

## 特约综述

# ISG15 类泛素化修饰: 宿主细胞固有的抗病毒的新机制

石贺欣 陈巍 王琛\*

(中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 分子细胞生物学重点实验室, 上海 200031)

**摘要** 干扰素刺激基因 15 (The interferon-stimulated gene 15, ISG15)是最早被发现的类泛素蛋白。它能够通过与泛素类似的方式对底物蛋白进行翻译后修饰。对于 ISG15 共价修饰的生物学功能目前还知之甚少。干扰素(interferon, IFN)刺激和病毒感染均可以强烈诱导 ISG15 及其修饰系统的表达, 暗示 ISG15 共价修饰在机体抗病毒固有免疫反应中发挥重要作用。本文综合近年来的研究成果, 总结 ISG15 共价修饰对底物蛋白功能的影响, 并重点讨论 ISG15 及其修饰在抗病毒固有免疫相关过程中的作用。

**关键词** 干扰素刺激基因 15; 类泛素化修饰; 抗病毒; 固有免疫

固有免疫系统是宿主抵御病毒入侵的第一道防线。I 型干扰素(interferon, IFN)是关键的反病毒细胞因子, 它在细胞建立抗病毒状态的过程中发挥了核心的作用。I 型干扰素与其受体结合后激活酪氨酸激酶 JAK-STAT 信号通路, 最终诱导干扰素刺激基因(interferon stimulated genes, ISGs)的表达。在众多的干扰素刺激基因中, *isg15* 是第一个被鉴定出来的 ISG 基因, 它能够编码泛素类似蛋白, ISG15。ISG15 通过异肽键连接到底物蛋白上, 对底物蛋白进行修饰, 但是并不介导蛋白质的降解。已知的 ISG15 的靶蛋白功能多样, 涉及转录调控, 信号转导, 炎症, 细胞生长调控等。越来越多的研究表明 ISG15 在抗病毒固有免疫反应中发挥重要的调节作用。本文总结近年来的一些研究进展, 阐述 ISG15 在固有免疫中的抗病毒作用及其作用机制。

## 1 认识 ISG15

1979 年, 也就是发现泛素后的第四年, ISG15 被鉴定为第一个类泛素蛋白。有趣的是, 它可以被干扰素强烈诱导表达<sup>[1-2]</sup>。但是, 在过去的这 30 多年中, 关于 ISG15 的研究进展缓慢。这可能大部分归因于编码 ISG15 的基因仅存在于脊椎动物中, 在一些模式生物上, 例如果蝇、线虫、酵母中并不存在。到了 1986 年 Blomstrom 等<sup>[3]</sup>在 Daudi 细胞中克隆获得

人类的 ISG15 的 cDNA, 最初所测定的序列中包括一个额外的核苷酸, 导致提前出现终止密码子, 巧合的是由该序列所推测的翻译产物计算所得分子量大约为 15kDa, 与先前实验测定的分子量一致, 因此将该基因命名为干扰素刺激基因 15 (interferon stimulated gene 15, *isg15*), 编码蛋白为 ISG15。现在我们知道翻译出来的 ISG15 是一个含 165 个氨基酸的前体形式, 通过酶切掉 C 端的 8 个氨基酸后, 暴露甘氨酸(glycine, Gly)这个进行共价修饰的活力位点, 形成最终分子量 15kD 的成熟形式<sup>[4]</sup>。

ISG15 可以与泛素的抗体发生交叉反应, 因此也被称为泛素交叉反应蛋白(ubiquitin cross-reaction protein, UCRP)。通过蛋白序列分析, 发现 ISG15 含有两个功能域, 其中 N 端功能域与泛素有 29% 的同源性, C 端功能域与泛素有 31% 的同源性<sup>[5]</sup>, 两功能域之间以一个脯氨酸残基相连(图 1)。成熟 ISG15 的 C 末端是和泛素完全保守的 LRLRGG 序列。ISG15 只在脊椎动物中表达, 而在人、小鼠、大鼠、牛和羊这五种哺乳动物中, 氨基酸序列只有 47% 的保守性, 远低于泛素近乎 100% 的跨物种的保守性<sup>[6]</sup>。

