

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19007

研究課題名(和文)直鎖状ポリユビキチン鎖による細胞死抑制メカニズムの解析

研究課題名(英文)Elucidating the mechanisms underlying linear ubiquitin chains-mediated cell death protection

研究代表者

藤田 宏明(Fujita, Hiroaki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90738006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規のタンパク質翻訳後修飾である直鎖状ポリユビキチン鎖を特異的に生成するLUBACユビキチンリガーゼはTNF- $\alpha$ 等によるNF- $\kappa$ Bシグナル活性化に関与する。これまでに我々は、LUBACがNF- $\kappa$ B活性化非依存的にTNF- $\alpha$ 下流で惹起される細胞死を顕著に抑制することを見いだした。本研究ではLUBACによる細胞死制御メカニズムを探索するために、LUBACを構成するサブユニットをノックアウトした細胞を作成し、様々なLUBACサブユニットの変異体を入れ戻し、細胞死制御に必須な領域を同定した。また質量分析でその領域に結合するタンパク質を探索した。

研究成果の概要(英文)：LUBAC is involved in TNF- $\alpha$  mediated NF- $\kappa$ B activation via generating linear polyubiquitin chains. We discovered that LUBAC is also involved in the protection of TNF- $\alpha$ -mediated cell death in NF- $\kappa$ B independent manner. To elucidate the mechanisms, I prepared LUBAC knockout cells and reconstituted the several LUBAC mutants into cells to analyze whose domains are involved in cell death protection. Finally, we found a domain of LUBAC which participates in cell death regulation and explored proteins which bind to newly discovered domain by Mass spectrometry.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞死 LUBAC 直鎖状ポリユビキチン鎖

1. 研究開始当初の背景

TNF- $\alpha$ 等のデスレセプターを介する刺激は、細胞の生存を促す NF- $\kappa$ B シグナル活性化に加え細胞死を誘発する相反したシグナルが伝達される(図 1)。

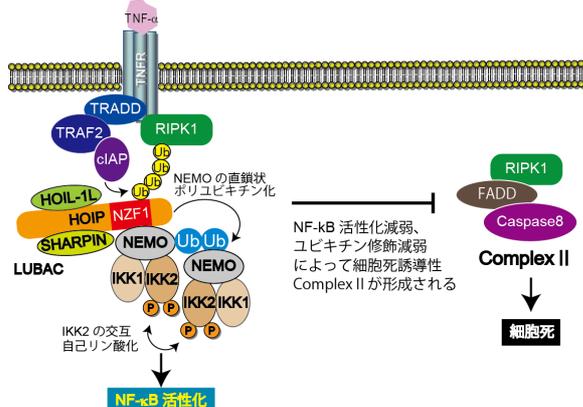


図 1 TNF- $\alpha$  シグナル経路

一般的に NF- $\kappa$ B 活性化により細胞死は抑制されるが、NF- $\kappa$ B 活性化が減弱した細胞、またユビキチン修飾系が減弱した細胞においては細胞死が惹起される。NF- $\kappa$ B 活性化亢進は、リウマチ、アレルギーやガン等の疾患に、また NF- $\kappa$ B 活性低下は細胞死を引き起こし、肝ガンや皮膚炎発症に関与するため、このシグナル経路は精力的に研究が行われているが、その制御機構は完全には理解されていない。我々はこれまでに、TNF- $\alpha$ 等の刺激による NF- $\kappa$ B 活性化に、新規ユビキチンリガーゼ LUBAC が関与することを見いだした。LUBAC は N 末端メチオニンを介する直鎖状ポリユビキチン鎖を特異的に生成するユビキチンリガーゼであり、活性中心を有する HOIP、アクセサリー分子である HOIL-1L、SHARPIN の三者複合体から成る。

我々は LUBAC の NF- $\kappa$ B 活性化能以外の機能を探索するために、HOIP が欠損した細胞を樹立し、様々な刺激による表現型を解析した。その結果、タンパク質翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)と TNF- $\alpha$ 共刺激で細胞死が顕著に亢進することを見いだした。さらに、TNF- $\alpha$  + CHX で細胞を刺激すると細胞死を惹起するタンパク質複合体 (complex )の形成が HOIP 欠損細胞では顕著に亢進していた(図 2)。CHX は転写因子である NF- $\kappa$ B 活性化による抗細胞死効果を消失するので、この結果は LUBAC が NF- $\kappa$ B 活性化非依存的に細胞死を抑制していることを示唆する。

