細胞の解析をきっかけに焦点を当てることとなった接着班に関連する分子 Cas は、Src チロシンキナーゼの主要な基質として破骨細胞においても高い発現レベルを持つばかりか、常時チロシンリン酸化をしていることが報告されており、シグナルの調節機構などは細胞がん化等との関わりで研究が進んでいるので、破骨細胞におけるコンディショナルノックアウトの解析が待たれる。

Podsome の構成成分としてのコルタクチンの機能は1) チロシンリン酸化がその機能に対し抑制的に働くことが示唆される。2) Cas という Src キナーゼの他の基質を抑制的に制御することにより機能する。以上の2つの点で特徴的である。コルタクチンは極めて多機能な蛋白質であるため分子標的には向かない可能性があるが、骨・軟骨系の代謝制御を理解する上でこれからさらに重要性が増す可能性がある。

E. 結論

今回の研究対象である細胞機能を制御するリン酸化蛋白質群の解析は、通常のマイクロアレイ法や2次元スポット解析だけでは手の届かない分野である。治療薬開発の面でも、実際の標的となる蛋白質を発現解析からだけでなく、リン酸化等の修飾とそれによる複合体形成の変化等の解析から正確に理解することはきわめて重要なことであると考えられる。

骨粗鬆症や変形性関節症等のような老化等の過程で起こる代謝性変化は、一つないし数個の原因遺伝子が引き金になると考えるよりも、いくつかの蛋白質の量的な変化により、バランスが取りきれなくなった状態と考えられる。その意味で疾患の状態を生み出しているエフェクターとしての遺伝子群が重要になると考える。

今回明らかにしたコルタクチン、Cas、ephrin-Bなどの機能に基づいてSrcキナーゼに関わる細胞内シグナル伝達分子の分子間結合を阻害することにより破骨細胞の機能やアポトーシスに関わるシグナルを選択的にブロックすることが可能になると考える。現在、癌などの分野で進められているSrcのチロシンキナーゼ阻害剤を用いた研究と比較しても、細胞内のシグナル媒介・調節分子によるチロシンキナーゼシグナルの制御が実現すれば、その特異性においてはるかに優れているため、副作用の少ない薬剤の開発につながる可能性が高いと期待している。今後最も重要な点は、骨・軟骨代謝・機能の特異的かつ適切な程度に阻害する分子の設計と、長期間それを全身にデリバリーするための方法論の確立であろう。

F. 発表

1. 論文発表

1. Tanaka, M., Kamata, R., Takigahira, M., Yanagihara, K., Sakai, R.: Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhous carcinoma. *Am J Pathol* 171, 68-78, 2007.
2. Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Sakai, R.: Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J Cell Sci* 120, 2179-2189, 2007.
3. Uekita, T., Jia, L., Narisawa-Saito, M., Yokota, J., Kiyono, T., Sakai, R.: CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol Cell Biol* 27, 7649-7660, 2007.
4. Tazaki, T., Miyazaki, K., Hiyama, E., Nakamoto, T., Sakai, R., Yamasaki, N., Honda, Z., Noda, M., Miyasaka, N., Sueda, T., Honda, H.: Functional analysis of Src homology 3-encoding exon (exon 2) of p130Cas in primary fibroblasts derived from exon 2-specific knockout mice. *Genes Cells* 13, 145-157, 2008.
5. Jia, L., Uekita, T., Sakai, R.: Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of Cas. *Mol Cancer Res*, in press.

2. 学会発表

【国際学会】

1. Uekita, T., Lin, J., Sakai, R.: CDCP1 regulates anoikis resistance in human lung adenocarcinoma. 7th AACR/JCA Joint International Conference, Hawaii, USA (2007.1.21-27)
2. Sakai, R., Uekita, T.: CDCP1 regulates anoikis resistance in human lung adenocarcinoma Mechanisms & Models of Cancer Meeting, San Diego, USA (2007.8.8-12)
3. Sakai, R., Uekita, T.: CDCP1 regulates metastatic potential of human cancers through anoikis resistance. The 12th Korea-Japan Cancer Research Workshop, Sapporo, Japan (2007.12.21-22)

【国内学会】

1. 二見仁康、堺隆一：神経芽腫における受容体型チロシンキナーゼ RET の役割の検討 (2007.10.3-5) 第66回日本癌学会総会 (横浜)
2. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一：分子標

- 的としての ephrin-B1 信号伝達
(2007.10.3-5) 第 66 回日本癌学会総会
(横浜)
3. 上北尚正、田中正光、柳原五吉、堺隆二 : CDCP1 はスキルス胃がんの腹膜播種の制御に関する因子である
(2007.10.3-5) 第 66 回日本癌学会総会
(横浜)
4. 三宅泉、堺隆一 : 神経芽腫細胞の分化機構における ShcA および ShcC の機能について (2007.10.3-5) 第66回日本癌学会総会 (横浜)