ISG15 可以被干扰素诱导产生。干扰素结合到

\* 通讯作者。Tel: 021-54921185, E-mail: cwang01@sibs.ac.cn

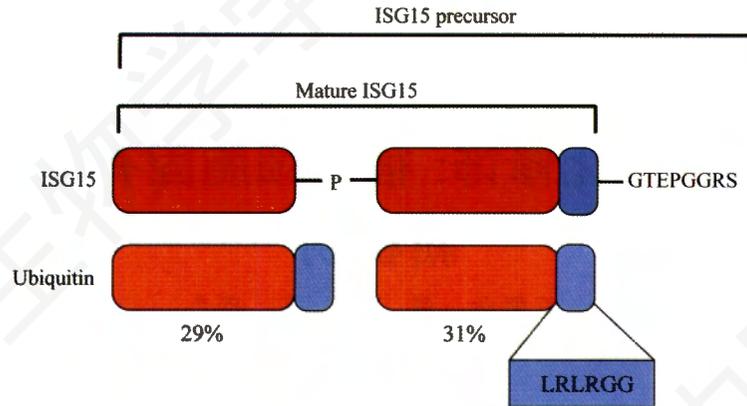


Fig.1 The primary structure of ISG15

ISG15 consists of two ubiquitin-like domains (red) that are linked by a proline residue (P). ISG15 exhibits marked homology to ubiquitin with the N-terminal domain for 29% homology and the C-terminal domain for 31% homology as indicated. ISG15 is translated as a 17 kDa proprotein which is rapidly cleaved into a 15 kDa mature form exposing the C-terminal conjugating domain (blue).

定位在细胞膜上受体,引起受体 IFNAR1 和 IFNAR2 的异源二聚化,招募 Jak1 和 Tyk2,这两个激酶相互磷酸化,并磷酸化受体的酪氨酸残基,使得受体进一步招募转录因子 STAT, Jak1 磷酸化 STAT 后, STAT 形成同源或异源二聚体并和 IRF9 形成一个大的复合物,命名为 ISGF3,入核结合特定的识别序列(ISRE),起始下游基因的表达<sup>[7]</sup>。 *Isg15* 基因上游的增强子含有两个 ISRE 序列。 ISG15 的表达同时受 IRF3 的调节,它也是最早被报道受 IRF3 调控的蛋白之一<sup>[8]</sup>。细菌、病毒的感染可以诱导大量 ISG15 的表达。

## 2 参与 ISG15 修饰的酶促系统

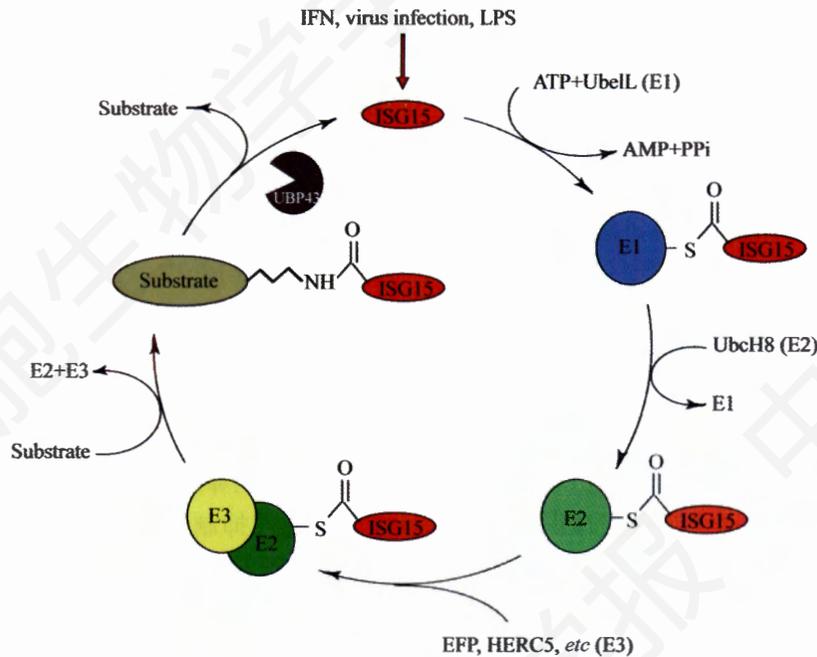
ISG15 修饰底物的过程(ISGylation)与泛素化修饰的过程类似,都可以被描述为一系列的级联反应(图2)。首先, ISG15 前体蛋白被剪切,暴露 C 端的甘氨酸残基;接着在活化酶 E1 的作用下, ISG15 的 C 端和 E1 的活力位点半胱氨酸(Cysteine, Cys)形成高能硫酯键,这步反应需要 ATP 提供能量;被活化的 ISG15 接着转移到结合酶 E2 的半胱氨酸,同样以硫酯键的形式共价连接;最后在连接酶 E3 的作用下, ISG15 修饰到底物蛋白上, ISG15 的 C 端甘氨酸的羧基和底物蛋白赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基形成异肽键。 ISG15 的去结合酶可以将 ISG15 从被修饰底物上酶解下来,从而形成了 ISG15 的循环利用。与泛素化修饰不同的是, ISG15 的修饰过程受到干扰素的诱导。而且蛋白发生泛素化修饰可以是多聚泛素化修饰也可以是单泛素化修饰,蛋白的 K48 位连接的多聚泛素修饰往往导致被修饰蛋白通过蛋白酶体途径降解,而 K63 位连接的多聚泛素修饰或单泛素修饰一般作为一种生理信