また、HOIP 欠損細胞に HOIP の活性中心変異体を入れ戻した細胞を TNF- $\alpha$  + CHX で刺激したところ、HOIP 欠損細胞と同様に細胞死の亢進が認められた。このことから

LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖生成が細胞死抑制に非常に重要であることが示唆された。

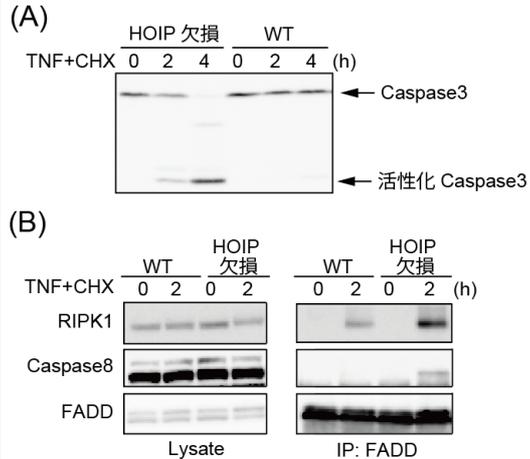


図 2 直鎖状ポリユビキチン鎖による細胞死制御 (A)Caspase3 活性化評価 (B) 細胞死誘導複合体形成評価

2. 研究の目的

これまで、TNF- $\alpha$ 刺激による細胞死の抑制にユビキチン修飾系が関与することが報告されているが、ユビキチン修飾系がどのようにして細胞死を制御しているのか等の具体的なメカニズムは全く示されていない。また、LUBAC、直鎖状ポリユビキチン鎖による細胞死制御メカニズムも全く明らかにされていない。一般的にユビキチン修飾系は基質タンパク質にユビキチンを結合させて生命現象を制御するので、LUBAC が TNF- $\alpha$ 刺激により TNF 受容体にリクルートされた後に、受容体周辺の新規基質を直鎖状ポリユビキチン化することで細胞死を抑制するのではと考えた。そこで、本研究では LUBAC の細胞死抑制における新規基質の同定と、その基質の直鎖状ポリユビキチン化による細胞死抑制メカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

新規基質を同定するために、まず LUBAC のどの領域が細胞死制御に関与するか解析した。そのためにまず、SHARPIN 欠損細胞に CRISPR/Cas9 技術を用いて HOIP、HOIL-1L をさらに欠損させた三者欠損細胞 (TKO 細胞)を作成した。TKO 細胞に LUBAC の各種ドメイン欠損変異体をレトロウイルス発現系により導入した。作成した細胞の LUBAC 発現量をウェスタンブロッティングで確認した後、細胞を TNF- $\alpha$  + CHX で刺激し、それぞれの細胞の細胞死を評価した。細胞死を抑制出来ない LUBAC は細胞死抑制に

関与する基質と結合出来ないのではと考え、野生型の LUBAC、細胞死を抑制出来ない LUBAC を発現する細胞を TNF- $\alpha$ で刺激し、共免疫沈降法により LUBAC を精製後、野生型 LUBAC でのみ刺激依存的に結合するタンパク質を質量分析により探索した。

#### 4. 研究成果

まず、LUBAC のどのサブユニットが細胞死抑制に必須か解析した。TKO 細胞に野生型 HOIP、HOIL-1L、SHARPIN を様々な組み合わせで入れ戻した細胞を作成した。作成した細胞を TNF- $\alpha$ で刺激し細胞死を評価した。その結果、HOIP、HOIL-1L の二者を発現する細胞では細胞死が完全に抑制されたが、驚いたことに HOIP、SHARPIN の二者を発現する細胞では細胞死が全く抑制されなかった。これまで HOIL-1L と SHARPIN はアミノ酸配列の相同性が高く、機能的差異が不明瞭であったが、明らかな表現型の差異があることを見いだした。そこで HOIL-1L と SHARPIN の機能的差異を探索したところ、HOIP-HOIL-1L 発現細胞の方が HOIP-SHARPIN 発現細胞に比べ、HOIP が顕著に安定化することを見いだした。これまで HOIP の安定化には HOIL-1L、SHARPIN の相同性の高い UBL ドメインが関与することがわかっていたので、UBL ドメインの差異を評価したところ、HOIL-1L UBL は SHARPIN UBL に比べより HOIP に強く結合すること、また両 UBL ドメインが HOIP のそれぞれ異なる領域に結合し、HOIP-HOIL-1L-SHARPIN の三者で非常に安定な複合体を形成することを発見した。HOIL-1L、SHARPIN の HOIP 安定化、細胞死制御に関する違いに関しては現在論文作成中である。