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究)
分担研究報告書

骨粗鬆症・変形性関節症疾患遺伝子としての
新しい遺伝子情報制御因子、標的因子の検索と機能解析

分担研究者 津久井 通
埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 講師

【研究要旨】

変形性関節症は、慢性の関節炎を伴う関節疾患で、関節の軟骨領域の退行変性により、軟骨・骨領域の破壊、増殖変性変化をきたす疾患である。本年度は変形性関節症疾患遺伝子について、その疾患因子候補としてのエストロゲン受容体遺伝子改変マウスを作製した。これらのトランスジェニックマウスをコンディショナルに軟骨組織で過剰発現させる系を確立し、遺伝子情報制御因子の生体での機能解析を行った。エストロゲンと変形性関節症(OA: Osteoarthritis)との関係は、古くから閉経後の女性で OA の有病率が増加することから、エストロゲンと OA との関与の可能性が考えられてきたが、未だ不明な点が多い。エストロゲンシグナルを非リガンド依存的に活性化できるエストロゲンの変異レセプター(caER α および caER β)を軟骨組織で過剰発現することにより、エストロゲンシグナルの軟骨組織・膝関節における作用の関与を示唆した。一方、エストロゲンシグナルの欠乏における軟骨組織・膝関節の作用について検討した結果、軟骨組織形成・代謝作用への関与を示し、生理的にエストロゲンシグナルが、軟骨組織・膝関節に作用することが示唆された。

A. 研究目的

関節症は、我が国では急速な少子高齢化が進むにつれて増加傾向にあり、社会問題として考えることができる。厚生労働省の2004年の調査によると要介護・要支援となる原因のそれぞれ6.1・17.5%が関節症である。変形性関節症(OA)の罹患者数については、数千万人規模と推定されており関節症の研究は高齢者のQOLや将来的な医療費の抑制の観点からも急務に対応すべき研究課題と考えられる。

最近の報告では、エストロゲンシグナルと変形性関節症の関連についての報告として、その代謝物の血中濃度とOAとの

関与が示唆されている。また骨粗鬆症の治療薬としてその有効性または可能性が高いことが報告されている物質について、カルシトニン、ビタミンD、ビタミンK、PTH、エストロゲン、ビスホネートが考えられており、また実際に臨床におけるデータよりその有効性が示されているが、その作用機序・骨代謝以外のリスク等については、未だ不明な点が多く生体内での機能解析が必須と考えられる。これらの生体内での作用メカニズムを分子レベルで解明し、変形性関節症・骨粗鬆症疾患遺伝子の検索、シグナル伝達、および相互作用に関する研究を行うことで、新

規の治療法および創薬の可能性を示すことが、今後の重要な研究課題と考えられる。変形性関節症は、“痛み”を伴う骨疾患で、高齢者の健康長寿を脅かす大きなリスクファクターと考えられる。

本研究課題における分担項目として、エストロゲンシグナル関連遺伝子について、遺伝子改変マウスを解析することにより、動物個体を利用することでしか得られない、重力化での骨・軟骨代謝における生体機能、薬剤の効果・影響について個体丸ごとを活用した系で検討できる点が遺伝子改変マウスを使用する利点と考えられる。その際、実際に骨・軟骨代謝で重要と考えられる候補因子群について、マウスで遺伝子改変を行った場合、これらの個体においては、種々の理由(例えば、軟骨形成異常、肺呼吸不全、授乳不可能等)から胎生期で致死となる可能性が高く、遺伝子改変マウスをライン化して、再現性および信頼できるデータとして吟味することが困難であった。それら問題点を改善するため、本研究課題では、コンディショナルトランスジェニック(cTg)マウスシステムを開発し、個体での網羅的な解析を行う。

最終目的は、本研究課題により明らかにされると期待できる候補因子群を同定し、これらの因子群の生体内における骨・軟骨作用を解明し、これらの因子の相互作用やシグナル伝達に関する研究を通して、違う作用点を持つと考えられる新規因子について分子レベルで骨粗鬆症・変形性関節症を体系的に解明することである。さらに、本研究課題で作製される遺伝子改変モデル動物を利用して、これらの因子の骨・軟骨代謝における生体作用、病態のメカニズム、治療法への応用性を検討し、早期診断マーカーへの応用や治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に貢献することを目指した。

B. 研究方法

分担者の研究分担項目のうち、骨粗鬆症疾患・変形性関節症の関連因子として考えられるエストロゲン等の遺伝子情報制御因子について遺伝子改変動物を作製し、その動物個体における骨作用について解析を行った。特に分担者は、本年度にエストロゲン関連因子としてのエストロゲンレセプター(ER α およびER β)を介する生体での骨・軟骨作用について焦点を絞り解析を行う。分担研究者は新規遺伝子情報制御因子・標的因子候補としてエストロゲンシグナル関連因子を網羅的に解明するために、本研究課題での分担項目として以下の研究を行う。