号,通常不被降解, ISG15 修饰底物的功能与单泛素修饰类似。 ISGylation 涉及到的酶包括,活化酶 E1,结合酶 E2,连接酶 E3。

Yuan 等<sup>[9]</sup>最早提出 Ube1L (E1-like ubiquitin-activating enzyme)是 ISG15 的活化酶 E1。基因 *ube1l* 最早被克隆是因为其编码的蛋白 Ube1L 与泛素活化酶 Ube1 具有同源性<sup>[10]</sup>。 B 型流感病毒感染时,蛋白的 ISGylation 修饰受到抑制。通过酵母双杂交系统发现, B 型流感病毒的 NS1B 蛋白能够与 ISG15 相互作用, NS1B 蛋白与 ISG15 结合,抑制 ISG15 与其活化酶 E1 之间的高能硫酯键形成。 Ube1L 特异性的催化激活 ISG15,而不能激活泛素,而且泛素的活化酶 E1 也不能代替 Ube1L 对蛋白进行 ISG15 共价修饰。

Kim<sup>[11]</sup>和 Zhao<sup>[12]</sup>发现 UbcH8 这个泛素结合酶 E2 同时也是 ISG15 的结合酶。 RNAi 实验证明在干扰素处理 Hela 细胞引起 ISGylation 的过程中, UbcH8 是最主要的 ISG15 结合酶。随后又有报道描述 UbcH6 也能够和 ISG15 形成硫酯键,可以作为 ISG15 的另一个结合酶<sup>[13]</sup>。但它主要是通过过表达或者体外反应得出的结论,并没有 RNAi 等数据显示在生理条件下, UbcH6 对 ISGylation 的贡献到底有多大。鉴于 ISGylation 和泛素化系统的相似性,以及在某些层面上还有重叠(比如 UbcH8 既可以作为泛素的 E2,也可以作为 ISG15 的 E2),也不排除催化泛素化的其他 E2 结合酶也可以同时作为 ISG15 结合酶。

连接酶 E3 在底物识别的过程中发挥关键作用。从机制上分,泛素的 E3 可以分为两大类:含 HECT 结构域的 E3 和非 HECT 结构域的 E3 (包括含有 RING 结构域或 U-box 结构域的 E3)。相对于几百个参与



**Fig.2 Protein modification by ISG15**

The expression ISG15, the E1-activating enzyme Ube1L and multiple E2-conjugating enzymes (shown here as an example is UbcH8) and E3-ligase enzymes (such as HERC5 and EFP) is induced by type I IFNs. E1, E2 and E3 proteins sequentially catalyse the conjugation of ISG15 to protein substrates to modulate pleiotropic cellular responses to inhibit virus production. This process (known as ISGylation) is reversibly regulated by proteases (such as UBP43), which are also induced by IFNs.

泛素化的 E3, 目前仅有 EFP (TRIM25) 和 HERC5 (CEB1) 这两个蛋白被鉴定出可以作为 ISGylation 的连接酶 E3。与其它已知的 ISGylation 系统成员——ISG15、Ube1L、以及 UbcH8 一样, EFP 也是一种干扰素诱导表达蛋白, 作为 14-3-3 $\sigma$  蛋白 ISG15 修饰过程中的连接酶 E3。过表达 EFP 促进 14-3-3 $\sigma$  的 ISG15 共价修饰。RNAi 减少 EFP 的表达, 细胞内的 14-3-3 $\sigma$  的 ISG15 共价修饰也受到抑制。EFP 的 ISG15 共价修饰的活性依赖于 RING 结构域, RING 结构域缺失或者将 RING 结构域中保守的半胱氨酸位点突变, 14-3-3 $\sigma$  的 ISG15 共价修饰都受到抑制<sup>[14]</sup>。

相对于泛素 E3 连接酶对底物的特异性识别, ISGylation 系统中的另一个 E3 连接酶 HERC5 则可以催化 ISG15 对细胞内广谱的蛋白共价修饰。HERC5 几乎同时被两家实验室报道可以作为 E3 催化 ISG15 共价修饰。他们在筛选被 ISG15 修饰或与其相互作用的蛋白的过程中, 发现 HERC5 可以作为连接酶催化广谱的蛋白的 ISG15 共价修饰。细胞内同时表达 ISG15、Ube1L、UbcH8 和 HERC5 可以产生强烈的 ISG15 共价修饰。而在干扰素刺激下, 同时下调 HERC5 的表达, 细胞内 ISG15 共价修饰明显受到抑制<sup>[15,16]</sup>。

