

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年 4月 15日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657075

研究課題名(和文) ポリユビキチン鎖の連結特異的な検出法の構築と病理組織への応用

研究課題名(英文) Construction of polyubiquitin chain specific molecular probes and their applications to histopathologic examinations.

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

研究成果の概要(和文)：

ユビキチンは標的タンパク質に多様な様式で結合することでタンパク質分解、シグナル伝達など多彩な細胞機能を発揮する。我々は、ユビキチンの N 末端 Met を介する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(LUBAC)を同定し、これが炎症や免疫制御に重要な NF- κ B 経路を制御することを同定した。さらに本研究で我々は、脱ユビキチン化酵素の A20 が C 末端 7 番目のジンクフィンガー領域(ZF)で直鎖状ユビキチンに特異的に結合することで NF- κ B 活性化を阻害することを見だし、A20 ZF7 と直鎖状ユビキチンの共結晶構造解析を解明した。A20 ZF7 を 3 分子連結したタンパク質は、直鎖状ユビキチンに高親和性の分子プローブと応用可能である。

研究成果の概要(英文)：

The ubiquitin system functions as a pivotal post-transcriptional modification in numerous cellular functions, including protein degradation and signal transduction. We identified that LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) generates a novel type of Met1-linked linear polyubiquitin chain and specifically regulates the NF- κ B pathway, which is a central signaling pathway for inflammatory and immune responses. In this study, we show that A20, a deubiquitinase, suppresses NF- κ B activation by binding linear polyubiquitin via the C-terminal seventh zinc finger (ZF7), and we determined the crystal structures of A20 ZF7 in complex with linear diubiquitin. Importantly, we found that a tandem conjugate of three ZF7s is available as a high affinity molecular probe to detect linear polyubiquitin chain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ユビキチン、炎症、NF- κ B、細胞内シグナル伝達、分子プローブ

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系は、細胞周期、シグナル伝達、DNA修復、細胞内局在など多様な生理機能に関与し、その機能不全は癌、神経変性疾患、免疫不全などの病態を引き起こす。ユビ

キチン修飾系がマルチタスクを可能にしていく分子基盤は、ユビキチンが多様なポリユビキチン鎖を形成できる点にある。これまで 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なるが、Lys63 鎖はNF- κ B 活

性化やDNA 修復など非分解シグナルとして寄与することが知られている。

我々はHOIL-1L とHOIP からなるユビキチンリガーゼ複合体 (LUBAC) がユビキチンのN末端 α -アミノ基を介する「直鎖状ポリユビキチン鎖」という全く新しいタイプのポリユビキチン鎖を形成することを見いだした (Nat Cell Biol, 2003; Mol Cell, 2005; EMBO J, 2006)。さらに、我々はLUBAC がNF- κ B 経路の制御因子であるNEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することで古典的NF- κ B 経路を選択的に活性化することを明らかにした (Tokunaga et al., Nat Cell Biol, 2009)。最近、LUBAC の新規サブユニットを同定するとともに、その遺伝性欠損が慢性皮膚炎や二次リンパ器形成異常を引き起こすことを見いだしている (Tokunaga et al., Nature, 2011)。このように我々が世界に先駆けて同定した直鎖状ポリユビキチン鎖の重要性は広く認識されてきたが、従来、NF- κ B 経路の制御ではLys63 ポリユビキチン鎖の生成が重要と考えられていた。そこで今回、直鎖状ポリユビキチン鎖とLys63鎖を特異的かつ高感度に検出するシステムを構築し、慢性炎症などの病理組織における各ポリユビキチン鎖の生成を比較検討することを思い立った。

2. 研究の目的

本研究では、NF- κ B 活性化におけるポリユビキチン鎖生成の生理的・病理的役割を明らかにする目的で、タンパク質間相互作用を利用した新規手法により直鎖やLys63 鎖のポリユビキチン鎖を特異的かつ鋭敏に感知し、定性的・定量的に測定する系の構築を目指す。さらにこれを用いて培養細胞や病理組織における各ポリユビキチン鎖を検出することを到達目標とする。

3. 研究の方法

平成23 年度は、ポリユビキチン鎖のうち、直鎖型に特異的に結合するタンパク質機能ドメイン (UBAN ドメイン) やLys63 鎖特異的に結合するTAB2-NZF をタンデムに連結した組換えタンパク質を大腸菌にて発現し、まず各ユビキチン鎖に対する特異性と親和性を解析する。最適の組換え体を樹脂に不溶化し、新規基質タンパク質の検索に用いる。さらに、ビオチン化や蛍光基の付加により各ポリユビキチン鎖特異的なプロット法や組織染色法を確立する。また、FRET 法を用いて特異的ポリユビキチン鎖形成を検出するためにテルビウム-ランタノイド蛍光基をユビキチン変異体に付加して、直鎖またはLys63 ポリユビキチン鎖を特異的に検出する測定法を構築する。

