

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460573

研究課題名(和文) B細胞の活性化、細胞死抑制における直鎖状ポリユビキチン鎖の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of LUBAC in the inhibition of cell death and the activation in B cells.

研究代表者

佐々木 義輝 (Sasaki, Yoshiteru)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80323004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：直鎖状ポリユビキチン鎖は、ユビキチンリガーゼ複合体LUBACによって選択的に生成される。本研究課題では、直鎖状ポリユビキチン鎖がTLR4刺激による細胞死を抑制するメカニズムについて解析を行った。その結果、LPS刺激によるLUBAC欠損B細胞の細胞死はTRIFを介して生じていることを明らかにした。加えて、RIP3を欠損させてもLPS刺激による細胞死はほとんど抑制されないが、そこにCaspaseの阻害剤を加える事によってLPS刺激による細胞死が強く抑制出来た事から、LUBACがTLR4刺激によって誘導されるCaspaseを介したアポトーシスを抑制する機能を持つことも証明した。

研究成果の概要(英文)：Linear polyubiquitin chains are generated specifically by the ubiquitin ligase complex LUBAC. LUBAC is composed of one catalytic subunit, HOIP and two accessory subunits, HOIL-1L and SHARPIN. In this study I analyzed the role of LUBAC in TLR4-mediated cell death of B cells lacking LUBAC activity. I found that among two signal transducers downstream of TLR4, MyD88 and TRIF TRIF is responsible for this cell death because ablation of TRIF prevented TLR4-induced cell death of HOIP deficient B cells. I also discovered that deletion of RIP3, a critical regulator of necroptosis alone did not inhibit TLR4-induced cell death but the inhibition of Caspase-8 together with RIP3 deletion restored LPS-induced survival and cell proliferation of HOIP deficient B cells. These data show that LUBAC plays critical roles in the inhibition of Caspase-mediated apoptosis induced by TLR4 stimulation.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 ユビキチン 細胞死 B細胞 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タンパク質の翻訳後修飾系の一つである。ユビキチンは E1 (活性化酵素)、E2 (結合酵素)、E3 (ユビキチンリガーゼ) の3種の酵素の働きによって、E3 が認識する標的タンパク質に、ポリユビキチン鎖が付加される。ポリユビキチン鎖はユビキチンの7個のリジン残基のいずれかを介して形成され、結合様式の違いによって異なる機能を発揮する。所属研究室で発見された新規ユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC (linear ubiquitin assembly complex) は、ユビキチンの N 末端と C 末端を結合させることで直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に生成する。LUBAC は活性中心を担う HOIP と2つのアクセサリー分子 HOIL-1L、SHARPIN から構成される複合体であり、TNF 刺激依存的な古典的 NF- κ B 経路の活性化に参与することが明らかとなっていた。研究代表者は、B 細胞特異的に HOIP の活性中心を欠損するマウスを作製し解析を行い、以下の6点を明らかにしていた。

直鎖状ポリユビキチン鎖は成熟 B リンパ球のうち B1 細胞の発生に必須であるが B2 細胞、MZ B 細胞の分化には関与しない。

T 細胞依存性抗原および II 型 T 細胞非依存性抗原に対する抗体反応の両方に必要である。

TNFR スーパーファミリーに属する受容体 CD40 や TACI の下流において古典的 NF- κ B 経路のみならず、ERK の活性化にも重要な役割を果たす。

LUBAC は IKK 複合体依存的に Tpl-2 を活性化することで ERK の活性化を制御する。

BCR からのシグナルには関与しない。

Toll 様受容体 (TLR) 依存的な古典的 NF- κ B 経路と ERK の活性化に参与するが、TLR4 と TLR9 では古典的 NF- κ B 経路活性化への関与の程度が異なる。