UBP43 属于 USP (ubiquitin specific protease) 酶

家族, 参与去泛素化的过程。目前已经获得缺失 UBP43 的小鼠, 这些小鼠本底水平就表现出较强的蛋白 ISG15 共价修饰, 在干扰素刺激后, 可以诱导更高水平的蛋白 ISG15 共价修饰, 而蛋白的泛素化水平并没明显的改变<sup>[17]</sup>。

### 3 ISG15 修饰的蛋白

Spi2a 是报道的第一个被 ISG15 修饰的蛋白。Spi2a 是丝氨酸蛋白酶抑制因子家族的一个蛋白。它和 ISG15 都可以被细菌感染诱导产生<sup>[18]</sup>。ISG15 随后发现还能修饰一系列的转录因子, 例如 STAT1 等, 但并不清楚 ISG15 对其修饰的具体功能。利用蛋白质组学的方法已经鉴定出 100 多种能被 ISG15 修饰的底物蛋白, 这些蛋白具有广泛的生物学功能, 包括转录调控, 信号转导, 炎症, 细胞生长调控等<sup>[19-21]</sup>。因为在蛋白质组学的研究过程中, ISG15 和 ISG15 的酶促系统是过表达的, 因此发现的底物蛋白在生理状态下可能不存在 ISG15 修饰。到目前为止, 只有少数的蛋白被鉴定出在生理条件下可以发生 ISG15 修饰。

目前明确了 ISG15 修饰影响底物蛋白功能的有: 参与泛素化修饰的 Ubc13 和 Ubc6, 参与蛋白翻译的 4EHP, 参与 ISG15 修饰的 EFP, 参与病毒识别的 RIG-

I, 以及细胞骨架蛋白细丝蛋白 B (filamin B) 等。Ubc13、Ubc6 是泛素结合酶, ISG15 修饰后, 阻碍它们继续结合泛素, 从而抑制了结合酶的活力<sup>[13,22,23]</sup>。4EHP 能竞争翻译起始因子 eIF4E 结合 mRNA 的 5' 帽子结构, 发挥翻译抑制功能。通过纯化细胞裂解液, 富集得到 ISG15 修饰的 4EHP。体外结合实验证实 ISG15 修饰的 4EHP 对 mRNA 的 5' 帽子结构的结合力强于未修饰的 4EHP<sup>[24]</sup>。这是首次报道 ISG15 修饰对底物蛋白的功能有正向调节作用。EFP 作为 ISG15 的 E3 连接酶能够催化 ISG15 修饰 14-3-3 $\sigma$ , 突变掉 ISG15 修饰位点的 EFP 相比野生型更能够催化这种修饰作用, 从反面证实 ISG15 的修饰抑制了 EFP 作为 ISG15 E3 的活力<sup>[25]</sup>。RIG-I 作为胞质受体识别 RNA 病毒复制过程中产生的双链 RNA, 从而激活下游信号, 发挥抗病毒的功能。RIG-I 能够被 ISG15 共价修饰, 过表达 ISG15 及其修饰系统的蛋白, RIG-I 被 ISG15 修饰, 胞质内未被修饰的 RIG-I 的蛋白水平明显减少, 影响 RIG-I 受体对双链 RNA 的识别, 抑制抗病毒信号的激活。RIG-I 的 ISG15 修饰能够负反馈调节 RIG-I 介导的抗病毒效应, 病毒感染时, RIG-I 激活干扰素信号通路, 干扰素诱导产生 RIG-I 和 ISG15, RIG-I 发生 ISG15 修饰, 抑制干扰素信号通路, 将干扰素的抗病毒效应维持在一个合适的水平<sup>[26]</sup>。细丝蛋白 B 是胞内的支架蛋白(scaffolds), 在干扰素刺激下, 它能够将 RAC1, MEKK1, MKK4 组织在一起, 促进 JNK 的活化以及 JNK 介导的凋亡。ISG15 修饰的细丝蛋白 B 能释放 RAC1, MEKK1, MKK4, 阻止了 JNK 信号通路的活化。细丝蛋白 B 的 ISG15 修饰提供了一种干扰素诱导的 JNK 通路的负反馈调节机制<sup>[27]</sup>。ISG15 修饰的蛋白涉及细胞活动的各个领域, 提示它的功能也是多样的。

## 4 ISG15 及 ISGylation 在抗病毒中的作用

ISG15 可以被 I 型干扰素强烈的诱导表达, 及其修饰系统包括去 ISG15 修饰的 UBP43 也受到 I 型干扰素调控表达, 这些都暗示 ISG15 及其共价修饰在免疫过程中可能发挥着重要作用。越来越多的报道也证实了这一点。

