

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390070

研究課題名(和文) 新たな生物モデル系を用いた直鎖状ポリユビキチン鎖の生理機能解析

研究課題名(英文) Investigation of physiological function of linear polyubiquitination using various biological models

研究代表者

徳永 文稔(Tokunaga, Fuminori)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：00212069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ Bシグナルとインターフェロン産生経路は、多くの生物種の生体防御で中枢的な役割を果たす。本研究で我々は、直鎖状ユビキチンという新しいタイプのユビキチン鎖を生成する酵素(LUBAC)の新たなサブユニットとしてSHARPINを同定し、その欠損が皮膚炎を引き起こすことを見出した。また、脱ユビキチン化酵素のA20は、7番目のZnフィンガー領域が直鎖状ユビキチン特異的結合ドメインとして進化的に高度に保存されていることを示した。さらに、侵入DNAウイルス感知に働くcGAS酵素のDNA認識やインターフェロン産生に重要なアミノ酸残基を同定した。

研究成果の概要(英文)：NF- κ B signaling and interferon production pathway play a pivotal role on biological defense system in various species. In this study, we identified that SHARPIN is an additional subunit of LUBAC, which produces a novel type of linear polyubiquitin chain and regulates NF- κ B pathway. Genetic deficiency of SHARPIN causes severe inflammation such as dermatitis in mice. Furthermore, we showed that A20, a deubiquitinase, involves evolutionary conserved linear ubiquitin specific binding site at 7th ZF domain. Moreover, we analyzed structure-function study of virus DNA sensor protein, cyclic GMP-AMP synthase (cGAS).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医学一般

キーワード：酵素 タンパク質 細胞・組織 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾は標的タンパク質を分解に導くシグナルとして発見され、時空間特異的な細胞内タンパク質分解の生理的重要性に鑑みて 2004 年にユビキチン系の発見者らにノーベル化学賞が受賞されるに至った。しかし、その後の研究からユビキチン修飾はタンパク質分解のみならず、シグナル伝達制御、DNA 修復、細胞内局在など多彩で広範囲な生理機能に関与することが明らかにされ、ユビキチン系の研究は拡大の一途を辿っている。ユビキチン修飾系がリン酸化などと異なり、多彩な生理機能を発揮できる分子機構は、ユビキチンが標的タンパク質に対して多様な分子数や連結様式で付加される点にある。典型例として Lys48 ポリユビキチン鎖はプロテアソーム分解のシグナルとして寄与するが、Lys63 ポリユビキチン鎖はシグナル伝達や DNA 修復など非分解シグナルとして機能することが知られる。

我々は RING 型ユビキチンリガーゼの HOIL-1 を発見し (Nature Cell Biol., 2003; Mol. Cell 2005)、細胞内では HOIL-1 のアイソフォームである HOIL-1L がその結合タンパク質 (HOIP) と高分子量複合体 (LUBAC) を形成して、これまでのユビキチン結合の概念を超越するユビキチンの N 末端 α -アミノ基を介する「直鎖状ポリユビキチン鎖」を生成することを見いだした (EMBO J., 2006)。さらに我々は、LUBAC が NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することで NF- κ B 経路を特異的に活性化することを世界に先駆けて報告した (Nature Cell Biol., 2009)。これまで Chen ら (米国) によって、Lys63 ポリユビキチン鎖生成が NF- κ B や MAP キナーゼの活性化の際の足場として重要な働きをすると示されていたが、我々は直鎖状ポリユビキチン鎖が NF- κ B 経路特異的なトリガーとなるという新たな知見を示した。その後、Dikic (ドイツ) と若槻ら (高エネ研) によって NEMO は Lys63 ではなく、直鎖状ユビキチンに特異的に結合することが構造的にも示され (Cell, 2009)、直鎖状ポリユビキチン鎖の生理的重要性が広く認識されてきた。これらの結果から、直鎖状ポリユビキチン鎖形成が TNF ファミリーリガンド (TNF- α 、CD40 など) の細胞応答に深く関与することが遺伝学的に明らかになり、その欠損が病態と関連することが示されつつある。

2. 研究の目的

NF- κ B は炎症、自然・獲得免疫制御、細胞接着、抗アポトーシスなどに関与する遺伝子群の発現を調節するので、その制御不全は慢性炎症や癌に密接に関係し、病態の面からも高く注目されている。これまで、ノックアウトマウス作製による NF- κ B 経路因子の遺伝子破壊が Karin (米国)、Pasparakis (ドイツ)、審良 (阪大)、中野 (順天堂大) を中心に行われ、多くの知見が得られている。しかしな

