

令和 2 年 12 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15594

研究課題名(和文)HOIL-1Lによる細胞死制御機構と生理意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cell death regulation mechanisms and physiological significance by HOIL-1L

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：LUBACは新規の翻訳後修飾である直鎖状ユビキチン鎖を特異的に生成する唯一の酵素である。LUBACは活性中心を有するHOIP、アクセサリー分子であるHOIL-1L、SHARPINの三者複合体からなり、NF-kappaB活性化、細胞死の制御に関与する。本研究ではLUBACの細胞死制御に重要な領域を探索し、HOIPに加えHOIL-1Lが細胞死制御に非常に重要な役割を担っていることを見出した。また細胞死制御に重要なHOIL-1Lの各種領域を変異したマウスを作成し、HOIL-1Lによる細胞死制御の生理的メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HOIL-1Lの細胞死制御メカニズムを解明する過程でHOIL-1L UBLドメインがHOIPの安定性、細胞死制御に必須の役割を担っていることを見出した。またLUBACが三者複合体で初めて安定化するメカニズムを明らかにし、これまで知られていなかった、HOIL-1L/SHARPINの結合がLUBACの安定性に重要な役割を担っていることを明らかにした。また、同結合を阻害するペプチドを作成したところ、LUBACを不安定化し、がん細胞を死滅させることができた。上記に加え、HOIL-1LのRBRドメインがLUBACの直鎖形成を抑制することで細胞死を調節していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：LUBAC is a only ubiquitin ligase that specifically generates linear ubiquitin chains. LUBAC is composed of catalytic subunit HOIP and accessory subunits HOIL-1L and SHARPIN. LUBAC is involved in NF-kappaB activation and cell death regulation. Dysregulation of LUBAC causes several diseases such as cancer and inflammatory disease. Here, we sought the regions of LUBAC that is involved in cell death regulation, and identified HOIL-1L is essential for cell death regulation. We also generated mice in which regions of HOIL-1L, which are important for cell death regulation, were mutated to elucidate physiological role of cell death control by HOIL-1L.

研究分野：分子生物学

キーワード：LUBAC 細胞死 直鎖状ユビキチン鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TNF- α 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- κ 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)。野生型の細胞では NF- κ B 活性化により、抗細胞死タンパク質が転写され細胞死が回避されるが、NF- κ B の活性化の減弱、または Ub シグナルの異常がみられる細胞においては、細胞死を惹起する Complex (Caspase8-FADD-RIP1-RIP3 からなる)が形成され細胞死へと至る。これらのシグナル伝達系の異常はガンや自己免疫性疾患等の重篤な疾患につながることから、その重要性が知られている。

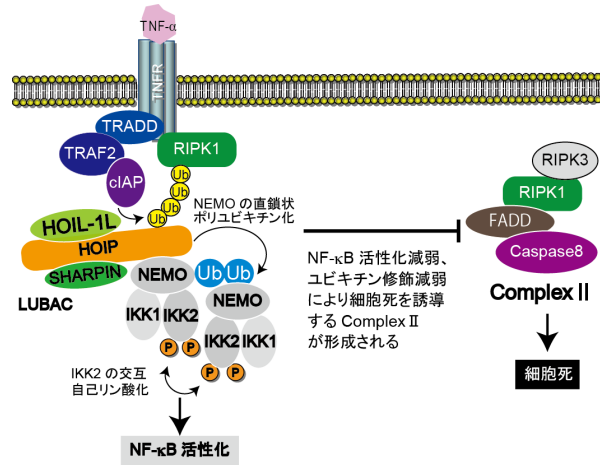


図1 TNF- α シグナル経路

申請者の所属研究室では TNF- α 等の炎症性サイトカイン刺激により受容体に集積し、NF- κ B シグナル活性化に關与する新規 Ub リガーゼ LUBAC を発見した(Tokunaga *et al.*, Nat. Cell Biol. 2009)。LUBAC は HOIP、HOIL-1L、SHARPIN の三者から構成され(図 2)、これまで知られていたリジン残基を介したポリ Ub 鎖ではなく、N 末端メチオニンを介する新奇な直鎖を特異的に生成する。HOIP、HOIL-1L は RING-IBR-RING (RBR) ドメインを持つ Ub リガーゼであり、HOIP の RBR ドメインが直鎖を生成する。申請者はこれまで、LUBAC による NF- κ B 活性化メカニズムの解析に従事し、HOIP が NF- κ B 活性化の中核をなす IKK 複合体(IKK1/IKK2/NEMO)のうち活性調節サブユニットである NEMO を選択的に認識し直鎖化することを同定した。さらに、NEMO に付加された直鎖を他の NEMO が認識することで IKK2 の交互自己リン酸化を引き起こし、IKK 複合体が活性化される新規メカニズムを報告した(図 1) (Fujita *et al.*, Mol. Cell Biol. 2014)。