### 4.1 ISG15 直接的抗病毒作用

早在 1996 年, Kunzi 等<sup>[28]</sup>发现相比 IFN- $\alpha$  2, IFN- $\omega$  能更有效的抑制人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 的复制。在 IFN- $\alpha$  2 处理的细胞中, 同时外转表达 ISG15, 能

够模拟 IFN- $\omega$  处理细胞的抗 HIV-1 的效果。仅外转 ISG15 可以抑制 HIV-1 未剪切 RNA 的出核, 减少胞质中 HIV 的转录本, 阻碍胞质内 HIV 编码蛋白的合成。这是首次关于 ISG15 直接抗病毒作用的报道。随后该实验室的发现进一步明确了 ISG15 在 I 型干扰素介导的抑制 HIV-1 病毒后期组装和释放过程中的关键作用<sup>[29]</sup>。过表达 ISG15 特异的抑制 Gag 和 Tsg101 蛋白的泛素化, 阻碍了 Gag 的 L 结构域和 Tsg101 蛋白的结合。敲低 ISG15 表达的细胞, 丧失了 I 型干扰素处理对 HIV-1 病毒释放的抑制作用。病毒蛋白 Gag 与宿主蛋白 Tsg101 之间的相互作用对于 HIV-1 病毒的释放是必须的。因此, ISG15 的抗病毒作用是通过抑制 HIV-1 病毒释放来实现的。但是 Okumura 等并没有检测到 ISG15 对 Gag 或 Tsg101 蛋白的共价修饰, 而且也没有数据显示不能修饰底物的 ISG15 突变体(比如缺失 C 端甘氨酸残基的突变体)对 HIV-1 释放的影响, 所以 ISG15 对底物蛋白的修饰功能在抗 HIV 过程中的作用还有待进一步研究。

### 4.2 ISGylation 在抗病毒过程中的作用

早期研究显示 ISG15 缺失的小鼠, 在对抗淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) 和水泡性口膜炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 感染时同野生型小鼠并没有明显差异<sup>[30]</sup>, 使得人们对 ISG15 的抗病毒作用一度产生怀疑。但是 Lenschow 等<sup>[31]</sup>利用 ISG15 缺失的小鼠模型证实 ISG15 和 ISGylation 具有广谱抗病毒作用。他们的研究发现, ISG15 缺失的小鼠对副粘病毒流感病毒 A (influenza A)、流感病毒 B (influenza B)、单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV)、辛德比斯病毒 (Sindbis virus) 感染的易感性 (susceptibility) 明显高于野生型小鼠。而且 ISG15 对靶蛋白的修饰对于抗病毒功能的发挥也是非常重要的。通过逆转录病毒载体回转野生型 ISG15 后, 能够增强 ISG15 缺失小鼠对辛德比斯病毒感染的耐受性, 而回转突变型的 ISG15 (C 端氨基突变, 以至于 ISG15 不能共价修饰其他蛋白) 则没有这种现象。他们的实验结果说明在宿主对抗 RNA 和 DNA 病毒感染时, ISG15 及其修饰功能发挥着重要作用, 而且 ISG15 及其修饰对病毒的拮抗有病毒的种属特异性。这反映了 ISG15 发挥抗病毒作用可能依赖于不同机制, 也有可能是因为某些病毒进化出了拮抗 ISG15 的对策。

Malakhova 等<sup>[32]</sup>和 Okumura 等<sup>[33]</sup>两个研究小组通过不同的方法, 都证明 ISG15 能够抑制埃博拉病毒

(Ebola virus)从宿主细胞的释放。Nedd4 是泛素 E3 连接酶,能够结合埃博拉病毒基质蛋白 VP40 的 L 结构域并催化 VP40 发生泛素化修饰,这个过程对于病毒从宿主细胞的释放是非常必要的<sup>[34]</sup>。Malakhova 等<sup>[32]</sup>研究表明,游离的 ISG15 能够特异的结合 Nedd4,阻止 Nedd4 与泛素、泛素 E2 结合酶分子之间的相互作用,干扰 Nedd4-E2 复合物的形成,阻碍泛素从 E2 结合酶向 E3 连接酶的转移,进而抑制 Nedd4 作为泛素 E3 连接酶的活性。ISG15 过表达使 Nedd4 催化埃博拉病毒基质蛋白 VP40 泛素化活性降低,抑制 VP40 病毒样颗粒从宿主细胞释放。Okumura 发现,下调 ISG15 的表达不能抑制 L 结构域突变的病毒样颗粒的释放,说明 ISG15 抑制埃博拉病毒的释放是依赖于基质蛋白的 L 结构域。外转 ISG15 修饰系统(Ube1L, UbcH8)也能抑制埃博拉病毒的释放。这提示 ISG15 的修饰活力在抑制埃博拉病毒的过程中也发挥了一定的功能。