がら、他のシグナル伝達経路が多様な生物モデルを併せて用いることによって、革新的な評価方法を構築していったことに対して、NF- κ B 経路の研究では、ショウジョウバエの Toll 受容体からの抗菌ペプチド産生経路の解析はあるものの、多くはマウス偏重であり、他の脊椎動物モデルの利用は顧みられてこなかった。このため、マウスで胎生致死になった場合など、NF- κ B の生理機能解析で不明のまま残されている問題点もある。進化的に TNF- α リガンドファミリーは脊椎動物から産生され、これと関連するように LUBAC のサブユニットが出現する。そこで今回、多様な生物モデルを用いて、LUBAC を中心に NF- κ B 経路因子の生理機能解析を行うという先駆的研究を着想した。

3. 研究の方法

LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖形成を介した NF- κ B 活性化の生理的役割を新たなモデルを用いて解明するために、LUBAC の新規サブユニットの機能解析を行うとともに、そのタンパク質の進化的保存性、ノックダウンによる発生や器官形成への影響、LUBAC 遺伝子変異個体や恒常的な NF- κ B 活性化を引き起こす個体の表現型解析を行う。さらに、他の NF- κ B 経路因子との多重変異体作製へ進展させる。また、LUBAC による NF- κ B 活性化を抑制する細胞メカニズムを調べるとともに、生物種における保存性を解明する。

4. 研究成果

(1) LUBAC の新たなサブユニット SHARPIN の同定と皮膚炎との関連 (Tokunaga F. et al., Nature, 2011)

我々は、ユビキチンの C 末端 Gly76 が別のユビキチンの N 末端 Met1 にペプチド結合する全く新しい直鎖状ポリユビキチン鎖を生成するユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC を同定した。LUBAC は、TNF- α など炎症性サイトカイン刺激で惹起される古典的 NF- κ B 経路の制御に重要である。我々は、HOIL-1L と HOIP という 2 つのサブユニットに加えて、SHARPIN という HOIL-1L に高い相同性を示すタンパク質が生理的な LUBAC のサブユニットであることを同定した。SHARPIN 欠損マウス (*cpdm* マウス) は重篤な慢性皮膚炎を発症するが、この原因が細胞内の LUBAC 複合体が減少するため、NF- κ B 活性化が低下することに起因することを明らかにした。

(2) A20 による直鎖状ユビキチン認識を介した NF- κ B 制御 (Tokunaga F. et al., EMBO J. 2012)

LUBAC による NF- κ B 活性化を抑制する脱ユビキチン化酵素を検索し、A20 (TNFAIP3) を同定した。A20 は脱ユビキチン化酵素活性を介して直鎖状ユビキチンを分解するのではなく、C 末端 7 番目の Zn フィンガー (ZF7) が直

鎖状ユビキチンに特異的に結合することで NF- κ B 活性を阻害した。さらに、A20 ZF7 と直鎖状ユビキチンとの X 線結晶解析を行ったところ、ZF7 は遠位ユビキチンの Ile44 疎水性パッチと近位ユビキチンの α -ヘリックス領域を同時に識別していることが解った。ヒト A20 ZF7 において直鎖状ユビキチン認識に関わるアミノ酸残基は、哺乳類 A20 のみならず、アフリカツメガエルなど両生類、ゼブラフィッシュなど魚類、ホヤなど脊索動物まで進化的に保存されていた。しかし、A20 の 1 から 6 番目の ZF には保存されておらず、ZF7 が直鎖状ユビキチン結合に特化したドメインとして各生物種で保存されていると示唆された。これらの結果は、TNF シグナルが発生した脊索動物以降において、直鎖状ユビキチン鎖生成が NF- κ B 活性制御に重要であることを示唆する。

(3) ウイルス DNA 認識タンパク質 cGAS の構造と機能 (Kato K. et al., PLoS One, 2013)