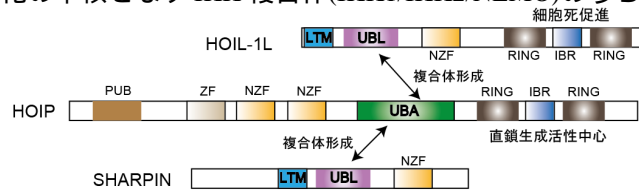


図 2 LUBAC のドメイン図

申請者は、さらに LUBAC によって生成される直鎖が NF- κ B 活性化非依存的に Complex II 形成を抑制し、細胞死を抑制することを見いだした。申請者は細胞死抑制メカニズムを解析するために、HOIP、HOIL-1L、SHARPIN 三者欠損(LUBAC TKO)細胞を樹立し、細胞死の制御に必須な LUBAC のドメインを探索した。その過程で、HOIP に加え HOIL-1L が細胞死の制御に非常に重要な役割を担っていることを見出した。

2. 研究の目的

これまで LUBAC は TNF- α 依存的な細胞死を抑制することが知られていたが、そのメカニズムは不明であった。今回、LUBAC TKO細胞に LUBAC の各サブユニットの入れ戻しを行なった結果、HOIP に加えて HOIL-1L が細胞死制御に重要な役割を担っていることが明らかになった。そこで、HOIL-1L の細胞死制御に關与する領域を明らかにし、細胞死制御メカニズムを解明すると共に、HOIL-1L 欠損マウスの作成・解析より生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

LUBAC TKO 細胞に HOIP に加え HOIL-1L の入れ戻しを行い、細胞死制御に重要な HOIL-1L の領域を探索した。細胞死は TNF- α 刺激後、タンパク質を抽出し western blotting により解析を行った。その結果、LUBAC による細胞死抑制に必須の HOIL-1L のドメインに加え、驚いたことに細胞死を促進する HOIL-1L の領域も見出した。そこで細胞死抑制に必須のドメインを欠失させた HOIL-1L 欠失マウスを CRISPR/Cas9 システム、細胞死を促進するドメインを欠失させたマウスを Cre/LoxP システムで作出し、表現型の解析を行なった。

4. 研究成果

HOIL-1L の各種ドメイン欠失変異体(マウスの HOIL-1L コンストラクトを使用)を作成し、LUBAC TKO 細胞に HOIP と HOIL-1L の各種領域を欠損させた変異体の入れ直しを行い、細胞死制御に重要な HOIL-1L の領域を探索した。その結果、LUBAC の安定化に寄与する HOIL-1L UBL が細胞死制御において重要な役割を担っていることを見出した。これまでに LUBAC のアクセサリー分子である HOIL-1L と SHARPIN は相同性の高い UBL ドメインで HOIP UBA ドメインと相互作用し、LUBAC の安定化に関与することがわかっていた。そこで次に HOIL-1L と SHARPIN の UBL ドメインの差異を解析したところ、驚いたことに HOIL-1L UBL ドメインでは HOIP が安定化し TNF- α 依存的な細胞死が回避されたが、SHARPIN UBL ドメインでは HOIP は全く増加せず、細胞死の回復もみられなかった。これら結果より HOIL-1L と SHARPIN では LUBAC 安定化において差異があることがわかった。これまでに SHARPIN 欠損マウスでは LUBAC の発現量が著減し、慢性皮膚炎を呈することがわかっており、SHARPIN も LUBAC の安定化に寄与することが知られていた。しかし、上記結果から SHARPIN 単独では HOIP を安定化させることはできなかったため、次に SHARPIN による LUBAC 安定化メカニズムに着目し解析を行なった。LUBAC は細胞内では三者複合体で存在しているので、SHARPIN が LUBAC 三者での安定化に寄与する可能性を考え、TKO 細胞に HOIP/HOIL-1L を発現させた細胞にさらに SHARPIN を発現させる実験を行った。その結果、HOIL-1L 存在下では SHARPIN によって HOIP の発現量がさらに増加することを見出した。これらの結果は SHARPIN が LUBAC 三者での安定化に重要であることを示唆していた。そこで、そのメカニズムを解明するために HOIL-1L、SHARPIN の UBL ドメインを含む結合部位の共結晶構造解析を行なった(図 3)。その結果、HOIL-1L UBL、SHARPIN UBL は HOIP UBA のそれぞれ別々の領域に結合すること、さらに驚いたことに HOIL-1L/SHARPIN が UBL の N 末端領域で相互作用することを見出した。BIACORE を用いてこの新規相互作用の役割を調べたところ、新規に見出した HOIL-1L/SHARPIN 結合は LUBAC 三者での複合体形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。これまでに LUBAC の異常活性化はがんなどの疾患につながるということが知られている。そこで、この新規結合を阻害することでがん細胞を死滅出来るか実験を行った。この新規相互作用部位を阻害する架橋ペプチドを作成したところ、LUBAC が不安定化し、がん細胞を死滅できることが明らかになった。