次に、HOIP、HOIL-1L に細胞死を抑制する領域があると考え、それぞれのタンパク質のドメイン欠損変異体を作成し、TKO 細胞に入れ戻した。その結果、ある領域を欠損した HOIP、HOIL-1L を発現する細胞では、TKO 細胞と同等に TNF- $\alpha$ 刺激で細胞死が惹起されることを見いだした (図 3)。

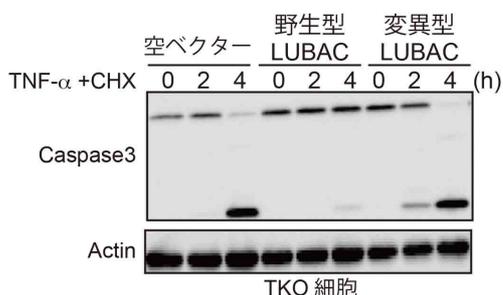


図 3 変異型 LUBAC 発現細胞における細胞死評価

またタンパク質の発現は野生型、変異型 LUBAC で大差はなかったことから、今回同定したドメインは細胞死の制御に関するドメインと考えられた。

次に、同定した領域に結合する因子の同定を試みた。野生型の LUBAC を発現する細胞と、細胞死を抑制出来ない変異型 LUBAC を発現する細胞を TNF- $\alpha$ で刺激し、免疫沈降法によりそれぞれの細胞から野生型、変異型 LUBAC を精製した。変異型 LUBAC では結合がみられず、野生型の LUBAC に刺激依存的に結合する分子を質量分析により探索した。多くのタンパク質が結合候補として同定されたので、現在、質量分析の条件を検討している。また同定されたタンパク質においてはタンパク質の細胞死制御における影響を検証している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Morita, D., Yamamoto, Y., Mizutani, T., Ishikawa, T., Suzuki, J., Igarashi, T., Mori, N., Shiina, T., Inoko, H., Fujita, H., Iwai, K., Tanaka, Y., Mikami, B., and Sugita, M. Crystal structure of the N-myristoylated lipopeptide-bound MHC class I complex. **Nat. Commun.** 13:7:10356, 2016.
2. Shimizu, S., Fujita, H., Sasaki, Y., Tsuruyama, T., Fukuda, K., and Iwai, K. Differential involvement of the NZF domains of SHARPIN and HOIL-1L in LUBAC-mediated cell death protection. **Mol. Cell. Biol.** 36:1569-1583, 2016.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 第 39 回日本分子生物学会 シンポジウム 口頭発表 2016 年 12 月 1 日  
“Crucial roles of unexpected interaction between subunits of LUBAC ubiquitin ligase in NF-kappaB and cell death”  
Hiroaki F., Satoshi S., Kazuhiro I.
2. 2016 Keystone Symposia Conference X3: Ubiquitin Signaling ポスター発表 2016 年 3 月 14 日  
“Novel insights into linear ubiquitin chain assembly complex formation”  
Hiroaki F., Satoshi S., Kazuhiro I.
3. 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 ポスター発表 2015 年 12 月 2 日  
“Functional differences between UBLs of HOIL-1L and SHARPIN in LUBAC

stabilization”

Hiroaki F., Kazuhiro I.

4. 第 7 回シグナルネットワーク研究会 口頭発表 2015 年 6 月 20 日  
“LUBAC 安定化機構の解析からみえてきた HOIL-1L、SHARPIN の機能的差異”  
藤田宏明, 岩井一宏
5. 第 37 回日本分子生物学会 ワークショップ 口頭発表 2015 年 11 月 26 日  
“直鎖状ポリユビキチン鎖による IKK 複合体活性化メカニズムの解析”  
藤田宏明, Simin R., 古橋茉莉子, 加藤龍一, 若槻壮一, 岩井一宏

〔図書〕(計 2 件)

1. 直鎖状ポリユビキチン鎖による細胞機能御  
藤田宏明, 岩井一宏 シグナリング研究 2015,実験医学増刊,33(10):1536-1542, 2015
2. Sasaki Y., Fujita H., Nakai M., Iwai K.,  
Immunoblot analysis of linear polyubiquitination of NEMO. Methods Mol. Biol. 1280: 297-309,

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://mcp.med.kyoto-u.ac.jp>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者  
藤田 宏明 (Fujita Hiroaki)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号 : 90738006

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

( )