

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659136

研究課題名(和文) NF- κ B活性化を制御するユビキチンリガーゼ活性調節薬の開発

研究課題名(英文) Development of regulators of the LUBAC ubiquitin ligase that modulate NF-kappaB activation

研究代表者

岩井 一宏 (Iwai, Kazuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60252459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症、免疫応答、細胞の生存・増殖などに関与する転写因子であるNF- κ Bは種々の疾患で活性化異常が見出されており、その活性調節薬はそれら疾患の優れたターゲットである。申請者が見出したLUBACによる直鎖状ポリユビキチン鎖はNF- κ Bに選択性の高い新規の情報伝達系であるので、その活性調節法の開発を目指した。LUBAC活性を抑制する低分子化合物を見出し、同化合物が細胞内で直鎖状ポリユビキチン鎖形成、NF- κ B活性化を阻害することを見出した。またインターフェロン-gammaがLUBACの発現を増加させ、NF- κ B活性化を亢進させることも発見した。

研究成果の概要(英文)：NF-kappaB is a family of a transcription factor that involves in various biological phenomena including inflammation, immune responses, and cell survival. Abnormal activation NF-kappaB is also known to be related to the pathogenesis of various diseases. Thus, regulation of NF-kappaB is a suitable target of drugs for those diseases. Since we have identified LUBAC-mediated linear polyubiquitination is involved in NF-kappaB activation, we tried to develop the agents that up-regulate or inhibit LUBAC's ligase activity. We then identified a small chemical that inhibits LUBAC-mediated linear polyubiquitination and NF-kappaB activation. Also, we found that interferon-gamma increases the amount of LUBAC and enhances NF-kappaB activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系はエネルギー依存性タンパク質分解系の一部として同定された経緯もあり、「ユビキチン」=「分解」と考えられてきた。しかし、ユビキチン修飾系は分解以外にも、多様な様式でタンパク質を制御していることが明らかとなった。細胞内には多様なポリユビキチン鎖が存在し、ポリユビキチン鎖の種類によりタンパク質の制御様式が異なることが示されている。ユビキチン鎖はユビキチンのリジン残基を介して形成されると考えられてきたが、申請者は世界ではじめてユビキチンのN末端のメチオニンを介する直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に生成するLUBACリガーゼを同定した(EMBO J 2006)。さらに、LUBACがTNF- α 等の刺激依存的なNF- κ B活性化に関与することを見出し、直鎖状ポリユビキチン鎖がNF- κ B活性化に関わる新規情報伝達系であることを示してきた(Nature Cell Biol 2009)。LUBACはHOIL-1L、HOIP、SHARPINの3つのサブユニットから構成される複合型のユビキチンリガーゼである。慢性皮膚炎などの慢性炎症を呈する自然変異マウス cpdm はSHARPINの欠失している。cpdm マウスではSHARPINの欠失により、LUBACの他の2つのサブユニットも不安定化して、LUBACの量が減少して直鎖状ポリユビキチン鎖生成能が減弱するので、LUBACリガーゼの減少とSHARPINの消失の両者が皮膚炎などの症状の発症に関与することが示唆されている(図1)(Nature 2011)。

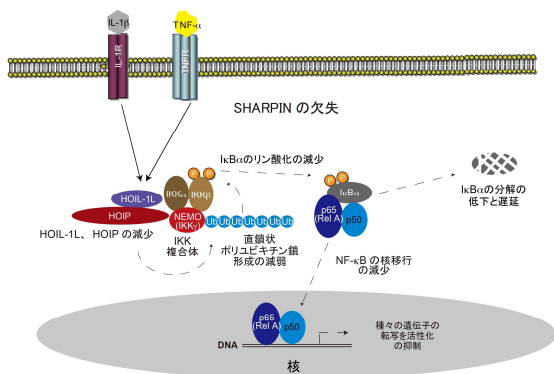


図1 cpdm マウスの症状発症機構

NF- κ Bは種々の刺激で活性化され、炎症、免疫応答、細胞の生存・増殖などに関与する転写因子である。種々の疾患で活性化異常が見出されているので、NF- κ B活性化機構に関しては多くの研究がなされてきた。しかし、直鎖状ポリユビキチン鎖はNF- κ B選択性の高い新規の情報伝達系であり、その阻害剤はすでに上市されている種々の薬剤とは作用点が異なると思われる。

2. 研究の目的

これまでの申請者らの解析はLUBAC活性を調節することで、NF- κ B活性の制御が可能であることを示している。そこで本研究では、

1. LUBACによる直鎖状ポリユビキチン鎖生成阻害化合物のスクリーニング

2. LUBAC発現誘導法の開発
の研究を進め、LUBAC活性の人為的制御方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1. LUBACによる直鎖状ポリユビキチン鎖生成阻害剤のスクリーニング

前述のように、選択的NF- κ B活性化阻害剤は種々の疾患治療薬の良いターゲットであると考えられている。LUBACによる直鎖状ポリユビキチン鎖生成は申請者らが新規に見出したNF- κ B活性化に選択性が高い制御系であり(Nature, 2011)、その制御薬は上市されている治療薬とは全く異なった作用機作を持つと考えられる。

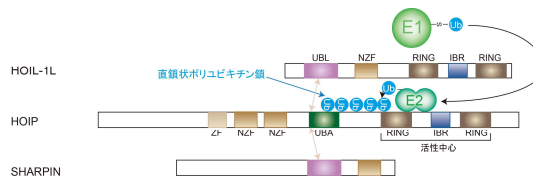


図2 LUBACによる選択的直鎖状ポリユビキチン鎖生成機構

図2にLUBACによる直鎖状ポリユビキチン鎖生成機構を図示する。E1、E2、E3(LUBAC)の複合酵素系の働きで直鎖状ポリユビキチン鎖が生成される。細胞内には多様なポリユビキチン鎖が存在するがLUBACは直鎖状ポリユビキチン鎖を特異的に生成するE3である。