これらの結果から、CD40 下流における LUBAC の機能として次のようなモデルを提唱した。すなわち、CD40 刺激によって LUBAC は IKK 複合体の構成分子 NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加する。NEMO の UBAN ドメインは直鎖状ポリユビキチンと高い親和性を持つことから、同ドメインを介して別の IKK 複合体がリクルートされ複数の IKK 複合体が空間的に近接することで trans-autophosphorylation が起こり IKK 複合体は活性化される。活性化した IKK 複合体は I κ B α をリン酸化することで古典的 NF- κ B 経路を、p105/NF- κ B1 をリ

ン酸化して ERK 経路を活性化するというモデルである。

しかし、LUBAC 欠損 B 細胞を TLR9 刺激した場合には ERK の活性化は強く減弱するが古典的 NF- κ B の活性化の抑制は非常に軽度である。このことから LUBAC による ERK の活性化には、NEMO の直鎖状ユビキチン化依存的な IKK 活性化に加えて、LUBAC によって直鎖状ポリユビキチン化される NEMO 以外のタンパク質、もしくは NEMO 以外の直鎖状ポリユビキチン鎖結合活性を持つタンパク質が関与する可能性が考えられた。また、研究代表者は LUBAC 欠損 B 細胞を TLR4 刺激すると、野生型 B 細胞と異なり細胞死が強く誘導されることを発見したことから、直鎖状ポリユビキチン鎖には TLR4 の下流において細胞死を抑制する機能があることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

上述のように、TLR 刺激による ERK 活性化の際には NEMO 以外の LUBAC によって直鎖状ポリユビキチン鎖されるタンパク質や NEMO 以外の直鎖状ポリユビキチン鎖結合タンパク質が機能している可能性が考えられた。また、TLR4 依存的な細胞死を抑制することを発見していたことから、本研究課題では、LUBAC の標的タンパク質及び直鎖状ポリユビキチン鎖結合タンパク質の同定とその解析を通して LUBAC による ERK 活性化の機構及び TLR4 下流における細胞死の抑制機構について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 直鎖状ポリユビキチン鎖の CD40、TLR 刺激による ERK 活性化における機能を明らかにするために、TLR 刺激による ERK 活性化に必要な LUBAC 標的タンパク質および直鎖状ポリユビキチン鎖結合タンパク質の同定を試み、その機能を解析した。

2. TLR4 下流における LUBAC による細胞死抑制機構を解析するために LPS 刺激によって誘導される LUBAC 欠損 B 細胞の細胞死に MyD88、TRIF どちらの経路が関与しているか検討した。さらに LUBAC 欠損 B 細胞の細胞死にアポトーシス、ネクロプトーシスいずれの系が関わっているかを、それぞれのエフェクタータンパク質の活性化状態や遺伝子欠損や阻害剤処理によってエフェクタータンパク質の機能を抑制した場合の細胞死に与える影響を調べる事によって、直鎖状ポリユビキチン鎖の細胞死制御における機能を解析した。

4. 研究成果

1.直鎖状ポリユビキチン鎖の CD40、TLR 刺激による ERK 活性化における機能解析
LUBAC は CD40、TLR 刺激による ERK の活性化に参与しているが、そのメカニズムの一つは IKK 複合体の構成分子 NEMO の直鎖状ポリユビキチン化による IKK 複合体の活性化である。しかし、LUBAC を介した ERK 活性化には NEMO 以外の LUBAC によって直鎖状ポリユビキチン鎖されるタンパク質や NEMO 以外の直鎖状ポリユビキチン鎖結合タンパク質が機能している可能性が考えられた事から、LUBAC を介した ERK 活性化機構について解析を行った。CD40、TLR 刺激による ERK の活性化には、直鎖状ポリユビキチン結合ドメイン UBAN を持つ分子 ABIN2 が参与している事が知られていたため、先ず初めに ABIN2 の直鎖状ポリユビキチン結合能が CD40、TLR 刺激による ERK の活性化に必要であるかどうか検討を行った。TLR 刺激によって ERK の活性化が強く誘導される細胞株をスクリーニングした結果、マウスマクロファージ細胞株である Raw264 細胞では TLR 刺激によって ERK が活性化される事が分かったので、Raw264 細胞において ABIN2 を欠損する細胞を CRISPR/Cas9 の系を用いて樹立した。この ABIN2 欠損 Raw264 細胞を LPS 刺激したところ、非常に驚いたことに ERK の活性化が正常に認められた。この事は、ある種の細胞株によっては他の ABIN ファミリー分子が ABIN2 の機能を担っている可能性が考えられた。そこで、この可能性を検討するために ABIN ファミリー分子の一つ ABIN1 を欠損する Raw264 細胞を樹立し実験を行った。ABIN1 欠損 Raw264 細胞に於いても LPS 刺激による ERK の活性化は正常に認められたことから ABIN1 が ERK 活性化の機能を担っている可能性は低いと考えられた。しかし、ABIN1、ABIN2 が相補的に機能している可能性が考えられる事から、今後、ABIN1、ABIN2 両方欠損する細胞を樹立して実験を行う必要があると考えられる。

