

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790215

研究課題名(和文) TNF誘導性細胞死における直鎖状ポリユビキチン鎖の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of linear polyubiquitin chains in TNF-induced cell death

研究代表者

中原 匡咲(Nakahara, Masaki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60542967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：直鎖状ポリユビキチン鎖生成リガーゼ複合体LUBACはNF- κ B活性化において重要な役割を担っているが、そのアクセサリ分子であるSHARPINとHOIL-1Lの機能的な違いは分かっていない。本研究では、SHARPINのヌル突然変異マウスとHOIL-1Lノックアウトマウスが異なる表現型を示すことに注目し、これら二つのマウスから作成した細胞を用いて比較実験を行った。その結果、両者はNF- κ B活性化では同じ役割を担っているが、SHARPINのみがNF- κ B依存的な細胞死を抑制することがわかった。

研究成果の概要(英文)：SHARPIN and HOIL-1L function as accessory subunits of a linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC), which plays an important role in NF- κ B activation. However, there still remains to elucidate the functional difference between SHARPIN and HOIL-1L. Here we showed that SHARPIN deficiency sensitized mice and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) to tumor necrosis factor TNF- α -induced apoptosis more severely than HOIL-1L deficiency. In contrast, NF- κ B activation by TNF- α was slightly more impaired in HOIL-1 deficient MEFs than in Sharpin^{cpdm} MEFs. Overexpression of HOIL-1L restored NF- κ B activation in Sharpin^{cpdm} MEFs, but did not block TNF- α -induced apoptosis completely. These results suggest that SHARPIN, but not HOIL-1L, inhibits TNF- α -induced apoptosis in an NF- κ B-independent manner.

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：ユビキチン 細胞死 NF- κ B TNF- α アポトーシス

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

NF- κ B は免疫系において重要な役割を果たしている転写因子のひとつである。これまでの様々な研究から、NF- κ B の活性化にはユビキチンが関与していることが知られている。我々は、LUBAC と呼ばれるユビキチンリガーゼ複合体を同定し、この複合体が NF- κ B の活性化に重要であることを見出した。LUBAC は直鎖状ポリユビキチン鎖を生成するリガーゼ複合体で、3つのタンパク質より形成されていることがわかっている。すなわち、活性中心である HOIP とアクセサリー分子の HOIL-1L、SHARPIN である。興味深いことに、これらのノックアウトマウス(HOIP ノックアウトマウスおよび HOIL-1L ノックアウトマウス) または欠失変異体マウス [SHARPIN(cpdm)] はすべて異なる表現系を示す。HOIP ノックアウトマウスは胎生致死であり、SHARPIN(cpdm) マウスは生まれるが皮膚炎を含む慢性炎症となる。一方で、HOIL-1L ノックアウトマウスには明らかな異常は見られない。HOIP は活性中心であるので、そのノックアウトマウスが一番重篤な表現型を示すことは納得できる。しかしながら、2つのアクセサリータンパク質である SHARPIN と HOIL-1L のノックアウトマウスの表現型がここまで大きく異なることは予想外であった。と言うのも、LUBAC の主な役割であろう NF- κ B の活性化では、SHARPIN の欠失も HOIL-1L の欠失も大きな差は認められていなかったからである。それにも拘わらず大きな表現型の差が出たということは、NF- κ B 活性化以外で SHARPIN のみが果たしている役割があることを示唆している。そこで、当研究では SHARPIN(cpdm) マウスと HOIL-1L ノックアウトマウスおよびこれらから作成した細胞を様々な試薬で刺激し、その反応を比較することで新しい SHARPIN の機能を探索することにした。

2. 研究の目的

活性中心を欠損させた HOIP KO は一番重篤な表現型を示すが、アクセサリー分子の欠損でも明らかな表現型の違いが生じる。これらのことは、LUBAC 構成分子には機能的差異があることを示唆している。本研究では、アクセサリー分子である SHARPIN と HOIL-1L の役割の違いを明らかにすることを目的とした。これと同時に、SHARPIN(cpdm) マウスと HOIL-1L ノックアウトマウスの表現型を詳細に比較解析も行い、これまで表現型がないとされてきた HOIL-1L ノックアウトマウスが本当に炎症を起こしていないのか確認した。

3. 研究の方法

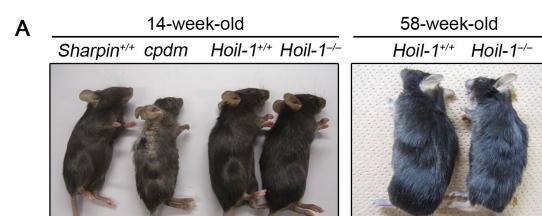
まず、HOIL-1L ノックアウトマウスに本当皮膚炎などの炎症が起きないのか確認することにした。サンプルとするマウスの週齢は、SHARPIN(cpdm) マウスではすでに重篤な慢性皮膚を呈する 3 か月齢と、十分に高齢な 14 か月齢を選んだ。これらの週齢の HOIL-1L ノックアウトマウスおよびコントロールとして同腹の野生型マウスを用意し、外見および各組織の HE 染色像から炎症の有無を判断した。