現在、東京大学 創薬オープンイノベーションセンターと共同で樹立したin vitro直鎖状ポリユビキチン鎖生成系を用いたハイスループットスクリーニング系を使用して、候補低分子化合物のスクリーニングを行っている。そこで、ハイスループットスクリーニング系で得られた直鎖状ポリユビキチン鎖形成を阻害する候補化合物を選択する。その後、以下の二次スクリーニングを進め、最適な阻害化合物を見出す。

a) 本スクリーニング系ではE1、E2(UbcH5c)、E3(LUBAC)とユビキチンを混合しているため、ヒット化合物にはE1、E2の阻害化合物が含まれる可

能性がある。そこで、E1 と E2(UbcH5c) は、共通であるが LUBAC とは異なる E3 を用いる試験管内ユビキチン化アッセイで LUBAC を特異的に阻害する化合物を選択する。

上記アッセイで選択された化合物に対し、
b) TNF- α 等の刺激依存的な NF- κ B 活性化抑制効果

c) 刺激依存的な NEMO の直鎖状ポリユビキチン化の阻害活性を検索する。

2. LUBAC 発現誘導法の開発

申請者らは LUBAC の発現を増強させることで、TNF- α 等の刺激依存的な NF- κ B 活性化が亢進することを報告した(Nature 2011)。Pasparakis らにより、NEMO や IKK β 等の NF- κ B 活性化に必須な分子のケラチノサイト特異的 KO マウスは cpdm マウスの皮膚炎に類似の増殖性皮膚炎を呈することが報告されている(Nature 2002)。それゆえ、cpdm マウスで認められる皮膚炎などは NF- κ B 活性化の減弱によって生じる可能性があるため、LUBAC の発現亢進はそれら疾患の症状軽減効果が期待される。申請者らは LUBAC のサブユニットの中で、HOIL-1L と HOIP はインターフェロン- γ (INF- γ)によって発現が誘導されること、cpdm マウス由来胎児線維芽細胞を INF- γ 存在下で培養することにより、SHARPIN の欠損によって減弱していた TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化が増強することを見出した。そこで、INF- γ による LUBAC の発現亢進が cpdm マウスの皮膚炎を抑制するかを検索する。

- a) 正常および cpdm マウスのケラチノサイトの初代培養に INF- γ を添加し、HOIP、HOIL-1L の発現増強の有無、発現が増強した場合には TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化への影響を検索する。
- b) cpdm マウスに INF- γ を投与して皮膚炎の改善の有無を検索する。

4. 研究成果

1. LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖生成阻害剤のスクリーニング

- a) ハイスループットスクリーニングで得られた化合物を、E1 と E2(UbcH5c)は、共通であるが LUBAC とは異なる E3 を用いる試験管内ユビキチン化アッセイでスクリーニングしたところ、化合物 X が LUBAC を選択的に阻害する化合物として選択された。
- b) 化合物 X は TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化を抑制した。

c) 化合物 X は TNF- α 依存的な NEMO の直鎖状ポリユビキチン化を抑制した。

上記より、化合物 X は LUBAC に直鎖状ポリユビキチン鎖活性を阻害することで、NF- κ B 活性化を抑制することが明らかとなった(投稿準備中)。しかし、化合物 X は物理化学的性質の問題でリード化合物とはなり得ず、新たなハイスループットスクリーニング系を構築して、LUBAC 阻害剤のスクリーニングに再度チャレンジしている。

2. LUBAC 発現誘導法の開発

- a) 正常および cpdm マウスのケラチノサイトの初代培養に INF- γ を添加したところ、HOIP のみならず、HOIL-1L、SHARPIN (cpdm マウスの場合には HOIL-1L のみ)のタンパク量も増加し、TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化も増強した。
- b) cpdm マウス皮膚に INF- γ を投与したところ、皮膚でのケラチノサイトの HOIP の増加、TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化が観察された。そこで、cpdm マウス皮膚に INF- γ を 3 週間連続投与したところ、cpdm マウスの皮膚炎は完全には治癒しなかったが、改善した。

それゆえ、LUBAC の減少 SHARPIN の欠損による cpdm マウスでの皮膚炎の発症の少なくとも一因となっていることが明確となった。しかし、SHARPIN の欠損も皮膚炎発症には必須であることも見出されており、今後さらなる検討が必要である。

また、LUBAC を増加させることによって NF- κ B の活性化を増強することが出来るので、NF- κ B の活性低下が関与する疾患においては、LUBAC の発現誘導は有力な治療ターゲットであると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Tamiya H, Terao M, Takiuchi T, Nakahara M, Sasaki Y, Katayama I, Yoshikawa H, and Iwai K. IFN- γ or IFN- α ameliorates chronic proliferative dermatitis by inducing expression of linear ubiquitin chain assembly complex. **J. Immunol.** 192:3793-3804, 2014.

[学会発表](計 2 件)

1. Iwai, K. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B activation. The 38th FEBS congress symposium "Regulation of biological processes by ubiquitin and ubiquitin-like proteins in health and disease: proteolysis, autophagy and

apoptosis” July 7, 2013, St. Petersburg,
Russia (Invited)

2. Iwai, K. Linear polyubiquitination: a new
regulator of NF- κ B activation. The 35th
Naito Conference “The
Ubiquitin-Proteasome System: From Basic
Mechanisms to Pathophysiological Roles”
July 9-12, 2013 Sapporo, Japan (Invited)

〔図書〕(計0件)

〔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

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井 一宏 (IWAI Kazuhiro)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：6052459