

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253019

研究課題名(和文)直鎖状ポリユビキチン鎖生成リガーゼの機能とその異常による疾患発症機構

研究課題名(英文) Patho-physiological function of the ubiquitin ligase that generates linear ubiquitin chains (LUBAC)

研究代表者

岩井 一宏 (Iwai, Kazuhiro)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60252459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：直鎖状ユビキチン鎖と同鎖を選択的に生成するLUBACリガーゼは、NF- κ B活性化と細胞死抑制に関与する。LUBACは活性中心であるHOIPと補助サブユニットであるHOIL-1L、SHARPINの3サブユニットから構成される。本研究ではHOIL-1L、SHARPINに関しての解析を推進した。両サブユニットともにNZFドメインを持つが、SHARPINのそののみがK63鎖を認識できる。LUBACはTNF受容体等に結合するK63鎖を認識してリクルートされるので、SHARPINの欠損により受容体へのリクルートが減弱して細胞死が亢進し、SHARPIN欠損マウスでのみ慢性皮膚炎等を呈することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Linear ubiquitin chains and the LUBAC ubiquitin ligase that specifically generate linear chains are involved in NF- κ B activation and cell death suppression. LUBAC is composed of catalytic HOIP and accessory SHARPIN and HOIL-1L subunits. In this research project, we analyzed functional difference between SHARPIN and HOIL-1L. Although both subunits have NZF domains that can bind to ubiquitin, SHARPIN NZF but not that of HOIL-1L can bind to K63-linked chains. Since LUBAC can be recruited to the activated receptor complex by recognizing K63 chains, loss of SHARPIN attenuated the recruitment of LUBAC to the receptor complex. Then loss of SHARPIN augmented cell death, which leads to the chronic dermatitis that specifically observed in SHARPIN null mice.

研究分野：生体分子医学

キーワード：ユビキチン 慢性炎症 NF- κ B 細胞死

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発見された経緯もあり、「ユビキチン」=「分解」として研究が進んできた。しかし近年では、分解以外にも多彩な様式でタンパク質の機能を制御する可逆的な翻訳後修飾系であることが明確となっている。細胞内には多様なユビキチン鎖が存在し、ユビキチン鎖の種類によってタンパク質の制御様式が異なる。研究代表者は直鎖状ポリユビキチン鎖(M1鎖)と同ユビキチン鎖を選択的に生成するLUBACユビキチンリガーゼを発見した。LUBACユビキチンリガーゼは、活性中心であるHOIPと補助サブユニットであるHOIL-1L、SHARPINの3サブユニットから構成され、NF- κ Bの活性化に参与する。補助サブユニットであるHOIL-1L、SHARPINのいずれかの欠損によりLUBACの他の2サブユニットが不安定化することでNF- κ Bの活性化が減弱するが、SHARPINが欠損した場合のみ多彩な症状を呈することが報告されている。

2. 研究の目的

従来の報告を鑑みれば、LUBACの2つのアクセサリサブユニット、HOIL-1LとSHARPINはLUBAC複合体の安定化以外にもそれぞれのサブユニット特有の機能を有していると想定される。そこで本研究では、SHARPINを欠損しているcpdmマウスの症状を指標にしつつ、2つのLUBACの補助サブユニットの生理的・病理的役割を明確にするとともに、それぞれのサブユニットがLUBAC複合体の安定化に果たす役割も解析した。

3. 研究の方法

a) 研究代表者らはHOIPのコンディショナルノックアウトマウス、HOIL-1Lノックアウトマウス、SHARPINの自然変異マウスであるcpdmマウスを開発、導入しており、それらのマウスを用いて、LUBAC、直鎖状ユビキチン鎖の生理学的、病理学的役割を解析した。

b) LUBACを構成するHOIP、HOIL-1L、SHARPINには多様なドメインが存在している。それらのドメインの役割を解析するために、それらのドメインの欠失、活性喪失変異体を作製し、LUBACサブユニット欠失細胞などに導入し、それらの機能解析を推進した。