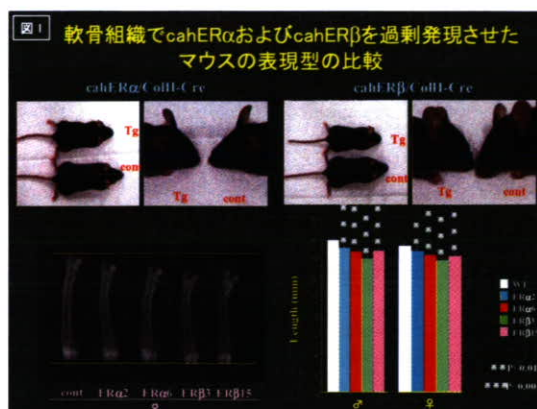
疾患遺伝子および標的遺伝子群の候補について、生体におけるgain of functionを行う実験系の確立、および遺伝子改変モデル動物の作製を行うことにより、エストロゲンシグナルの骨組織における作用メカニズムおよび病態メカニズム解明、最終的に治療法の確立を目指す。以上の研究課題を遂行するために、先ず具体的に大きく分けると3つ研究材料が必要となり、これらの材料および疾患モデル動物の作製を行い、さらにこれらの生きた試薬を交配により、軟骨組織特異的に特定因子を過剰発現させることで、生体内の作用機序に迫る。

1. 活性型caER α 、およびcaER β Tgマウスの作製およびその解析
 2. 骨組織または肝臓特異的に遺伝子改変するための組換え酵素Creを発現するマウスの準備および実験系の確立
 3. エストロゲンシグナル欠乏マウス
- 1, 2および3で作製した遺伝子改変マウスを準備することにより、軟骨組織特異的にgain of functionする系およびエストロゲンシグナル欠乏マウスのモデル系を確立し、エストロゲンシグナルによる生体での軟骨代謝作用について検討する。

C. 研究結果

エストロゲンシグナルと変形性関節症

エストロゲンシグナルに関する、生体内の骨・軟骨代謝における作用については、選択的にER α またはER β シグナルをgain of functionすることが可能な、cTgマウスの作製を行い、軟骨組織でER α またはER β を過剰発現可能な系を確立した。変形性関節症(OA)は、閉経後女性において多く発症しエストロゲン欠乏との関与が推測されているが、その病態メカニズムは未だ明確ではない。それ故、本年度は特に、エストロゲンシグナルと軟骨作用およびOAとの関係について、その病態メカニズムの解明を目指すテーマに焦点を絞って研究を遂行した。多くのOAを呈するマウスモデルは、II型コラーゲンの遺伝子変異およびタンパク質変性を伴うことが原因で起こることが知られている。第1に、軟骨とエストロゲンシグナルの作用について検討した。マウスの内在性のER α およびER β は、発生初期の肥大軟骨で発現していることを見いだした。エストロゲンの作用としては、性成熟期や二次性徴段階の骨の成長や骨端線閉鎖に生理的な作用があると想定される。本研究では、軟骨、特にII型コラーゲンとエストロゲンシグナルの作用について検討するために、II型コラーゲン(CollII)-CreマウスとcTgマウスの交配を行った。ER α およびER β シグナルを過剰発現したマウスでは、同じ成長不全を伴う表現型が得られていることより、骨長の制御や骨の成長に作用していることは明らかと考えられる(図1)。また、3週齢幼若マウスにおいて骨組織での表現型の解析を行った結果、頭蓋形成異常、頸椎不全、体長の短縮、骨長への作用の可能性が示唆された(図2)。さらに、時系列的に成熟マウス(15週齢♀)における膝関節領域の解析を行った結果、対照区では、一般的には脂肪層と細胞外マトリックスで満たされた領域により膝関節でのスムーズな歩行運動が可能と考



えられるが、ER β シグナルを過剰発現したマウスの十字靭帯では、脂肪層の顕著な減少が観察された。ER α シグナルを過剰に発現した区においては、II型コラーゲンの減少および関節軟骨の脱落を呈した表現型が得られた。一方、ER β シグナルを過剰に発現した区では、関節軟骨の減少はなく、関節軟骨の脱落が観察できる表現型を示すマウスが得られた。ER α およびER β それぞれ違う軟骨作用を持つ可能性が示唆され、典型的なOA様の表現型を示し、エストロゲンシグナルによる軟骨作用とOAとの関与が示唆された。

エストロゲンシグナル欠乏と軟骨代謝作用に関しても検討を加えている。エストロゲンシグナルと軟骨代謝の関連が示唆される所見を得つつあり、今後の解析が注目される。予備的な結果として、エストロゲンシグナルの欠乏により正常な軟骨代謝作用が維持できないことが観察された。

