

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06635

研究課題名(和文)直鎖状ポリユビキチン鎖による細胞生死の運命決定機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of cell survival and death by linear ubiquitin chains

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：直鎖状ユビキチン(Ub)を特異的に生成するLUBACリガーゼは直鎖生成の活性中心HOIP、アクセサリ分子HOIL-1L、SHARPINからなりNF- κ B活性化、細胞死抑制に関与する。HOIL-1Lにも存在するUbリガーゼ活性を消失させるとLUBACの直鎖形成が亢進し、細胞死が顕著に抑制された。一方で直鎖を特異的に切断するOTULINの欠損細胞では直鎖は増加するものの、細胞死は亢進した。その機序を解明し、HOIL-1LがLUBACをモノUb化し、そのUbが直鎖化されることでLUBACの機能を抑制し、OTULINがLUBACの直鎖を切断することでLUBACの機能抑制を解除することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LUBACはNF- κ Bシグナルや細胞死抑制を担う非常に重要なタンパク質複合体である。特にNF- κ Bや細胞死はがんなどの様々な疾患と深い関係があるため、LUBAC、直鎖の制御機構を解明することは非常に重要である。本研究ではLUBACの新たな制御様式を明らかにし、HOIL-1LのUbリガーゼ機能の欠失がLUBACの機能亢進に関与することを見出した。また細胞内直鎖が亢進するOTULIN欠損細胞では細胞死が亢進し、そのメカニズムとしてLUBAC自身の直鎖化が関与していることを見出した。これらはLUBACの新たな制御機構を明らかにするもので、非常に重要な意義を秘めている。

研究成果の概要(英文)：LUBAC ubiquitin (Ub) ligase, which specifically generates linear Ub chains, consists of catalytic center HOIP for linear Ub chains generation and accessory subunits HOIL-1L and SHARPIN, and is involved in NF- κ B activation and cell death protection. Interestingly, HOIL-1L also has Ub ligase activity but its significance was unknown. We found that deletion of HOIL-1L Ub ligase activity enhances LUBAC activity and cell death was remarkably suppressed. On the other hand, deletion of OTULIN, which specifically cleaves linear Ub chains, increased linear Ub chains in cells but cell death was promoted. We elucidated this mechanism and found that HOIL-1L attached mono-Ub into LUBAC and the Ub is linear ubiquitinated by LUBAC to suppress LUBAC function, and OTULIN cleaves the linear Ub chains of LUBAC to release linear ubiquitinated compromise LUBAC.

研究分野：細胞死

キーワード：LUBAC 細胞死 OTULIN ユビキチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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、またはユビキチン(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。

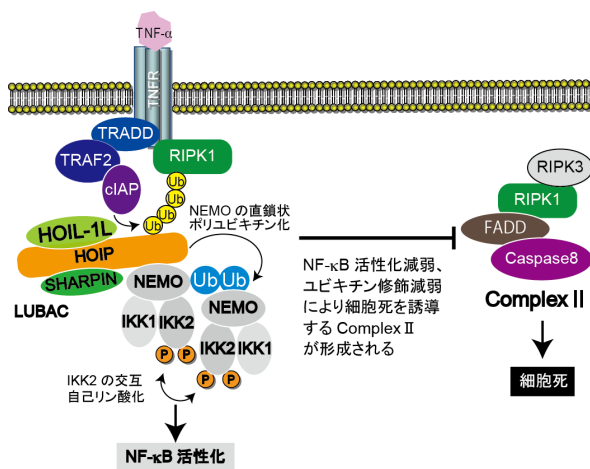


図1 TNF- α シグナル経路

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 シグナル活性化に関与する新規 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状 Ub 鎖(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。我々はこれまでに LUBAC の 3 サブユニットを欠損させた TKO 細胞を作成し、様々な変異体の入れ戻しから LUBAC の機能ドメインの詳細な解析を行ってきた。特に HOIL-1L に存在する UB ドメインは LUBAC 複合体の安定化に必須の役割を担い、HOIL-1L が非常に重要なアクセサリサブユニットであることを示してきた。