平成24 年度はこれらの手法を用いて炎症性サイトカイン刺激に伴う細胞応答やB型肝炎、リウマチ、皮膚炎モデルマウスなどの組織染色に応用し、NF- κ B 活性化に伴う病態における直鎖やLys63 ポリユビキチン鎖生成の検出に用いる。

4. 研究成果

ユビキチンは、真核生物に高度に保存された低分子量球状タンパク質で、時空間特異的に標的タンパク質に結合されることでタンパク質分解、シグナル伝達、DNA 修復、エンドサイトーシスなど多彩な細胞機能発現を司る。このようなユビキチンの多機能性発現は、ユビキチンが分子内の7つのLys 残基を介した分岐鎖状ポリユビキチン鎖と我々が同定したN末端Metを介する直鎖状ポリユビキチン鎖という多様なポリユビキチン鎖生成が関与する。我々は、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が炎症や免疫制御に重要なNF- κ B 経路を制御することを同定した。本研究で我々は直鎖状ポリユビキチン鎖とLys63鎖を特異的かつ高感度に検出するシステム

を構築し、慢性炎症などの病理組織における各ポリユビキチン鎖の生成を比較検討することを思い立った。

興味深いことに我々は、LUBAC 活性を抑制する脱ユビキチン化酵素として同定した A20 は、脱ユビキチン化酵素ドメインで直鎖状ユビキチン鎖を分解するのではなく、C 末端 7 番目のジンクフィンガー領域(ZF)で直鎖状ユビキチンに特異的に結合することで LUBAC 活性や炎症性サイトカイン(TNF- α) 刺激によって惹起される NF- κ B を阻害することを見だし、A20 ZF7 と直鎖状時ユビキチンとの共結晶構造解析を行った。その結果、A20 ZF7 は遠位ユビキチンの Ile44 疎水性ポケットと近位ユビキチンの α -ヘリックス領域に同時に結合することで直鎖状ユビキチン鎖を認識し、Gly76-Met1 のユビキチン間結合を識別しているのではなかった (図 1)。

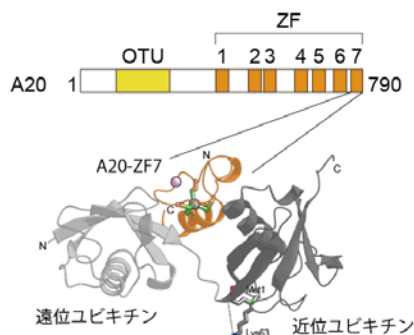


図 1 A20 は C 末端の ZF7 を介して直鎖状ユビキチンに特異的に結合する

A20 ZF7 は 8 種類のユビキチン間結合のうち、直鎖状ユビキチンに特異的に結合し、結合常数は 9 μ M 高い親和性を示した。そこで我々は、A20 ZF7 を 3 分子連結する分子プローブを作製したところ、ZF7 の 1 分子体よりもより高感度に直鎖状ユビキチンに結合することを明らかにした(図 2) (EMBO J, 2012)。

このように我々は、A20 ZF7 の 3 分子連結体という直鎖状ユビキチンに特異的で高感度検出が可能な新たな分子プローブを作出することに成功した。今後さらに細胞や固体レ

ベルで解析することで NF- κ B シグナルの解析やその不全によって引き起こされる多様な病態との関連を解明するために応用可能なツールになると考える。

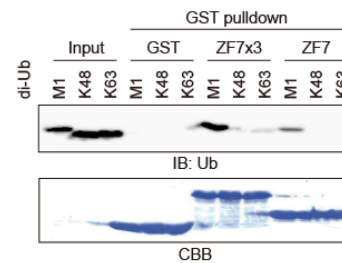


図 2 A20-ZF7 を 3 分子連結することで直鎖状ユビキチン結合性が増加する。

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 10 件)

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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 8 件)
1. 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
 2. 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
 3. 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
 4. 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: ベールを脱いだユビキチン系の新機能** 2012 年 12 月 16 日, 福岡
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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 2 件)
1. 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).

2. 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)

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
群馬大学 生体調節研究所 分子細胞制御分野ホームページ :
<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molcb/>

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