D. 考察

エストロゲンシグナルと変形性関節症(OA)との関係については、リンガンド非依存性の変異エストロゲンレセプターcaER α およびcaER β を軟骨組織において過剰発現した場合、胎生期から未成熟期において軟骨の成長や骨長への作用が示唆された。また、成熟期でも15週齢と若い週齢においても、ER α およびER β シグナルを過剰発現したマウスでは、膝関節において典型的なOA様の表現型を示す個体が得られた。しかしER α およびER β シグナルの軟骨作用に違いがあることが観察され、エストロゲンとOA発症の関与については、関節腔や関節軟骨等、ER α およびER β シグナルそれぞれで別の作用があると考えられ、多段階的に関与することが考えられる。一方、エストロゲンシグナルの欠乏とOAの関係に関しても病的な変化が観察された。遺伝子発現変化の検討からエストロゲンシグナルが直接的もしくは間接的に軟骨作用をもつことが示唆された。将来的な研究展開としては、エストロゲンシグナルの軟骨作用およびOA発症の分子レベルでの作用メカニズムの解明が重要と考えられる。

E. 結論

エストロゲンシグナルと変形性関節症(OA)との関与については、軟骨組織でエストロゲンシグナルを過剰発現した場合、マウス個体においてOA様の表現型を示すことが観察され、またエストロゲンシグナル欠乏でも病的所見が見出され、軟骨組織におけるエストロゲンシグナルの破綻が細胞の分化・増殖、もしくはコラーゲン、細胞外マトリックス、および脂肪等の分解・合成関連因子と作用する可能性が示唆され、エストロゲンシグナルがOAの発症に関与することが示唆された。

F. 発表

1. 発表論文

1. Tsukui, T., Imazawa, Y., Inoue, S.: Molecular mechanism of vitamin K and its regulators in bone metabolism. *Clin Calcium* 17, 1685-1691, 2007.
2. Ito, M., Muraki, M., Takahashi, Y., Imai, M., Tsukui, T., Yamakawa, N., Nakagawa, K., Ohgi, S., Horikawa, T., Iwasaki, W., Iida, A., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., Miyado, K., Kono, T., Hosoi, Y., Saito, H.: Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. *Fertil Steril*, in press.

2. 学会発表

1. 今澤由紀子、津久井通、井上聡：エストロゲンシグナルにおける軟骨代謝作用：II型コラーゲンプロモーターを利用したER α およびER β コンディショナルトランスジェニックマウスの解析 (2007.7.19) 第25回日本骨代謝学会学術集会 (大阪)
2. 津久井通、今澤由紀子、井上聡：ビタミンK依存性 gamma-carboxylase のコンディショナルトランスジェニックマウスにおける肝臓を介した骨代謝作用の解析 (2007.7.27) 第5回RCGMフロンティアシンポジウム(埼玉)
3. 今澤由紀子、津久井通、井上聡：II型コラーゲンプロモーターを利用したER α 及びER β コンディショナルトランスジェニックマウスの解析 (2007.7.27) 第5回RCGMフロンティアシンポジウム(埼玉)
4. 今澤由紀子、津久井通、井上聡：軟骨代謝におけるエストロゲンシグナル作用の解析 (2008.1.10) 第3回Bone Forum in Hanno (埼玉)

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

IV-	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1	Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, <u>Inoue S</u> , Jung JU	TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity.	<i>Nature</i>	446	916-921	2007
7	Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, <u>Inoue S</u>	Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells.	<i>J Mol Endocrinol</i>	39	239-247	2007
16	Urano T, Shiraki M, Narusawa K, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women.	<i>Spine</i>	32	25-29	2007
21	Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in the WISP1 gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women.	<i>J Bone Miner Metab</i>	25	253-258	2007
27	Fujita M, Sugama S, Nakai M, Takenouchi T, Wei J, Urano T, <u>Inoue S</u> , Hashimoto M	α -synuclein stimulates differentiation of osteosarcoma cells: Relevance to downregulation of proteasome activity.	<i>J Biol Chem</i>	282	5736-5748	2007
40	Ezura Y, Nakajima T, Urano T, Sudo Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, <u>Inoue S</u> , Shiraki M, Emi M	Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women.	<i>Bone</i>	40	997-1005	2007
49	Usui T, Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in Wnt10b gene with bone mineral density.	<i>Geriatric Gerontol Int</i>	7	48-53	2007
55	Kinoshita H, Nakagawa K, Narusawa K, Goseki-Sone M, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Yoshida H, Okano T, Nakamura T, Suzuki T, <u>Inoue S</u> , Orimo H, Ouchi Y, Hosoi T	A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Glu) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women.	<i>Bone</i>	40	451-456	2007