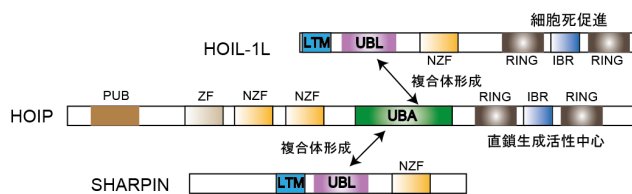


図 2 LUBAC のドメイン図

さらに HOIL-1L のドメイン構造に着目し様々な HOIL-1L 変異体を作成し TKO 細胞に HOIP と共発現し解析したところ、HOIL-1L にも存在する RBR ドメインを不活化した変異体を入れ戻すと、LUBAC による直鎖生成が亢進し、細胞死が顕著に抑制されることを見出した(図 3)。一方で、直鎖を特異的に切断する脱 Ub 化酵素 OTULIN の欠損細胞では、細胞内の直鎖量は増大するものの、細胞死は亢進した。これらの結果は細胞内の直鎖量が細胞の生死を決定するのではなく、直鎖化される基質の違いによって細胞死が決定される可能性を示唆した。

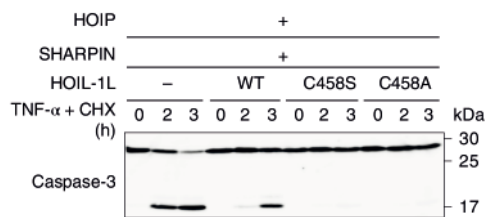


図 3 HOIL-1L RBR 変異体による細胞死抑制

2. 研究の目的

本研究では上記背景のもと、HOIL-1L RBR の活性を消失させた変異体発現細胞でみられる細胞死抑制、OTULIN 欠損細胞でみられる細胞死亢進のメカニズムについて詳細に解析を行う。これらの結果は、細胞内の直鎖量が細胞生死の運命を決定づけるのではなく、直鎖化される基質の相違により細胞の生死が決定されることを示しており、直鎖による細胞死制御メカニズムを解明するために重要である。

3. 研究の方法

LUBAC の 3 サブユニットを消失させた TKO 細胞に HOIP、HOIL-1L 野生型 もしくは RBR 変異体、SHARPIN の入れ戻しを行い、細胞死を評価した。また OTULIN 欠損細胞を CRISPR/Cas9 技術で作成し、細胞死を評価した。作成した細胞で直鎖化されることが知られていた基質に関して、ウェスタンブロットティングなどで直鎖化の状態を評価した。また HOIL-1L

RBR 変異をもつマウスを作成し、表現型の解析を行なった。

4. 研究成果

HOIL-1L RBR 活性消失変異体を発現する細胞では、HOIL-1L のモノ Ub 化が減弱することを見出した(図 4)。そこで、HOIL-1L 自身のモノ Ub 化が細胞死の制御に重要か解析するため、HOIL-1L に存在する全てのリジンをアルギニンに置換した変異体 HOIL-1L を作成し、細胞に発現させたところ、LUBAC の直鎖量の亢進、さらに細胞死が顕著に抑制されることを見出した。これらの結果から、HOIL-1L は自身をモノ Ub 化することで LUBAC の機能を抑制することを見出した。



図 4 HOIL-1L による自己 Ub 化

さらに詳細にメカニズムを解析したところ、HOIL-1L が付加したモノ Ub に、HOIP が直鎖を付加し、直鎖化された LUBAC は機能が抑制されることを見出した。これらの結果より、HOIL-1L RBR 変異体発現細胞では自身の直鎖化が抑制されることで、他の基質に直鎖が付加されやすくなり、細胞死が抑制される可能性が示唆された。

次に OTULIN 欠損細胞の解析を行なったところ、OTULIN 欠損細胞では LUBAC の直鎖化が顕著に亢進することを見出した。そこで OTULIN 欠損細胞に HOIL-1L の RBR 変異体を発現させたところ LUBAC の直鎖化が消失し(図 5)、さらに細胞死が抑制された。これらの結果から OTULIN 欠損細胞では LUBAC の直鎖化が亢進することで細胞死が亢進することが示唆された。OTULIN は HOIP と特異的に結合することが報告されており、HOIP と結合することで LUBAC に付加されてしまった直鎖を剪定し、LUBAC の機能を維持していることが示唆された。