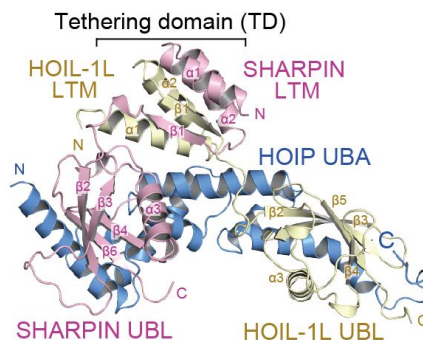


図 3 LUBAC 三者の構造

また HOIL-1L UBL の生理的な意義を明らかにするために HOIL-1L UBL 欠損マウスを CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した。このマウスは細胞死が亢進することで HOIP 欠損マウスと同時期(E10.5)で胎生致死となったことから HOIL-1L が HOIP と同様に非常に重要なサブユニットであることが明らかになった。またマウスの結果は HOIL-1L UBL では HOIP が安定化するが SHARPIN UBL 単独では HOIP を安定化できない上記結果と一致しており、マウスレベルで上記結果を裏付けることができた(文献 1)。



図 4 HOIL-1L null マウスの胎児

また上記の HOIL-1L の制御ドメインを探索する中で、HOIL-1L の RING1-IBR-RING2 (RBR) ドメインの新規機能を見出した。これまで LUBAC の直鎖形成は HOIP の RBR ドメインが担っていることが知られていたが、HOIL-1L の RBR ドメインの機能は不明瞭であった。TKO 細胞に HOIP に加え HOIL-1L RBR ドメインを欠失させた変異体を発現させると、驚いたことに LUBAC による細胞死抑制能が顕著に亢進することを見出した。メカニズムを探索したところ HOIL-1L RBR 欠失変異体では LUBAC による直鎖形成が亢進することを見出し、HOIL-1L の RBR が LUBAC の直鎖形成・細胞死の制御に重要であることを明らかにした。また、HOIL-1L による LUBAC の活性制御メカニズムを探索したところ、HOIL-1L RBR は HOIP、HOIL-1L、SHARPIN にモノユビキチンを付加し、付加されたモノユビキチンに HOIP が直鎖を付加することで、LUBAC が直鎖化されることを見出した。これまでに直鎖を切断する脱ユビキチン化酵素である OTULIN を欠損させた細胞では LUBAC の直鎖化が亢進し、LUBAC の機能が抑制されるこ

とが報告されていた(Klaus *et al.*, Nature 2018)。これらの結果を踏まえると、HOIL-1L による LUBAC のモノユビキチン化が核となり、そこに HOIP が直鎖を付加することで LUBAC 自身が直鎖化され、機能が抑制されることが示唆された。

さらに HOIL-1L の RBR ドメインの生理的機能を明らかにするために RING1 ドメインを欠失させた変異体マウスを作成したところ、LPS+D-GalN による肝障害モデルにおいて、細胞死が著減し肝障害に耐性になることを見出した。また SHARPIN が欠失することでケラチノサイトの細胞死が亢進し、皮膚炎を呈する cpdm マウスに HOIL-1L RING1 ドメイン欠失マウスを掛け合わせると、皮膚炎が回復したことから、HOIL-1L の RING ドメインの細胞死制御メカニズムの重要性をマウスレベルで示した(文献 2)。

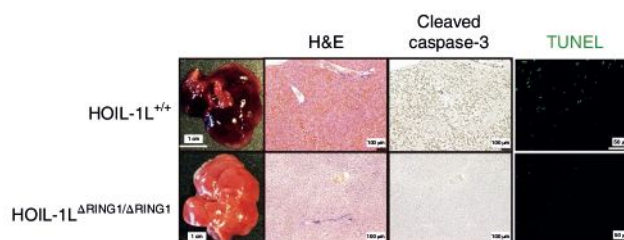


図 5 HOIL-1L Δ RING1 マウスは肝障害モデルに耐性である

5 . 主な発表論文等

(文献 1)

Fujita H, Tokunaga A, Shimizu S, Whiting AL, Aguilar-Alonso F, Takagi K, Walinda E, Sasaki Y, Shimokawa T, Mizushima T, Ohki I, Ariyoshi M, Tochio H, Bernal F, Shirakawa M, and Iwai K., Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization. *Cell reports*, 23(4), 1192-1204 (2018)

(文献 2)

Fuseya Y, Fujita H, Kim M, Ohtake F, Nishide A, Sasaki K, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi R, Iwai K. The HOIL-1L ligase modulates immune signalling and cell death via monoubiquitination of LUBAC. *Nature Cell Biology*, 22(6), 663-673 (2020)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 医科研若手シンポジウム 口頭発表 2019 年 1 月 31 日
“LUBAC 安定化機構の解明と応用”
藤田宏明
2. 第 41 回日本分子生物学会 ポスター発表 2018 年 11 月 28 日
“Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization”
藤田宏明
3. 第 91 回日本生化学会 ポスター発表 2018 年 9 月 24 日
“Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization”
藤田宏明
4. 第 40 回日本分子生物学会 シンポジウム 口頭発表 2017 年 12 月 9 日
“Crystal structure of trimeric LUBAC reveals essential role of a novel HOIL-1L-SHARPIN interaction in LUBAC formation and function”
Fujita, H., Tokunaga A., Iwai, K.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.mcp-kyoto-u.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：伏屋康寛
ローマ字氏名： Fuseya Yasuhiro

研究協力者氏名：岩井一宏
ローマ字氏名： Iwai Kazuhiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。