61	Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, <u>Inoue S</u>	Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis.	<i>Oncogene</i>	26	4453-4463	2007
72	Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, <u>Inoue S</u>	Increased expression of Estrogen-Related Receptor α (ERR α) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer.	<i>Int J Cancer</i>	120	2325-2330	2007
78	Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Yagi K, Okazaki Y, <u>Inoue S</u>	Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	358	813-818	2007
84	Kumagai J, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Blumberg B, <u>Inoue S</u>	Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer.	<i>Prostate</i>	67	1029-1037	2007
93	Ikeda M, <u>Inoue S</u> , Muramatsu M, Minatogawa Y	Characterization and identification of a steroid receptor-binding protein, SRB-RGS.	<i>Biol Pharm Bull</i>	30	1056-1064	2007
102	Suzuki T, Urano T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Horie K, <u>Inoue S</u> , Sasano H	Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor.	<i>Cancer Sci</i>	98	644-651	2007
110	Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, Kawasaki I, Gehlbach PL, Awata T, Yoneya S, Okazaki Y, <u>Inoue S</u>	Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population.	<i>J Hum Genet</i>	52	636-641	2007
116	Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in the steroid and xenobiotic receptor (SXR) gene (IVS1-579A/G) with bone mineral density.	<i>Geriatric Gerontol Int</i>	7	104-109	2007
122	Horie-Inoue K, <u>Inoue S</u>	Steroid and xenobiotic receptor mediates a novel vitamin K2 signaling pathway in osteoblastic cells.	<i>J Bone Miner Metab</i>	26	9-12	2008

126	Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women.	<i>Spine</i>	in press		
138	Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, <u>Kato S</u>	Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase.	<i>Nature</i>	446	562-566	2007
143	Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, <u>Kato S</u>	Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts.	<i>Cell</i>	130	811-823	2007
156	Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K, Mihara M, Nakamura T, Akimoto C, Yamamoto Y, Katagiri T, Foulds C, Takezawa S, Kitagawa H, Takeyama K, O'Malley BW, <u>Kato S</u>	DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of MicroRNAs.	<i>Nat Cell Biol</i>	9	604-611	2007
174	Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Igarashi M, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, <u>Kato S</u>	A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR- γ transactivation.	<i>Nat Cell Biol</i>	9	1273-1285	2006
195	Takezawa S, Yokoyama A, Okada M, Fujiki R, Iriyama A, Yanagi Y, Ito H, Takada I, Kishimoto M, Miyajima A, Takeyama K, Umesono K, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor function.	<i>EMBO J</i>	26	764-774	2007

206	Igarashi M, Yogiashi Y, Mihara M, Takada I, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Vitamin K induces osteoblast differentiation through PXR-mediated transcriptional control of the Msx2 gene.	<i>Mol Cell Biol</i>	27	7947-7954	2007
214	Kitagawa H, Ray WJ, Glantschnig H, Nantermet PV, Yu Y, Leu CT, Harada SI, <u>Kato S</u> , Freedman LP	A regulatory circuit mediating convergence between nurr1 transcriptional regulation and Wnt signaling.	<i>Mol Cell Biol</i>	27	7486-7496	2007
225	Miyamoto J, Matsumoto T, Shiina H, Inoue K, Takada I, Ito S, Itoh J, Minematsu T, Sato T, Yanase T, Nawata H, Osamura RY, <u>Kato S</u>	Pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit.	<i>Mol Cell Biol</i>	27	4807-4814	2007
233	Kim M-S, Fujiki R, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	1 α ,25(OH) ₂ D ₃ -induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene.	<i>Mol Cell Endocrinol</i>	265-266	168-173	2007
239	Kitagawa H, Yamaoka I, Akimoto C, Kase I, Mezaki Y, Shimizu T, <u>Kato S</u>	A reduction state potentiates the glucocorticoid response through receptor protein stabilization.	<i>Genes Cells</i>	12	1281-1287	2007
246	Yamaoka K, Shindo M, Iwasaki K, Yamaoka I, Yamamoto Y, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR.	<i>Arch Biochem Biophys</i>	460	166-171	2007
252	Sato S, Kojima M, Hanada R, Kimura A., Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, <u>Kato S</u> , Kangawa K, Shinomiya K, Takeda S	Central control of bone remodelling by Neuromedin U: a mediator of the leptin-dependent regulation of bone formation.	<i>Nat Med</i>	13	1234-1240	2007
259	<u>Kato S</u> , Fujiki R, Kim M-S, Kitagawa H	Ligand-induced transrepressive function of VDR requires a chromatin remodeling complex, WINAC.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	103	372-380	2007
268	Kittaka A, Saito N, Honzawa S, Takenouchi K, Ishizuka S, Chen TC, Peleg S, <u>Kato S</u> , Arai MA	Creative synthesis of novel vitamin D analogs for health and disease.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	103	269-276	2007