多くの生物の生体防御反応において、自然・獲得免疫応答やインターフェロン分泌は中心的な役割を果たす。侵入した細菌やウイルスが含有する病原体関連分子パターンは、細胞表面または細胞内の受容体タンパク質によって捕捉され、NF- κ B シグナル経路やインターフェロン産生経路の活性化を導く。最近、DNA ウイルスの識別に重要な働きをすることが明らかになったヒト cyclic GMP-AMP 合成酵素 (cGAS) の構造と機能の解明を行い、X 線結晶構造解析によって cGAS において DNA 認識に重要と示された塩基性アミノ酸クラスターや Zn フィンガー領域が、インターフェロン産生や NF- κ B 活性など生理機能発現に重要であることを示した。cGAS は 2013 年に同定されたばかりの新規酵素であるが、先行して報告されたマウスやブタの cGAS の構造解析に加えて、今回のヒト酵素の解明がなされ、cGAS の外来 DNA 識別機構が進化的に保存されていることが解明された。cGAS は下流に小胞体膜タンパク質である STING を介して TBK1 キナーゼを活性化し、インターフェロン産生経路を主に活性化する。ルシフェラーゼ活性から NF- κ B の活性化も検知されたが、IKK や I κ B α のリン酸は検出出来ず、どのような経路で NF- κ B 活性化を導くか、今後の検討を要する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Kazuki Kato, Ryohei Ishii, Eiji Goto, Ryuichiro Ishitani, Fuminori Tokunaga, and Osamu Nureki: Structural and functional analyses of DNA-sensing and immune activation by human cGAS. **PLoS One**, 8, e76983, (2013), 査読有.
2. Naonobu Fujita, Eiji Morita, Takashi Itoh, Atsushi Tanaka, Megumi Nakaoka, Yuki Osada, Tetsuo Umemoto, Tatsuya Saitoh, Hitoshi Nakatogawa, Shouhei Kobayashi, Tokuko Hataguchi, Jun-Lin Guan, Kazuhiro Iwai, Fuminori Tokunaga, Kazunobu Saito, Koutaro Ishibashi, Shizuo Akira, Mitsunori Fukuda, Takeshi Noda, and Tamotsu Yoshimori: Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. **J. Cell Biol.** 203, 115-128, (2013), 査読有.
3. Fuminori Tokunaga: Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders. **J. Biochem.** 154, 313-323 (2013), 査読有.
4. Fuminori Tokunaga, Hiroshi Nishimasu, Ryuichiro Ishitani, Eiji Goto, Takuya Noguchi, Kazuhiro Mio, Kiyoko Kamei, Averil Ma, Kazuhiro Iwai, and Osamu Nureki: Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. **EMBO J.** 31, 3856-3870 (2012), 査読有.
5. Tobias Kensche, Fuminori Tokunaga, Fumiyo Ikeda, Eiji Goto, Kazuhiro Iwai, and Ivan Dikic: Analysis of NF- κ B essential modulator (NEMO) binding to linear and lysine-linked ubiquitin chains and its role in the activation of NF- κ B. **J. Biol. Chem.**, 287, 23626-23634 (2012), 査読有.
6. Hirokazu Yagi, Kazuhiro Ishimoto, Takeshi Hiromoto, Hiroaki Fujita, Tsunehiro Mizushima, Yoshinori Uekusa, Maho Yagi-Utsumi, Eiji Kurimoto, Masanori Noda, Susumu Uchiyama, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Iwai, and Koichi Kato: Non-canonical UBA-UBL interaction mediates formation of linear ubiquitin chain assembly complex. **EMBO Rep.**, 13, 462-468 (2012), 査読有.
7. Yoshinori Uekusa, Syunsuke Miura, Hiroaki Sasakawa, Eiji Kurimoto, Eri Sakata, Serve Oliver, Hirokazu Yagi, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Iwai, and Koichi Kato; Backbone and side chain ^1H , ^{13}C , and ^{15}N assignments of ubiquitin-like domain of human HOIL-1L, an essential component of linear ubiquitin chain assembly complex. **Biomol. NMR Assign.**, 6,

177-180 (2012), 査読有.

8. Masato Tomonaga, Nobuyuki Hashimoto, Fuminori Tokunaga, Megumi Onishi, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, and Kazuhiro Iwai; Activation of nuclear factor-kappa B by linear ubiquitin chain assembly complex contributes to lung metastasis of osteosarcoma cells. **Int. J. Oncol.** 40, 409-417 (2012), 査読有.
9. Fuminori Tokunaga and Kazuhiro Iwai: Linear ubiquitination: A novel NF- κ B regulatory mechanism for inflammatory and immune responses by the LUBAC ubiquitin ligase complex. **Endocrine J.**, 59, 641-652 (2012), 査読有.
10. Fuminori Tokunaga and Kazuhiro Iwai: LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses. **Microbes Infect.**, 14, 563-572 (2012), 査読有.
11. Fuminori Tokunaga, Tomoko Nakagawa, Masaki Nakahara, Yasushi Saeki, Masami Taniguchi, Shin-ichi Sakata, Keiji Tanaka, Hiroyasu Nakano, and Kazuhiro Iwai; SHARPIN is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin assembly complex. **Nature**, 471, 633-636 (2011), 査読有.
12. Fumiyo Ikeda, Yonathan Lissanu Deribe, Sigrid S. Skånland, Benjamin Stieglitz, Caroline Grabbe, Sjoerd van Wijk, Mirita Franz-Wachtel, Panchali Goswami, Vanja Nagy, Janos Terzic, Fuminori Tokunaga, Ariadne Androulidaki, Tomoko Nakagawa, Manolis Pasparakis, Kazuhiro Iwai, John P. Sundberg, Liliana Schaefer, Boris Macek, Katrin Rittinger, and Ivan Dikic; SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. **Nature**, 471, 637-641 (2011), 査読有.
13. Kyung-Soo Inn, Michaela U. Gack, Fuminori Tokunaga, Mude Shi, Lai-Yee Wong, Kazuhiro Iwai, and Jae U. Jung; Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. **Mol. Cell**, 41, 354-365 (2011), 査読有.