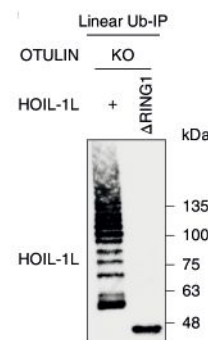


図 5 OTULIN 欠損でみられる HOIL-1L 直鎖化が HOIL-1L RBR 変異体で抑制される

上記結果より、HOIL-1L RBR は自身をモノ Ub 化し、HOIP が付加されたモノ Ub に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のを OTULIN が切断することで LUBAC の機能を担保していることが示唆された。

これらの結果が生体内でも重要であるか解析するため、HOIL-1L RBR 活性が消失したマウスを作成し、表現型を解析した。変異マウスは全臓器で直鎖の生成が亢進し、さらに炎症症状を発症した。さらに LPS+D-Gal による肝細胞死誘導モデルにおいて、変異マウスは耐性を示すことを見出した(図 6)。これらの結果より、LUBAC の直鎖化による制御が生体内においても非常に重要であることを示した。さらに上記結果をまとめて、論文化を行なった。

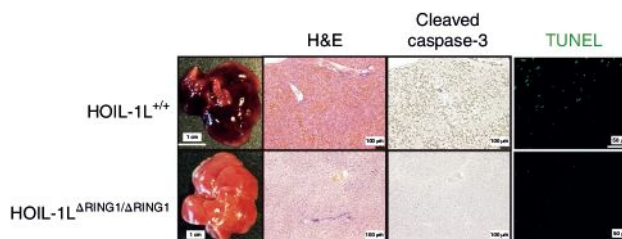


図 6 HOIL-1L 変異体発現マウスによる肝細胞障害抑制

さらに上記解析の過程で OTULIN にヘテロ変異を持ち、炎症疾患を発症する患者さんについて北海道大学との共同研究も行なった。これまで報告されていた OTULIN に変異を持つ患者さんは非常に不安定な OTULIN 変異体をホモで発現しており、OTULIN の発現が消失することで炎症性疾患を発症していた。今回のヘテロ変異体での炎症発症メカニズムは未知であったため解析したところ、今回同定した OTULIN 変異体は直鎖を切断する活性が著減していることは既報の変異体と同じであったが、既報の変異体と比べタンパク質自体が安定であることを見出した。また患者さんから iPS 細胞を樹立し、LUBAC の直鎖化などを評価したところ、TNF などの刺激によって LUBAC の直鎖化が亢進すること、さらに細胞死が亢進することを見出した。これらの結果より、今回同定した変異体は既報と比べ OTULIN 自体が安定であり、その結果ドミナントネガティブ変異体として機能し、LUBAC の直鎖化の亢進、細胞死が誘導されることを見出した。

上記結果より、LUBAC の直鎖化が細胞死を決定する一つの要因となることを、細胞レベルまた疾患との繋がりから明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fuseya Y., Fujita H., Kim M., Ohtake F., Nishide A., Sasaki K., Saeki Y., Tanaka K., Takahashi R., Iwai K.	4. 巻 22
2. 論文標題 The HOIL-1L ligase modulates immune signalling and cell death via monoubiquitination of LUBAC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 663-673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-020-0517-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤田宏明
2. 発表標題 Novel insights into linear ubiquitin chain assembly complex formation
3. 学会等名 EMBO conference : The ubiquitin system: Biology, mechanisms and roles in disease (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤田宏明
2. 発表標題 LUBAC安定化機構の解明と応用
3. 学会等名 医科研若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤田宏明
2. 発表標題 Mathematical modeling of biological systems that regulate cell survival and death
3. 学会等名 数理シグナル 第一回国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伏屋 康寛 (Fuseya Yasuhiro) (60866523)	京都大学・医学部細胞機能制御学・助教 (14301)	
研究協力者	岩井 一宏 (Iwai Kazuhiro) (60252459)	京都大学・医学部細胞機能制御学・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------