4. 研究成果

1. cpdmマウスの自己炎症性様疾患発症におけるSHARPINとHOIL-1Lの役割

a) HOIL-1L、SHARPINの存在と症状との関連

LUBACの直鎖状ユビキチン鎖生成活性はHOIPが有しており、HOIPの活性欠失体を発現する遺伝子改変マウスは胎生11.5日までに死亡するので、直鎖状ユビキチン鎖生成活性はマウス個体の発生に不可欠である。SHARPINあるいはHOIL-1Lのいずれかの欠損ではLUBACの量は著減するが完全には消失しない。しかしながら、SHARPINを欠損したcpdmマウスのみが症状を呈する。そこで、まずHOIL-1LとSHARPINの存在量と症状の関連について検討した。HOIL-1Lノックアウト(KO)マウスとcpdmマウスを交配し、HOIL-1L KOにcpdmの変異(欠損)SHARPIN遺伝子座を1つ有するマウスと、cpdmマウスにHOIL-1L変異(欠損)遺伝子座を1つ有するマウスを作製した。その結果、cpdmマウスでHOIL-1Lの発現量を半減した場合には慢性炎症症状は増強したが、HOIL-1L KOマウスでSHARPINの発現量を半減した場合には顕著な症状は発現しなかったため、SHARPINの欠損が慢性炎症の発症に不可欠であり、病型を決定づける要因であると考えられた。

b) LUBACリガーゼ複合体量を介したHOIL-1L、SHARPINの自己炎症性疾患発症への寄与

cpdmマウスにHOIL-1L欠損遺伝子座を2つ導入、すなわちSHARPINもHOIL-1Lも欠損したマウスはリガーゼ活性欠損HOIP発現マウスと同じく胎生11.5日までに死亡した。2つの補助サブユニットの両者が欠損した細胞ではHOIPは存在できないので、補助サブユニットの量

が細胞内のLUBACの直鎖状ユビキチン鎖生成の総活性を決定する要素である。

前述の様にcpdmマウスでHOIL-1Lの量を半減した場合には自己炎症性疾患様症状は増強する。HOIPの量もHOIL-1Lの量に呼応して減少する。一方、研究代表者らはインターフェロン(タイプI、タイプIIいずれも)がHOIL-1L、HOIPの発現量を増加することを見出していたので、インターフェロンをcpdmマウスに皮下注射してケラチノサイトのHOIL-1L、HOIP量を増加させたところ、cpdmマウスの代表的な自己炎症性疾患様症状の慢性皮膚炎が改善することを見出した。それゆえ、LUBACのリガーゼ活性量がcpdmマウスの症状の強度を決定する要因であると考えられた。

c) SHARPINの欠損によって自己炎症性疾患様症状を呈する分子メカニズムの解析

HOIL-1L KOマウスは無症状であるが、SHARPINを欠損したcpdmマウスは慢性皮膚炎等を発症する。そこで、SHARPIN欠損によって慢性皮膚炎などの自己炎症症状を呈する分子メカニズムを検討した。LUBACによる直鎖状ユビキチン鎖生成はNF- κ B活性化に加え、細胞死抑制にも寄与している。cpdmマウスではケラチノサイトの細胞死亢進と慢性皮膚炎との関連が示唆されているが、SHARPIN欠損細胞の方がHOIL-1L欠損細胞よりも細胞死が亢進していた。図1にLUBACサブユニットのドメイン構造を示す。

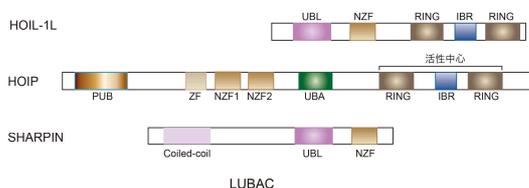


図1. LUBACサブユニットのドメイン構造

HOIL-1LとSHARPINいずれもユビキチン結合ドメインであるNZFドメインを持つが、ドメイン欠損、入換え実験の結果、SHARPINのNZFドメインのみが刺激依存的な細胞死の抑制に関与

する。両NZFドメインのユビキチン鎖特異性を検索したところ、SHARPINのNZFドメインのみがリシン63を介して形成されるK63ユビキチン鎖を認識できる。LUBACは他のユビキチンリガーゼによってTNF受容体等に結合するK63鎖を認識してリクルートされるので、SHARPINの欠損によりLUBACの活性化された受容体へのリクルートが減弱して細胞死が亢進し、その結果、cpdmマウスでのみ症状を呈することが明らかになった。

2 .LUBACによるNF- κ B活性化の分子メカニズムの解析

代表者らはLUBACの直鎖状ユビキチン鎖生成能はNF- κ B活性化に必要であることを見出してきたが、その分子メカニズムは不明であった。LUBACの変異体などを用いてその分子メカニズムの解明を進め、LUBACはHOIPのNZFドメインでIKK複合体の活性調節サブユニットであるNEMOを認識して直鎖状ユビキチン化してIKK複合体を活性化する。その結果、I κ B α がリン酸化依存的に分解され、I κ B α から遊離したNF- κ Bが核に移行して活性化されることを示した(図2)。

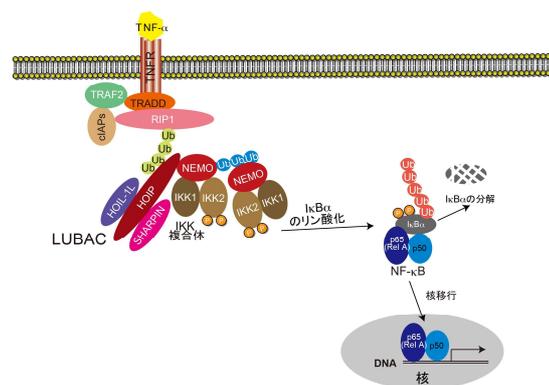


図2. NF- κ B活性化機構

3 .LUBACユビキチンリガーゼ複合体の安定化機構

LUBACはHOIL-1L、HOIP、SHARPINの3サブユニットで安定に存在するが、安定化の分子機構

は明確ではない。また、LUBACの量が減少すれば、ある種のB細胞リンパ腫の増殖が抑制出来ることを示しているので、複合体の形成を阻害出来れば、B細胞リンパ腫の治療薬になり得る。これまでHOIPのUBA領域とHOIL-1L、SHARPINのUBLドメインが結合することでLUBACが安定化することが示唆されてきたが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。代表者らはLUBACのサブユニットの変異体解析を行い、HOIL-1L、SHARPIN同志の結合も安定化に關与することを示した。

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14件)