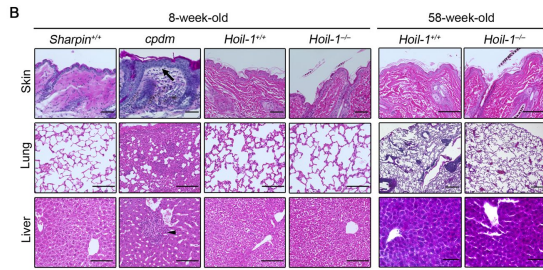
さらに、細胞刺激実験のために、各マウスから胎仔線維芽細胞(MEFs)を作成した。これまでの研究から HOIL-1L および SHARPIN はどちらも欠損すると刺激依存的な NF- κ B 活性化が減弱することがわかっている。細胞を TNF- α 、IL-1、LPS で刺激し、I- κ B のリン酸化および分解をウエスタンブロットで検出することで、NF- κ B の活性化を検討した。また、realtime PCR により NF- κ B の標的遺伝子の発現を測定した。

NF- κ B が十分に活性化しない場合、TNF- α は細胞にアポトーシスを誘導する。上記の細胞を様々な濃度の TNF- α で刺激し、細胞死の程度に差が出るか検討した。刺激した細胞を同仁堂の CCK-8(Cell counting kit-8)を用いて生細胞数を比較することで、細胞死の割合を定めた。また、セルライセートを SDS-PAGE で分離後、活性化 caspase-3 の抗体でウエスタンブロットを行い、細胞にアポトーシスが誘導されているか確認した。

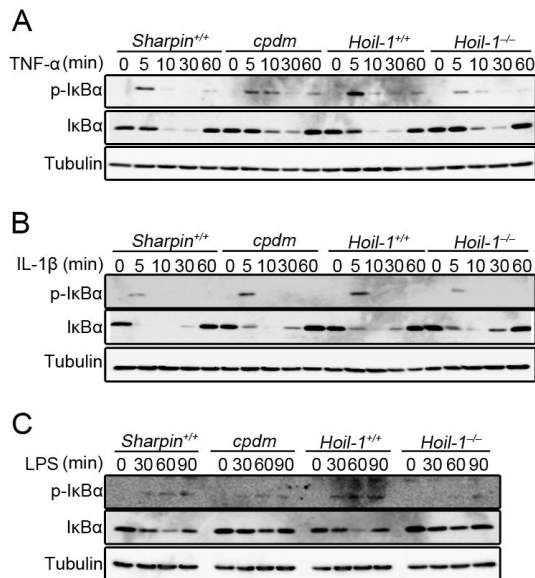
4. 研究成果

SHARPIN(cpdm) マウスは、若週齢で多臓器に炎症像が認められることがすでに報告がされている。若週齢の HOIL-1L ノックアウトマウスは健康であることが知られているが、高齢での解析は行われていない。そこで、HOIL-1L ノックアウトマウスを 15ヶ月齢まで生育させ組織観察を行った。その結果、HOIL-1L KO は高齢になっても炎症を起こさないことが明らかになった。(外見は A、HE 染色像は B。HOIL-1L ノックアウトマウスは 58 週齢でも皮膚炎を発症せず、各組織に炎症細胞の浸潤も見られない。)

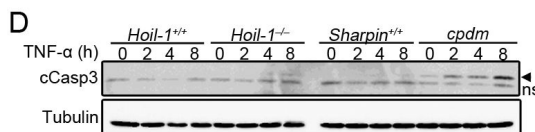




次に、MEFsをTNF- α (A)、IL-1 (B)、LPS(C)で刺激したが、HOIL-1L欠損MEFとSHARPIN欠損MEFはどちらもNF- κ Bの活性化は減弱したものの、両者に大きな差はなかった。



しかし、TNF- α 依存的なアポトーシスはSHARPIN欠損細胞で顕著に亢進していた(D)



TNF- α をマウスに投与してその生存を調べた結果も同様で、野生型やHOIL-1L KOに比べてSHARPIN欠損マウスは投与後非常に速やかに死亡した。実際に、SHARPIN(cpdm)マウスの炎症は、TNF α とのダブルノックアウトによって劇的に改善されるため、TNF α に対するアポトーシスの感受性の違いがSHARPIN欠損マウスとHOIL-1L欠損マウスの表現型の差につながると考えられた。

次に、SHARPINの欠損をHOIL-1Lの過剰発現で補うことができるか調べるために、SHARPIN(cpdm)MEFにHOIL-1Lを過剰発現させ、NF- κ Bの活性化とTNF- α 依存的なアポトーシスについて解析を行った。その結果、NF- κ Bの活性化はHOIL-1Lの過剰発現で回復したが、TNF- α 依存的なアポトーシスは防ぐことができなかった。以上の結果から、NF- κ Bの活性化においてSHARPINとHOIL-1Lは同じ役割を担っているが、TNF- α 依存的なアポトーシスはSHARPINが特異的に抑制していると考えられた。

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1件)

Sasaki Y, Sano S, Nakahara M, Murata S, Kometani K, Aiba Y, Sakamoto S, Watanabe Y, Tanaka K, Kurosaki T, Iwai K
Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells. *EMBO J*, (32), pp.2463, 2013, 査読有

[学会発表](計3件)

中原 匡哉, NF- κ B活性化および細胞死におけるSHARPINとHOIL-1Lの機能的役割の解明、第4回シグナルネットワーク研究会 2012年05月18日(兵庫県淡路島淡路夢舞台)

中原 匡哉,

直鎖状ポリユビキチン鎖生成リガーゼ構成分子であるSHARPINおよびHOIL-1LのTNF誘導細胞死における機能的役割の違い、科学研究費補助金新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」第1回班会議、2013年01月29日~2013年01月30日(千里ライフサイエンスセンター)

中原 匡哉, SHARPIN欠損変異マウスにおけるTNF 依存的な細胞死の亢進メカニズム、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日~2012年12月14日(福岡国際会議場・マリノメッセ)

[図書](計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 匡咲 (NAKAHARA, Masaki)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60542967

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：