276	Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober HJ, Okamoto K, Nishizawa K, Latz E, Golenbock DT, Aoki K, Ohya K, Imai Y, Morishita Y, Miyazono K, <u>Kato S</u> , Saftig P, Takayanagi H	Catheptin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis.	<i>Science</i>	319	624-627	2008
280	Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, <u>Sakai R</u>	Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells.	<i>J Cell Sci</i>	120	2179-2189	2007
291	Tanaka M, Kamata R, Takigahira M, Yanagihara K, <u>Sakai R</u>	Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhous carcinoma.	<i>Am J Pathol</i>	171	68-78	2007
302	Uekita T, Jia L, Narisawa-Saito M, Yokota J, Kiyono T, <u>Sakai R</u>	CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma.	<i>Mol Cel Biol</i>	27	7649-7660	2007
314	Tazaki T, Miyazaki K, Hiyama E, Nakamoto T, <u>Sakai R</u> , Yamasaki N, Honda Z, Noda M, Miyasaka N, Sueda T, Honda H	Functional analysis of Src homology 3-encoding exon (exon 2) of p130Cas in primary fibroblasts derived from exon 2-specific knockout mice.	<i>Genes Cells</i>	13	145-157	2008
327	Jia L, Uekita T, <u>Sakai R</u>	Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of Cas.	<i>Mol Cancer Res</i>	in press		
344	Ito M, Muraki M, Takahashi Y, Imai M, <u>Tsukui T</u> , Yamakawa N, Nakagawa K, Ohgi S, Horikawa T, Iwasaki W, Iida A, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Miyado K, Kono T, Hosoi Y, Saito H	Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility.	<i>Fertil Steril</i>	in press		

刊行物の別刷

LETTERS

TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity

Michaela U. Gack^{1,2}, Young C. Shin¹, Chul-Hyun Joo^{1,3}, Tomohiko Urano^{4,5}, Chengyu Liang¹, Lijun Sun⁶, Osamu Takeuchi⁷, Shizuo Akira⁷, Zhijian Chen⁶, Satoshi Inoue^{4,5} & Jae U. Jung¹

Retinoic-acid-inducible gene-I (RIG-I; also called DDX58) is a cytosolic viral RNA receptor that interacts with MAVS (also called VISA, IPS-1 or Cardif) to induce type I interferon-mediated host protective innate immunity against viral infection^{1–6}. Furthermore, members of the tripartite motif (TRIM) protein family, which contain a cluster of a RING-finger domain, a B box/coiled-coil domain and a SPRY domain, are involved in various cellular processes, including cell proliferation and antiviral activity⁷. Here we report that the amino-terminal caspase recruitment domains (CARDs) of RIG-I undergo robust ubiquitination induced by TRIM25 in mammalian cells. The carboxy-terminal SPRY domain of TRIM25 interacts with the N-terminal CARDs of RIG-I; this interaction effectively delivers the Lys 63-linked ubiquitin moiety to the N-terminal CARDs of RIG-I, resulting in a marked increase in RIG-I downstream signalling activity. The Lys 172 residue of RIG-I is critical for efficient TRIM25-mediated ubiquitination and for MAVS binding, as well as the ability of RIG-I to induce antiviral signal transduction. Furthermore, gene targeting demonstrates that TRIM25 is essential not only for RIG-I ubiquitination but also for RIG-I-mediated interferon- β production and antiviral activity in response to RNA virus infection. Thus, we demonstrate that TRIM25 E3 ubiquitin ligase induces the Lys 63-linked ubiquitination of RIG-I, which is crucial for the cytosolic RIG-I signalling pathway to elicit host antiviral innate immunity.

A recent series of studies has identified RIG-I and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5; also called IFIH1) as cytosolic receptors for viral double-stranded RNA and 5' triphosphate RNA^{3,4,6}. RIG-I and MDA5 belong to the DExD/H box RNA helicase family, the members of which contain two caspase recruitment domains (2CARD) in the N-terminal region and a potential ATP-dependent RNA helicase activity in the C-terminal region^{8,9}. To decipher the cytosolic RIG-I-mediated antiviral signalling pathway, we attempted to identify cellular proteins associated with the N-terminal 2CARD of RIG-I and MDA5 using mammalian glutathione S-transferase (GST) fusion constructs. Polypeptides with apparent molecular masses of 52, 60 and 68 kDa were present specifically in the GST–RIG-I(2CARD) complex but not in the GST–MDA5(2CARD) complex or with GST alone (Fig. 1a). Notably, mass spectrometry and immunoblotting showed that these polypeptides were exclusively identified as ubiquitinated forms of GST–RIG-I(2CARD) (Supplementary Fig. 1a). To confirm RIG-I ubiquitination, HEK293T cells were co-transfected with Flag-tagged full-length RIG-I or a RIG-I mutant in which the 2CARD had been deleted (RIG-I(Δ 2CARD)) together with haemagglutinin (HA)-tagged ubiquitin.

RIG-I, but not RIG-I(Δ 2CARD), was extensively ubiquitinated (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1b). In addition, anti-HA immunoblotting detected ubiquitinated Flag-tagged RIG-I as multiple species with apparent molecular masses of 120–150 kDa, significantly larger than unmodified Flag–RIG-I (Fig. 1c, top left panel). Furthermore, Sendai virus infection and/or interferon (IFN)- β treatment resulted in the markedly increased ubiquitination of endogenously or exogenously expressed RIG-I (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1c). These results indicate that RIG-I undergoes robust ubiquitination at its N-terminal 2CARD and that this ubiquitination apparently increases on viral infection.