- MacDuff, D. A., Reese, T. A., Kimmey, J. M., Weiss, L. A., Song, C., Zhang, X., Kambal, A., Duan, E., Carrero, J. A., Boisson, B., Laplantine, E., Israel, A., Picard, C., Colonna, M., Edelson, B. T., Sibley, L. D., Stallings, C. L., Casanova, J. L., Iwai, K., and Virgin, H. W. (2015) Phenotypic complementation of genetic immunodeficiency by chronic herpesvirus infection. *eLife* 4:e04494. doi: 10.7554/eLife.04494, 2015.
- Sasaki, K. and Iwai, K. Roles of linear ubiquitinylation, a crucial regulator of NF- κ B and cell death, in the immune system. (2015) *Immunol. Rev.* 266, 175-189, 2015. doi: 10.1111/imr.12308.
- Morimoto, D., Walinda, E., Fukada, H., Sou, Y. S., Kageyama, S., Hoshino, M., Fujii, T., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Iwai, K., Namba, K., Komatsu, M., Tanaka, K., Shirakawa, M. The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. (2015) *Nat. Commun.* 6, 6116. doi: 10.1038/ncomms7116
- Sakamoto, H., Egashira, S., Saito, N., Kirisako, T., Miller, S., Sasaki, Y., Matsumoto, T., Shimonishi, M., Komatsu, T., Terai, T., Ueno, T., Hanaoka, K., Kojima, H., Okabe, T., Wakatsuki, S., Iwai, K. (corresponding author), and Nagano, T. (2015) Gliotoxin suppresses NF- κ B activation by selectively inhibiting linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). *ACS Chem. Biol.* 10, 675-681. doi: 10.1021/cb500653y.
- Iwai, K. and Tanaka, K. (2014) Ubiquitin chain elongation: An intriguing strategy. *Molecular Cell* 56, 189-191. doi: 10.1016/j.molcel.2014.10.009.
- Queisser, M. A., Dada, L. A., Deiss-Yehiely, N., Angulo, M., Zhou, G., Kouri, F. M., Knab, L. M., Liu, J., Stegh, A. H., DeCamp, M. M., Budinger, G. R., Chandel, N. S., Ciechanover, A., Iwai, K., and *Sznajder, J. I. (2014) HOIL-1L Functions as the PKC ζ Ubiquitin Ligase to Promote Lung Tumor Growth. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 688-698. doi: 10.1164/rccm.201403-0463OC.
- Iwai, K. Fujita, H., and Sasaki, Y. (2014) Linear ubiquitin chains: NF- κ B signalling, cell death, and beyond. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 503-508. doi: 10.1038/nrm3836.
- Rodgers, M. A., Bowman, J., Fujita, H., Orazio, N., Shi, M., Liang, Q., Amatya, R., Kelly, T. J., Iwai, K., Ting, J., and *Jung, J. U. (2014) The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J. Exp. Med.* 211, 1333-1347. doi:10.1084/jem.20132486.
- Tamiya, H., Terao, M., Takiuchi, T., Nakahara, M., Sasaki, Y., Katayama, I., Yoshikawa, H., and *Iwai, K. (2014) IFN- γ or IFN- α ameliorates chronic proliferative dermatitis by inducing expression of linear ubiquitin chain assembly complex. *J. Immunol.* 192, 3793-3804. doi: 10.4049/jimmunol.1302308.
- Yang, Y., Schmitz, R., Mitala, J. J. Jr., Whiting, A., Xiao, W., Ceribelli, M., Wright, G. W., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Rosenwald, A., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Braziel, R. M., Tubbs, R. R., Cook, J. R., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., Wiestner, A., Kruhlak, M. J., Iwai, K., Bernal, F. and Staudt, L. M. (2014) Essential role of the linear ubiquitin chain assembly complex in lymphoma revealed by rare germline polymorphisms. *Cancer Discov.* 4, 480-493 doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0915
- Fujita, H., Rahighi, S., Akita, M., Kato, R., Sasaki, Y., Wakatsuki, S. and Iwai, K. (2014) Mechanism underlying IKK activation mediated by the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). *Mol. Cell Biol.* 34, 1322-1335. doi: 10.1128/MCB.01538-13
- Takiuchi, T., Nakagawa, T., Tamiya, H., Fujita, H., Sasaki, Y., Saeki, Y., Takeda, H., Sawasaki, T., Buchberger, A., Kimura, T. and Iwai, K. (2014) Suppression of LUBAC-mediated linear ubiquitination by a specific interaction between LUBAC and the deubiquitinases CYLD and OTULIN. *Genes Cells.* 19, 254-272. doi: 10.1111/gtc.12128
- Sasaki, Y., Sano, S., Nakahara, M., Murata, S., Kometani, K., Aiba, Y., Sakamoto, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Kurosaki, K., and Iwai, K. (2013) Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells. *EMBO J.* 32, 2463-2476. doi: 10.1038/emboj.2013.184.
- Blackwell, K., Zhang, L., Workman, L.M., Ting, A.T., Iwai, K., Habelhah, H. (2013) Two coordinated mechanisms underlie TNF α -induced immediate and delayed IKK activation. *Mol. Cell Biol.* 33, 1901-1915. doi: 10.1128/MCB.01416-12.

[学会発表](計17件)