在后来的研究中, Giannakopoulos 等<sup>[35]</sup>发现鼠源的 ISG15 的 151 位的精氨酸(Arginine)残基在靶蛋白的 ISG15 修饰过程发挥重要作用, R151A 突变体不能结合 Ube1L,阻止 ISG15 由 Ube1L 向 UbcH8 的转移,从而抑制了 ISG15 对靶蛋白的修饰。在 IFN alpha/beta 受体缺失的小鼠中表达野生型的 ISG15 能够保护小鼠不受辛德比斯病毒感染,而表达 ISG15 R151A 突变体则没有这种保护作用。而且,该实验室发现 Ube1L 缺失的小鼠也更容易感染辛德比斯病毒和 B 型流感病毒<sup>[35,36]</sup>。以上的实验结果更进一步的表明 ISG15 的修饰功能在抗病毒过程中的重要性。但 ISG15 共价修饰的靶蛋白非常广泛,其明显的抗病毒功能可能是由于 ISG15 修饰了宿主蛋白,或者病毒蛋白,或者两者皆有修饰。

#### 4.3 ISG15 通过修饰宿主蛋白发挥抗病毒作用

IRF3 作为调控 I 型干扰素表达的关键转录因子,在固有免疫过程中发挥重要作用。有报道显示 I 型干扰素和病毒感染都可以诱导 IRF3 被 ISG15 共价修饰。ISG15 修饰 IRF3,促进 IRF3 入核与 IFN $\beta$  启动子的结合以及 IRF3 介导的干扰素信号的转导<sup>[37]</sup>。但具体的分子机制并不清楚。我们实验室发现, Herc5 (homologous to the E6-associated protein C terminus domain and RCC1-like domain containing protein 5)能够特异的结合 IRF3,并作为 E3 催化 ISG15 修饰 IRF3,进而破坏 IRF3 与 Pin1 之间的相互作用。Pin1 能够与磷酸化的 IRF3 相互作用,促进 IRF3 的泛素化以及泛素依赖的蛋白酶体降解<sup>[38]</sup>。ISG15 修饰抑制了 Pin1

对 IRF3 的负调控,使 IRF3 处于一种持续活化的状态,增强了 IRF3 抗病毒的效应。我们更进一步鉴定出了 IRF3 被 ISG15 修饰的位点。修饰位点突变的 IRF3 相比野生型 IRF3,跟 Pin1 的结合更紧密,更容易被泛素化,也更不稳定。过表达 Herc5,能够促进 IRF3 下游基因的表达,增强宿主细胞的抗病毒效应。敲低 Herc5 的表达,抑制 IRF3 调控的基因的表达,削弱宿主细胞的抗病毒效应<sup>[39]</sup>。

#### 4.4 ISG15 通过修饰病毒蛋白发挥抗病毒作用

ISG15 可以通过修饰宿主蛋白增强宿主的抗病毒效应。但之前并没有关于 ISG15 修饰病毒蛋白的报道。我们实验室最近的研究表明, ISG15 也可以通过修饰病毒蛋白来实现其抗病毒的功能。A 型流感病毒的 NS1 蛋白是 A 型流感病毒关键的毒性因子,它能够抑制宿主产生干扰素,阻止干扰素诱导的抗病毒蛋白 PKR 的活化等,从而限制宿主的抗病毒功能<sup>[40]</sup>。我们研究发现 Herc5 可以催化 ISG15 修饰 A 型流感病毒的 NS1 蛋白,被 ISG15 修饰的 NS1 蛋白不能形成同源二聚体,丧失了抑制宿主抗病毒的能力。这是首次关于 ISG15 修饰病毒蛋白的报道,也为 ISG15 拮抗 A 型流感病毒提供了新的理论依据<sup>[41]</sup>。