To dissect further the ubiquitination of the 2CARD of RIG-I, which contains 18 lysine residues, the *in vivo* ubiquitinated forms of N-terminal GST-fused and C-terminal Flag-tagged RIG-I(2CARD) were purified and analysed by multi-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS; Fig. 1a, d, bands 1–3). Both GST–RIG-I(2CARD) and Flag–RIG-I(2CARD) carried the ubiquitin peptides at Lys 99, 169, 172, 181, 190 or 193 (Fig. 1d). Additional mass spectrometry analysis showed that band 2 and 3 fragments carried the unique, branched Gly–Gly signature peptides primarily with the ubiquitin Lys 63 linkage (Fig. 1d). Furthermore, GST–RIG-I(2CARD) and full-length RIG-I were strongly ubiquitinated when HA-tagged wild-type ubiquitin or a K48R ubiquitin mutant was expressed, whereas their ubiquitination was significantly reduced upon expression of a K63R ubiquitin mutant protein (Supplementary Fig. 2). These results indicate that the second CARD of RIG-I is the primary site for Lys 63-linked ubiquitination.

To corroborate the ubiquitination of the 2CARD of RIG-I, six lysine residues were replaced with arginine (K \rightarrow R) individually and in various combinations; these mutants were then tested for their ubiquitination level. The K172R mutation (alone or together with other mutations) caused near-complete loss of ubiquitination of the 2CARD of RIG-I (Fig. 1e and Supplementary Fig. 3a). In contrast, other K \rightarrow R mutations had little or no effect on ubiquitination of the RIG-I 2CARD (Fig. 1e). As previously shown¹⁰, wild-type GST–RIG-I(2CARD) potently induced IFN- β and NF- κ B promoter activity (Fig. 1f and Supplementary Fig. 3b). GST–RIG-I(2CARD) mutants containing the K172R mutation alone or together with other mutations showed markedly reduced IFN- β and NF- κ B promoter activation, consistent with their lack of ubiquitination; in contrast, other GST–RIG-I(2CARD) mutants induced IFN- β and NF- κ B promoter activity as strongly as wild-type GST–RIG-I(2CARD) (Fig. 1f and Supplementary Fig. 3b). These results suggest that Lys 172 is the essential site for RIG-I 2CARD ubiquitination and signalling activity

¹Department of Microbiology and Molecular Genetics and Tumor Virology Division, New England Primate Research Center, Harvard Medical School, 1 Pine Hill Drive, Southborough, Massachusetts 01772, USA. ²Institute for Clinical and Molecular Virology, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nuremberg, 91054 Erlangen, Germany. ³Department of Microbiology, University of Ulsan College of Medicine, Seoul 138-736, South Korea. ⁴Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8655, Japan. ⁵Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical School, Saitama 350-124-2, Japan. ⁶Department of Molecular Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas 75390-9148, USA. ⁷Department of Host Defense, Japan Science and Technology Agency, Osaka 565-0871, Japan.