- Iwai, K. Patho-physiological functions of a

- new type of ubiquitin modification, linear ubiquitination. Invited Lecture, National Cancer Institute, October 14, 2015, Frederick, MD, USA.
2. Iwai, K. Patho-physiological functions of a new type of ubiquitin modification, linear ubiquitination. LLS Lecture, Northwestern University, Feinberg School of Medicine. October 13, 2015, Chicago, IL, USA.
 3. Iwai, K. Patho-physiological functions of a new type of ubiquitin modification, linear ubiquitination. Invited Lecture, Sanford-Burham Medical Discovery Institute, October 12, 2015, La Jolla, California, USA.
 4. Shimizu, S., Fujita, H., Sasaki, Y., and Iwai, K. Differential involvement of subunits of LUBAC ubiquitin ligase in signalling and cell death. EMBO Conference “Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers: From molecular mechanisms to human diseases” HOTEL CROATIA CAVTAT, September 18-22, 2015, Cavtat, Croatia (Oral presentation).
 5. Iwai, K. Linear ubiquitin chains: NF- κ B activation, cell death, and cancer. International Symposium on Ubiquitin and Diseases. June 14-19, 2015, Dacheng Hotel, Zhangjiajie, China (Invited).
 6. Iwai, K. Linear ubiquitin chains: a new regulator of NF- κ B activation and cell death signaling. 1st SPS International Symposium Xiamen University, June 13, 2015, Xiamen, China (Invited).
 7. Sakamoto, H., Egashira, S., Okabe, T., Nagano, T., and Iwai, K. Inhibition of LUBAC-mediated linear ubiquitination by a virulence factor of *Aspergillus*, gliotoxin. Cold Spring Harbor Laboratory meeting “The Ubiquitin Family”, April, 21-25, 2015, Cold Spring Harbor, NY, USA (Oral presentation).
 8. Iwai, K. Phenotypical difference between mice lacking subunits of LUBAC ubiquitin ligase. 1st International Symposium for New Aspects of the Ubiquitin Research November 10, 2014 Kyoto, Japan (invited).
 9. Tamiya, H. and Iwai, K. Induction of expression of linear ubiquitin chain generating LUBAC ligase and amelioration of dermatitis in cpdm mice by interferons. The EMBO conference “Ubiquitin & ubiquitin-like proteins: At the crossroads from chromatin to protein” October 19-24, 2014 Buenos Aires, Argentina (Oral presentation).
 10. Iwai, K. Linear ubiquitination: NF- κ B signalling, cell death and beyond. August 22, 2014 Invited research seminar. the Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research, University of Copenhagen, Denmark.
 11. Iwai, K. Linear ubiquitination : a new regulator of NF- κ B and cell death signaling. 2014 International Conference on Protein Metabolism & Diseases July 9-11, 2014 Yangyang, Korea (invited).
 12. Iwai, K. Mechanism underlying linear ubiquitin-mediated NF- κ B activation. Benzon Symposium Nuclear regulation by ubiquitin August 18-21, 2014 Copenhagen, Denmark (Oral presentation).
 13. Fujita, H., Takiuchi, T., and Iwai, K. Molecular mechanism and regulation of linear chain-mediated NF- κ B activation. Cold Spring Harbor Asia Conference “Protein Modifications & Homeostasis” June 16-20, 2014, Suzhou, China (Invited).
 14. Iwai, K. Linear Polyubiquitination: a Crucial Regulator of NF- κ B Activation. THE UEHARA MEMORIAL FOUNDATION SYMPOSIUM 2014, Innovative Medicine : Basic Research and Development. June 14-17, 2014, Tokyo, Japan (Invited).
 15. Sasaki, Y., Fujita, H., and Iwai, K. Differential requirement of LUBAC-mediated linear polyubiquitination in CD40- or BCR-mediated canonical NF- κ B activation in B cells. The EMBO Conference “Ubiquitin and Ubiquitin-like Proteins: From structure to function” October 1-5, 2013 Riva del Garda, Italy.
 16. 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)
 17. 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)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 3 件)
- 名称 : 新規なユビキチンリガーゼおよびその利用
 発明者 : 岩井 一宏
 権利者 : 京都大学
 種類 : 特許
 番号 : 特許 5234865 号
 登録年月日 : 平成 25 年 4 月 5 日登録 平成 27 年 6 月 25 日 京都大学移管
 国内外の別 : 日本

名称：UBIQUITIN LIGASE AND USE THEREOF
発明者：岩井 一宏
権利者：京都大学
種類：特許
番号：8,56,094 B2
登録年月日：平成 25 年 10 月 1 日登録 平成
27 年 8 月 12 日 京都大学移管
国内外の別：米国

名称：UBIQUITIN LIGASE HAVING LINEAR
POLYUBIQUITINATIONACTIVITY AND USE
THEREOF
発明者：岩井 一宏
権利者：京都大学
種類：特許
番号：217972
登録年月日：平成 27 年 12 月 25 日
国内外の別：イスラエル

〔その他〕

研究室ホームページ：
<http://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： 6 0 2 5 2 4 5 9

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

()