[学会発表](計 15 件)

1. 徳永文稔; 直鎖状ポリユビキチン修飾を介した NF- κ B 制御の B 細胞リンパ腫発症に

おける役割. **日本薬学会第 134 年会** シンポジウム: 翻訳後修飾に着目したシグナル伝達研究と創薬の最前線, 2014 年 3 月 30 日, 熊本

2. 徳永文稔; 直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B シグナル制御と疾患. **東京工業大学バイオサイエンスシンポジウム** 招待講演, 2014 年 2 月 18 日, 横浜
3. 徳永文稔; ユビキチン修飾による細胞機能制御と疾患. **第 60 回北関東医学会総会特別講演**, 2013 年 9 月 26 日, 前橋
4. Fuminori Tokunaga; Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation mechanism and its related disorders, **プロテイン・アイランド・松山(PIM)国際シンポジウム 2013** 招待講演, 2013 年 9 月 18 日, 松山
5. 徳永文稔; 直鎖状ポリユビキチン化を介した NF- κ B 制御と疾患. **第 86 回日本生化学会 シンポジウム 次世代シグナル伝達研究への展開**, 2013 年 9 月 12 日, 横浜
6. 徳永文稔、西増弘志、石谷隆一郎、瀧木理; 直鎖状ユビキチン化を介する NF- κ B 制御に関わる脱ユビキチン化酵素と疾患, **病態プロテアーゼ学会**, 2013 年 8 月 16 日, 大阪
7. Fuminori Tokunaga; Down-regulation mechanism for LUBAC-induced NF- κ B pathway, **The 35th Naito Conference: The ubiquitin-proteasome system: From basic mechanisms to pathophysiological roles.** July 11, 2013, Sapporo
8. Fuminori Tokunaga, Hiroshi Nishimasu, Ryuichiro Ishitani, and Osamu Nureki; Linear ubiquitin binding via A20 zinc finger 7 is involved in the canonical NF- κ B regulation, **Frontiers in the immunology and inflammation: From molecules to disease.** February 12, 2013, Tokyo
9. Fuminori Tokunaga; Activation and regulation mechanisms of the linear ubiquitination-mediated NF- κ B pathway. **1st International Symposium on Protein Modification in Pathogenic Dysregulation of Signaling.** February 1, 2013, Tokyo
10. 徳永文稔; 直鎖状ユビキチン生成を介した NF- κ B 制御と B 細胞リンパ腫との関連 **がん研究分野の特性を踏まえた支援活動公開シンポジウム.** 2013 年 1 月 30 日, 東京

11. 徳永文稔、西増弘志、石谷隆一郎、後藤栄治、野口拓也、岩井一宏、濡木理；A20 の直鎖状ポリユビキチン鎖特異的結合を介した NF- κ B 制御. **第 85 回日本生化学会** シンポジウム：ペールを脱いだユビキチン系の新機能 2012 年 12 月 16 日，福岡
12. 徳永文稔；直鎖状ユビキチン形成と NF- κ B シグナル伝達. **応用数理学会** 数理医学研究部会オーガナイズドセッション，2012 年 8 月 30 日，稚内
13. Fuminori Tokunaga; Specific recognition of linear ubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. **Keystone Symposium**, 2012 年 3 月 21 日，Whistler, Canada
14. 徳永文稔；直鎖状ポリユビキチン鎖：NF- κ B 制御に関わる新たな修飾機構と疾患. **第 9 回 Osteoimmunology Forum**, 2012 年 2 月 4 日，東京
15. 徳永文稔、中原匡咲、岩井一宏；LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖形成を介した NF- κ B 制御と疾患. **第 84 回日本生化学会** シンポジウム：拡大するユビキチンバイオロジー 2011 年 9 月 23 日，京都

〔図書〕(計 4 件)

1. 櫻井宏明、徳永文稔；次世代シグナル伝達研究 -先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開- (2013) **生化学**, 85(6), 403-404.

2. 徳永文稔；直鎖状ユビキチン化を介した NF- κ B 制御機構と疾患 (2013) **生化学**, 85(6), 414-422.
3. 徳永文稔；NF- κ B 経路の多様なポリユビキチン鎖による制御と疾患 **実験医学増刊号**, 30, 716-723 (2012).
4. 徳永文稔、岩井一宏；新規直鎖状ポリユビキチン鎖生成による NF- κ B シグナル制御 **実験医学**, 29, 2001-2006 (2011).

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
群馬大学生体調節研究所分子細胞制御分野
(<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molcb/index.html>)

群馬大学生体調節研究所
(<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
徳永 文稔 (TOKUNAGA FUMINORI)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：00212069

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし