

令和 4 年 4 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16144

研究課題名（和文）新規直鎖状ユビキチン鎖生成賦活法を用いた感染防御と新機能の探索

研究課題名（英文）Infection control via activating linear ubiquitin chain formation

研究代表者

伏屋 康寛（Fuseya, Yasuhiro）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：60866523

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）：直鎖状ユビキチン鎖を特異的に生成するLUBACは直鎖生成の活性中心を有するHOIP、アクセサリー分子であるHOIL-1L、SHARPINの三者複合体からなる。LUBACは直鎖を生成するHOIP以外に、HOIL-1Lもリガーゼ活性を有するユニークなリガーゼ複合体である。本研究ではHOIL-1Lのリガーゼ活性の解析に着手し、LUBACの副活性であるHOIL-1Lリガーゼが主活性であるLUBACの生理機能を抑制するというユビキチンリガーゼの新たな制御様式を発見し、胎児繊維芽細胞（MEF）においてHOIL-1Lリガーゼの活性阻害によるLUBACの機能亢進が、サルモネラ菌の感染を抑制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

免疫応答や細胞死制御に加え、感染防御に重要な役割を果たす複合体ユビキチンリガーゼLUBACの新規活性制御機構を明らかにした。HOIL-1Lのユビキチンリガーゼ活性はLUBACの直鎖状ユビキチン鎖生成能を抑制しており、HOIL-1Lのリガーゼ活性を阻害すれば、LUBACの機能を増強できることを見出した。また細胞レベルでHOIL-1Lのリガーゼ活性阻害によるLUBACの機能亢進は、サルモネラ菌感染を抑制することを見出した。

研究成果の概要（英文）：LUBAC, which specifically generates linear ubiquitin chains, consists of HOIP, SHARPIN, and HOIL-1L. LUBAC contains two distinct ubiquitin ligases, one each in HOIP and HOIL-1L, and HOIP specifically generates linear chains as the main catalytic center of LUBAC. The physiological significance of the second ligase of HOIL-1L within LUBAC remained elusive. We revealed that HOIL-1L ligase activity down-regulated LUBAC physiological functions via monoubiquitination of LUBAC subunits. We also found that introduction of a HOIL-1L mutant lacking E3 activity protected cells from Salmonella infection by augmenting linear ubiquitination by LUBAC.

研究分野：医化学一般

キーワード：LUBAC HOIL-1L 直鎖状ユビキチン鎖 ユビキチン サルモネラ 細胞死

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

TNF- $\alpha$ 等のデスレセプターは、細胞の生存を促すNF- $\kappa$ B活性化に加え、細胞死を誘発するという相反するシグナルを伝達する(図1)。応募者の所属研究室で発見されたLUBACユビキチンリガーゼ複合体は直鎖状ユビキチン鎖(直鎖)を特異的に生成することでTNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカイン刺激依存的なNF- $\kappa$ B活性化と細胞死抑制に関与し、その相反するシグナル系において中核的な機能を果たす(図1)。LUBACはHOIP、HOIL-1L、SHARPINの三者から構成されるが(図2)、所属研究室ではSHARPIN欠損によりLUBACが著減したマウスが免疫不全や自己炎症を発症することを報告し(Tokunaga *et al.*, Nature, 2011)、その後ヒトでもHOIL-1L、HOIPの変異が免疫不全と自己炎症の併発疾患を惹起することが報告された。加えて代表的な日和見感染症の原因菌の1つであるアスペルギルスは、病原因子を分泌しLUBACを阻害することで感染することも見出した(Sakamoto *et al.*, ACS. Chem. Biol. 2015)。さらに近年、LUBACはNF- $\kappa$ B活性化とオートファジーを誘導することで赤痢菌やサルモネラ菌など種々の病原微生物の排除に重要な役割を果たすことも報告されおり、LUBACの感染防御における重要性が脚光を浴びつつある。

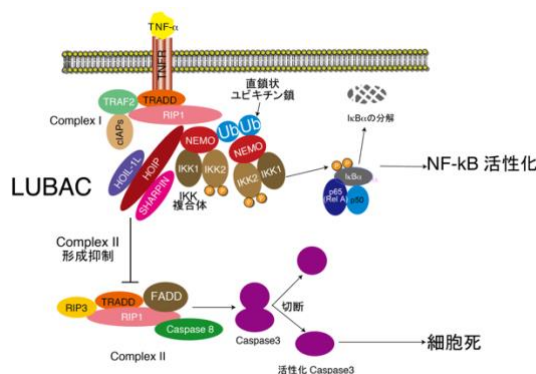


図1 TNF- $\alpha$ シグナル経路

LUBACの直鎖状ユビキチン鎖生成の活性中心はHOIPのRING-IBR-RING(RBR)ドメインであるが、HOIL-1LにもRBRドメインが存在する(図2)。つまりLUBACは、1つの複体内に2種類のユビキチンリガーゼを有するという点でも非常にユニークなユビキチンリガーゼ複合体である。応募者は長らく機能の不明瞭であったHOIL-1Lのユビキチンリガーゼ活性に注目して解析を進めた。その結果、HOIL-1LがLUBACによる直鎖状ユビキチン鎖生成活性を抑制することで、LUBACの細胞死抑制能やNF- $\kappa$ B活性化能を減弱させるというLUBACの全く新しい制御メカニズムが明らかになってきた。

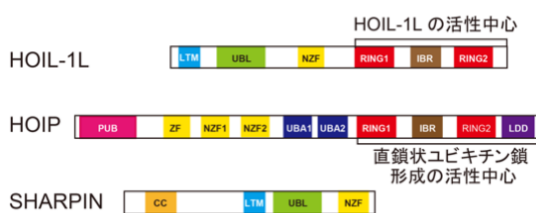


図2 LUBACユビキチンリガーゼ複合体

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、HOIL-1Lのリガーゼ活性がLUBACの生理機能を抑制し、HOIL-1Lのリガーゼ活性の欠失がLUBAC活性を亢進させるとの応募者の発見に基づき、新たな感染症制御法の開発、LUBACの新機能の解明を進めることである。またLUBACは病原微生物の排除にも寄与するので、HOIL-1LのE3活性を阻害してLUBACの機能を亢進すれば、病原菌の感染制御をできるかを検討する。

### 3. 研究の方法

HOIL-1Lのユビキチンリガーゼ活性を欠失させたマウス胚線維芽細胞(MEF)に細胞内寄生菌であるサルモネラ菌を感染させることで、野生型MEFと比してサルモネラ菌増殖を抑制すること

ができるかを検討する。またサルモネラ菌感染により誘導される細胞死の差異も検討することとした。

#### 4. 研究成果

申請者が見出した HOIL-1L の E3 リガーゼ活性が LUBAC の機能を抑制することに関する分子メカニズムの解析を進めたところ、HOIL-1L が LUBAC の全サブユニットの一つユビキチンを結合させ（モノユビキチン化）、そのユビキチンの上に HOIP が直鎖状ユビキチン鎖を付けることで LUBAC 自身を自己直鎖状ユビキチン化することを明らかにした (Fuseya *et al.*, Nat. Cell. Biol.

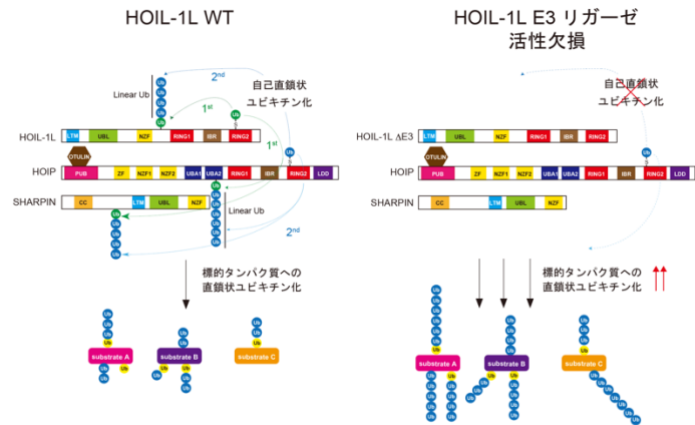


図3 HOIL-1L の E3 リガーゼ活性による LUBAC リガーゼ複合体の制御メカニズム

2020) (図 3)。LUBAC 自身の直鎖状ユビキチン化は LUBAC の機能低下を引き起こすこと、また LUBAC と結合し直鎖状ユビキチン鎖を選択的に切断する脱ユビキチン化酵素である OTULIN が LUBAC 上の直鎖状ユビキチン鎖を剪定することで LUBAC の機能を維持することは知られているので、HOIL-1L の E3 リガーゼ活性は HOIP による LUBAC 自身の直鎖状ユビキチン化を誘発する足場を作ることで LUBAC の機能を抑制し、さらに OTULIN がその抑制性制御に対して拮抗するというユビキチンリガーゼ複合体の全く新しい制御機構を明らかにした(図 3)。

LUBAC は細胞内寄生菌であるサルモネラ菌が細胞質に侵入すると、サルモネラ菌に直鎖状ユビキチン鎖を結合させることで、1) 結合した直鎖状ユビキチン鎖が同ユビキチン鎖を特異的に結合するオートファジーアダプターである Optineurin に認識されてオートファジーに導くこと、2) 直鎖状ユビキチン鎖を特異的に認識する NEMO をサルモネラ菌

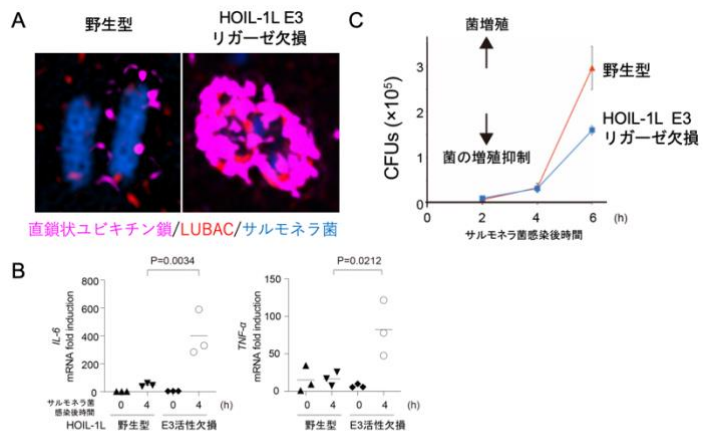


図4 LUBACの機能亢進は、サルモネラ菌の増殖を抑制する

にリクルートすることで NF-κB 活性化を誘導すること、でサルモネラ菌感染を抑制することがこれまでに報告されていた。そこでサルモネラ菌を用いて、HOIL-1L の E3 リガーゼ活性欠損による LUBAC の機能亢進が細胞内寄生菌であるサルモネラ菌の感染防御における役割を解析した。申請者が作成した HOIL-1L の E3 リガーゼ活性が欠損したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) にサルモネラ菌を感染させたところ、野生型細胞に比べ、サルモネラ菌に直鎖状ユビキチン鎖が多量に付加されることで NF-κB が顕著に活性化し、その結果サルモネラ菌の増殖を抑制することを明らかにした (図 4. A-C)。これは HOIL-1L の E3 リガーゼ活性を低下させることで LUBAC の機能を亢進させることができれば、サルモネラ菌の感染制御に寄与できる可能性を示唆する結果だった。(Fuseya *et al.*, Nat. Cell. Biol. 2020)

〈引用文献〉

- (1) Fuseya Y et al. The HOIL-1L ligase modulates immune signalling and cell death via monoubiquitination of LUBAC. *Nat Cell Biol.* 2020;22(6):663-73.
- (2) Tokunaga F et al. SHARPIN is a component of the NF- $\kappa$ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* 2011, 471, 633-636,
- (3) Sakamoto, H. et al. Gliotoxin suppresses NF- $\kappa$ B activation by selectively inhibiting linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). *ACS. Chem. Biol.* 10, 675-681 (2015).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Yasuhiro, Fujita Hiroaki, Kim Minsoo, Ohtake Fumiaki, Nishide Akira, Sasaki Katsuhiro, Saeki Yasushi, Tanaka Keiji, Takahashi Ryosuke, Iwai Kazuhiro	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 Nature Cell Biology	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 -

1. 著者名 Fuseya Yasuhiro, Iwai Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Biochemistry, Pathophysiology, and Regulation of Linear Ubiquitination: Intricate Regulation by Coordinated Functions of the Associated Ligase and Deubiquitinase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102706	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 伏屋康寛、岩井一宏	4. 巻 75
2. 論文標題 免疫応答と細胞死を制御する直鎖状ユビキチン鎖の生成調節機構の解明とその応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 730-736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伏屋康寛	
2. 発表標題 LUBAC ユビキチンリガーゼの新たな制御機構の解明と免疫賦活への応用	
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 ワークショップ「多彩な生理機能を発揮するユビキチンコードのバイオロジー」	
4. 発表年 2020年	

1. 発表者名 伏屋康寛
2. 発表標題 免疫応答と細胞死を制御するLUBACの制御機構の解明とその応用
3. 学会等名 新学術領域「ケモビキチン」第2回若手主体発表会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>感染防御に寄与する酵素の制御機構を解明 - 感染症や免疫不全の新規治療ターゲットへ -  <a href="https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2020-05-15-0">https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2020-05-15-0</a></p>
---

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

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
---------	---------