2. TLR4 下流における LUBAC による細胞死抑制機構の解析

野生型 B 細胞では LPS 刺激によって生存が亢進するが、HOIP 欠損 B 細胞は LPS 刺激によって細胞死が誘導される。LPS の受容体 TLR4 は MyD88、TRIF という 2 つのアダプター分子を介してシグナルを伝達するが、HOIP 欠損 B 細胞の LPS 刺激による細胞死は TRIF を欠損させる事で抑制出来る

事からこの細胞死は TRIF を介して生じていることを明らかにした。次に、TRIF 下流で誘導される細胞死のメカニズムについて解析を行い、LUBAC 欠損 B 細胞を LPS で刺激した場合、アポトーシス誘導に関わるシステインプロテアーゼ Caspase-8 と Caspase-3 が活性化する事、これらの Caspase の活性化も TRIF を欠損させる事で抑制出来る事を発見した。この結果から、LUBAC 欠損 B 細胞では LPS 刺激によって Caspase を介したアポトーシスが誘導される可能性が考えられた。そこで、実際にこの細胞死に Caspase が関与しているかについて解析を行った。但し、Caspase を抑制した場合、別のプログラム細胞死であるネクロトーシスが誘導されることが知られていたため、ネクロトーシスを抑制するために LUBAC 欠損 B 細胞においてネクロトーシスに必須の分子 RIP3 を欠損させて実験を行った。LUBAC/RIP3 ダブル欠損 B 細胞では LPS 刺激による細胞死が LUBAC 単独欠損 B 細胞と同様に起こったことから、LPS 刺激による LUBAC 欠損 B 細胞の細胞死はネクロトーシスが主な細胞死ではない事が分かった。しかし、LUBAC/RIP3 ダブル欠損 B 細胞にさらに Caspase の阻害剤 Z-VAD-FMK を加える事によって LPS 刺激による細胞死は強く抑制された事から、LUBAC 欠損 B 細胞の細胞死は Caspase を介したアポトーシスが主たる経路である事を明らかにした。加えて、*in vivo* においても LUBAC が TLR を介した B 細胞の反応に機能しているかどうかについて B 細胞特異的に LUBAC を欠損したマウスにおける I 型 T 細胞非依存性抗原 NP-LPS に対する抗体反応を調べる事で検討した。その結果、このマウスに於いては NP-LPS に対する抗体反応が強く障害されていた事から、*in vivo* においても TLR4 を介した B 細胞の反応に LUBAC が重要な機能を持つ事も証明した。

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 11 件)

1. Okamura, K., Kitamura, A., Sasaki, Y., Chung, DH., Kagami, S., Iwai, K., Yasutomo, K. Survival of mature T cells depends on signaling through HOIP. **Scientific Reports** 6, 36135 (2016).