## 5 病毒对 ISG15 修饰的拮抗作用

病毒入侵时,宿主在干扰素作用下,诱导表达 ISG15 以及 ISG15 的修饰系统来对抗病毒感染的感染。病毒也采取了很多途径抑制或者逃避宿主 ISG15 的修饰。流感病毒 A 通过阻断干扰素途径,不激活 ISG15 的表达。流感病毒 B 虽然能够诱导 ISG15 的表达,但它的 NS1B 蛋白能结合 ISG15,阻断 ISG15 被 Ube1L 活化,进一步阻断 ISG15 对蛋白的共价修饰<sup>[9]</sup>。Nairoviruses 和 Arteriviruses 的 L 蛋白含有卵巢肿瘤结构域(ovarian tumor domain, OUT),具有广谱的脱泛素和 ISG15 修饰的酶活性,能够去除靶蛋白上结合的 ISG15,从而拮抗 ISG15 抗病毒作用<sup>[42]</sup>。牛痘病毒(vaccinia virus)的 E3 蛋白通过它的 C 端结构域跟 ISG15 相互作用,拮抗 ISG15 的抗病毒作用。实验数据显示,缺失 E3 编码序列的牛痘病毒不能在野生型 MEF 细胞中增殖,而在 ISG15 缺失的 MEF 中则能正常复制增殖。缺失 E3 编码序列的牛痘病毒感染 ISG15 缺失的小鼠,导致严重的炎症反应和死亡现象,而感染野生型小鼠则没有明显现象<sup>[43]</sup>。以上病毒对 ISG15 及共价修饰系统的抑制调节从侧面证明 ISG15 的抗病毒作用。

## 6 展望和其他

固有免疫系统是宿主抵御病毒入侵的第一道防线。深入研究宿主与病毒间的作用机制对我们免受病毒危害是至关重要的。I 型干扰素是关键抗病毒细胞因子。由它诱导表达的 ISGs 发挥广谱的抗病毒作用。蛋白质的翻译后修饰是调节蛋白质功能多样性的的重要手段之一。其中,类泛素修饰是近年来的研究热点。ISG15 是一个类泛素蛋白,可以被干扰素诱导表达。近年来,我们对 ISG15 及其修饰已有初步了解,但这仅仅涉及 ISG15 功能的冰山一角。以 ISG15 的抗病毒功能为例,还有很多的问题等待我们去研究:鉴定哪些底物蛋白在病毒刺激后可以被 ISG15 修饰;这些蛋白被 ISG15 修饰后,功能有何变化;分析 ISG15 拮抗某种特定病毒的具体分子机制等,这些将有助于我们开发新的针对病毒感染的治疗手段。

### 参考文献(References)

- Farrell PJ, Broeze RJ, Lengyel P. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature* 1979; 279 (5713): 523-5.
- Korant BD, Blomstrom DC, Jonak GJ, Knight E, Jr. Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. *J Biol Chem* 1984; 259 (23): 14835-9.
- Blomstrom DC, Fahey D, Kutny R, Korant BD, Knight E, Jr. Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. *J Biol Chem* 1986; 261 (19): 8811-6.
- Knight E, Jr, Fahey D, Cordova B, Hillman M, Kutny R, Reich N, *et al.* A 15-kDa interferon-induced protein is derived by COOH-terminal processing of a 17-kDa precursor. *J Biol Chem* 1988; 263 (10): 4520-2.
- Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem* 1987; 262 (23): 11315-23.
- Staub O. Ubiquitylation and isgylation: overlapping enzymatic cascades do the job. *Sci STKE* 2004; 2004 (245): pe43.
- Tanaka N, Taniguchi T. The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10 (2): 73-81.
- Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, *et al.* Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19 (1): 1-13.
- Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J* 2001; 20 (3): 362-71.
- Kok K, Hofstra R, Pilz A, van den Berg A, Terpstra P, Buys CH, *et al.* A gene in the chromosomal region 3p21 with greatly reduced expression in lung cancer is similar to the gene for ubiquitin-activating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (13): 6071-5.
- Kim KI, Giannakopoulos NV, Virgin HW, Zhang DE. Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Mol Cell Biol* 2004; 24 (21): 9592-600.
- Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yuan W, Schulman BA, *et al.* The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101 (20): 7578-82.
- Takeuchi T, Iwahara S, Saeki Y, Sasajima H, Yokosawa H. Link between the ubiquitin conjugation system and the ISG15 conjugation system: ISG15 conjugation to the UbcH6 ubiquitin E2 enzyme. *J Biochem* 2005; 138 (6): 711-9.
- Dastur A, Beaudenon S, Kelley M, Krug RM, Huijbregtse JM. Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J Biol Chem* 2006; 281 (7): 4334-8.
- Wong JJ, Pung YF, Sze NS, Chin KC. HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (28): 10735-40.
- Zou W, Zhang DE. The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. *J Biol Chem* 2006; 281 (7): 3989-94.
- Malakhov MP, Malakhova OA, Kim KI, Ritchie KJ, Zhang DE. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem* 2002; 277 (12): 9976-81.
- Hamerman JA, Hayashi F, Schroeder LA, Gygi SP, Haas AL, Hampson L, *et al.* Serpin 2a is induced in activated macrophages and conjugates to a ubiquitin homolog. *J Immunol* 2002; 168 (5): 2415-23.
- Malakhov MP, Kim KI, Malakhova OA, Jacobs BS, Borden EC, Zhang DE. High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem* 2003; 278 (19): 16608-13.
- Giannakopoulos NV, Luo JK, Papov V, Zou W, Lenschow DJ, Jacobs BS, *et al.* Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336 (2): 496-506.
- Zhao C, Denison C, Huijbregtse JM, Gygi S, Krug RM. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (29): 10200-5.
- Takeuchi T, Yokosawa H. ISG15 modification of Ubc13 suppresses its ubiquitin-conjugating activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336 (1): 9-13.
- Zou W, Papov V, Malakhova O, Kim KI, Dao C, Li J, *et al.* ISG15 modification of ubiquitin E2 Ubc13 disrupts its ability to form thioester bond with ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336 (1): 61-8.
- 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.
- Zou W, Wang J, Zhang DE. Negative regulation of ISG15 E3 ligase EFP through its autoISGylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354 (1): 321-7.
- Kim MJ, Hwang SY, Imaizumi T, Yoo JY. Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation. *J Virol* 2008; 82 (3): 1474-83.