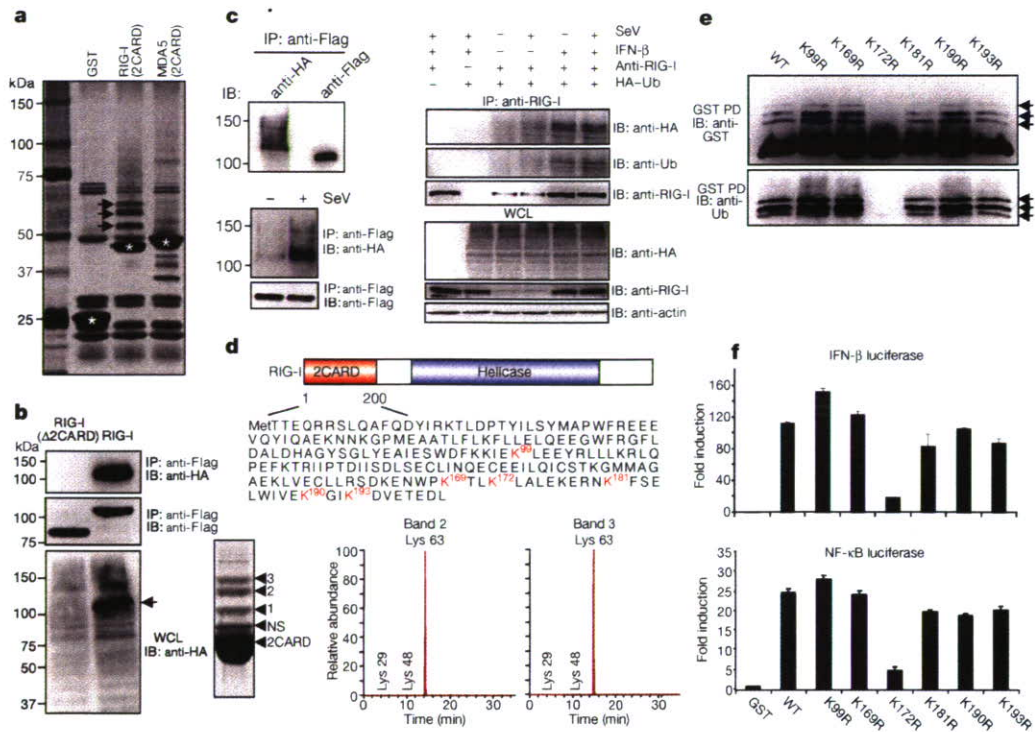


Figure 1 | The 2CARD of RIG-I undergoes robust ubiquitination. **a**, Silver-stained purified GST fusion complexes. Arrows, unique bands; asterisks, GST fusions. **b**, **c**, HEK293T cells transfected with Flag-RIG-I (**b**, and **c**, top-left) or Flag-RIG-I(Δ2CARD) (**b**) together with HA-ubiquitin were used for immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB). WCL, whole cell lysate. **c**, Bottom-left panel: HEK293T cells transfected with Flag-RIG-I and HA-ubiquitin were mock-infected or infected with Sendai virus (SeV). Right: HEK293T cells transfected with HA-ubiquitin were treated (or not) with IFN-β and/or infected, as indicated, with Sendai virus before

immunoprecipitation with anti-RIG-I antibody. **d**, The red lysine residues indicate the sites of ubiquitination. Bottom-left panel: Coomassie-blue-stained Flag-RIG-I(2CARD) complex. NS, nonspecific protein. Bottom-right panel: Lys 29/48/63-linked ubiquitination of RIG-I(2CARD)²¹. **e**, GST pull down (PD) of HEK293T cells transfected with GST-RIG-I(2CARD) or K→R mutants. Arrows indicate the ubiquitinated bands. WT, wild type. **f**, IFN-β and NF-κB promoter activity in GST-RIG-I(2CARD) or K→R mutant transfected cells. The results are expressed as means ± s.d. (n = 3).

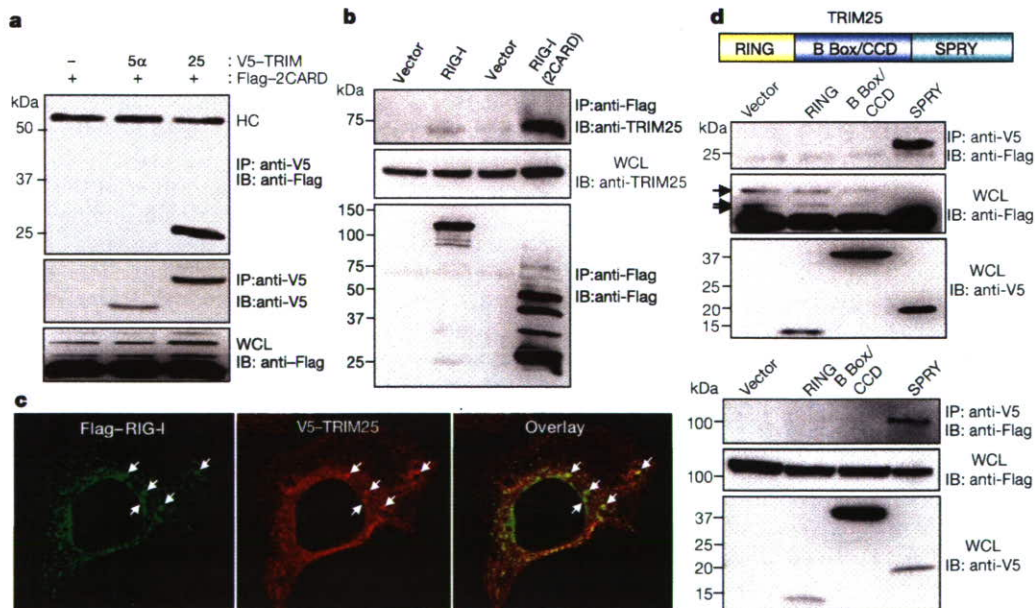


Figure 2 | Interaction between RIG-I and TRIM25. **a**, **b**, WCLs of HEK293T cells transfected with Flag-RIG-I(2CARD) and V5-TRIM25 or V5-TRIM5-α (**a**), or with Flag-RIG-I or Flag-RIG-I(2CARD) (**b**) were used for immunoprecipitation and immunoblotting, as indicated. **c**, Confocal images of HeLa cells transiently transfected with Flag-RIG-I (green) and V5-TRIM25 (red). Arrows indicate representative co-localization between

Flag-RIG-I and V5-TRIM25. Original magnification, ×100. **d**, WCLs of HEK293T cells transfected with Flag-tagged RIG-I(2CARD) (top) or full-length Flag-RIG-I (bottom) together with V5-tagged domains of TRIM25 were used for immunoprecipitation with V5 antibody, followed by immunoblotting with anti-Flag. WCLs were used for immunoblotting with anti-Flag and anti-V5 antibodies.