2. Shimizu, S., Fujita, H., Sasaki, Y., Tsuruyama, T., Fukuda, K. and Iwai, K. Differential involvement of the NZF domains of SHARPIN and HOIL-1L in LUBAC-mediated cell death protection. **Mol. Cell. Biol.** 36, 1569-1583 (2016).
3. Sasaki, Y. and Iwai, K. Roles of the NF- κ B pathway in B-lymphocyte biology. **Current Topics in Microbiology and Immunology: B cell Receptor Signaling** 393, 177-209 (2016).
4. Takeuchi, A., Badr Mel, S., Miyauchi, K., Ishihara, C., Onishi, R., Guo, Z., Sasaki, Y., Ike, H., Takumi, A., Tsuji, NM., Murakami, Y., Katakai, T., Kubo, M. and Saito, T. CRTAM determines the CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte lineage. **J. Exp. Med.** 213, 123-138 (2016).
5. Akilli Öztürk, Ö., Pakula, H., Chmielowiec, J., Qi, J., Stein, S., Lan, L., Sasaki, Y., Rajewsky, K. and Birchmeier, W. Gab1 and Mapk Signaling Are Essential in the Hair Cycle and Hair Follicle Stem Cell Quiescence. **Cell Reports** 13, 561-572 (2015).
6. Zhang, B., Calado, DP., Wang, Z., Frohler, S., Kochert, K., Qian, Y., Koralov, S., Schmidt-Supprian, M., Sasaki, Y., Unitt, C., Rodig, S., Chen, W., Dalla-Favera, R., Alt, FW., Pasqualucci, L. and Rajewsky, K. A Key Oncogenic Role for Alternative NF- κ B Signaling in DLBCL, Revealed Upon Interference With Terminal B cell Differentiation. **Cell Reports** 11, 715-726 (2015).
7. 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., Nagano, T. Gliotoxin suppresses NF- κ B activation by selectively inhibiting linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). **ACS Chemical Biology** 10, 675-681 (2015).
8. Sasaki, Y., Fujita, H., Nakai, M., and Iwai, K. Immunoblot Analysis of Linear Polyubiquitination of NEMO. **Methods in Molecular Biology, NF- κ B: Methods and Protocols** 1280, 297-309 (2015).
9. Iwai, K., Fujita, H. and Sasaki, Y. Linear ubiquitin chains: NF- κ B signaling, cell death and beyond. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 15, 503-508 (2014).
10. 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 (cpdm) by Inducing Expression of Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC). **J. Immunol.** 192, 3793-3804 (2014).
11. Fujita, H., Rahighi, S., Akita, M., Kato, K., Sasaki, Y., Wakatsuki, S., and Iwai, K. Mechanism underlying IKK activation mediated by the linear ubiquitin assembly complex (LUBAC). **Mol. Cell. Biol.** 34, 1322-1335 (2014).
- 〔学会発表〕(計4件)
1. 佐々木義輝, 岩井一宏 「Toll様受容体(TLR)刺激によるBリンパ球活性化における直鎖状ポリユビキチン鎖の役割」第87回日本生化学会大会 シンポジウム ユビキチン・ワールド：分子の鎖が織りなす多彩な生命機能、京都、2014年
2. 佐々木義輝, Necroptosis-mediated expansion of ILC2 cells in cpdm mice, 第43回日本免疫学会総会・学術集会, ワークショップ innate lymphoid cells-1, 京都, 2014
3. 佐々木義輝, LUBAC controls TLR4- and TRIF-mediated cell death in B cells, 第44回日本免疫学会総会・学術集会, ワークショップ B lymphocyte signaling, 札幌, 2015
4. 佐々木義輝, 岩井一宏, Linear polyubiquitin chains controls TRIF-dependent cell death in B cells induced by TLR4 stimulation, 第89回日本生化学会大会 口頭発表 細胞応答-V, 仙台, 2016
- 〔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

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

6．研究組織

(1)研究代表者

佐々木義輝 (SASAKI YOSHITERU)

京都大学大学院・医学研究科・細胞機能制

御学・准教授

研究者番号：80323004

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

無し