- 27 Jeon YJ, Choi JS, Lee JY, Yu KR, Kim SM, Ka SH, *et al.* ISG15 modification of filamin B negatively regulates the type I interferon-induced JNK signalling pathway. *EMBO Rep* 2009; 10 (4): 374-80.
- 28 Knobeloch KP, Utermohlen O, Kissler A, Prinz M, Horak I. Reexamination of the role of ubiquitin-like modifier ISG15 in the phenotype of UBP43-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2005; 25 (24): 11030-4.
- 29 Okumura A, Lu G, Pitha-Rowe I, Pitha PM. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (5): 1440-5.
- 30 Osiak A, Utermohlen O, Niendorf S, Horak I, Knobeloch KP. ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Mol Cell Biol* 2005; 25 (15): 6338-45.
- 31 Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, *et al.* IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (4): 1371-6.
- 32 Malakhova OA, Zhang DE. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *J Biol Chem* 2008; 283 (14): 8783-7.
- 33 Okumura A, Pitha PM, Harty RN. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (10): 3974-9.
- 34 Bieniasz PD. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 2006; 344 (1): 55-63.
- 35 Giannakopoulos NV, Arutyunova E, Lai C, Lenschow DJ, Haas AL, Virgin HW. ISG15 Arg151 and the ISG15-conjugating enzyme Ube1L are important for innate immune control of Sindbis virus. *J Virol* 2009; 83 (4): 1602-10.
- 36 Lai C, Struckhoff JJ, Schneider J, Martinez-Sobrido L, Wolff T, Garcia-Sastre A, *et al.* Mice lacking the ISG15 E1 enzyme Ube1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection. *J Virol* 2009; 83 (2): 1147-51.
- 37 Lu G, Reinert JT, Pitha-Rowe I, Okumura A, Kellum M, Knobeloch KP, *et al.* ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2006; 52 (1): 29-41.
- 38 Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, *et al.* Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* 2006; 7 (6): 598-605.
- 39 Shi HX, Yang K, Liu X, Liu XY, Wei B, Shan YF, *et al.* Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Mol Cell Biol* 2010; 30 (10): 2424-36.
- 40 Min JY, Krug RM. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (18): 7100-5.
- 41 Tang Y, Zhong G, Zhu L, Liu X, Shan Y, Feng H, *et al.* Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J Immunol* 2010; 184 (10): 5777-90.
- 42 Arguello MD, Hiscott J. Ub surprised: viral ovarian tumor domain proteases remove ubiquitin and ISG15 conjugates. *Cell Host Microbe* 2007; 2 (6): 367-9.
- 43 Guerra S, Caceres A, Knobeloch KP, Horak I, Esteban M. Vaccinia virus E3 protein prevents the antiviral action of ISG15. *PLoS Pathog* 2008; 4 (7): e1000096.

## ISG15 and Its Modification: The Roles in Innate Immunity

He-Xin Shi, Wei Chen, Chen Wang\*

(Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** The interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is the first ubiquitin-like protein identified in eukaryotic cells. Post-translationally, ISG15 covalently modifies various proteins via a biochemical pathway parallel to that of ubiquitin. The physiological targets and functional significances of ISGylation are still largely unknown. Given that ISG15 is strongly induced by type I interferon and virus infection, ISG15 is proposed to play important roles in innate immunity, in particular for antiviral responses. Here, we review recent progresses on biochemical and functional characterization of ISG15 conjugating system, highlighting the antiviral functions of ISGylation.

**Key words** ISG15; ISGylation; antiviral; innate immunity

\*Corresponding author. Tel: 86-21-54921185, E-mail: cwang01@sibs.ac.cn