

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22117006

研究課題名(和文)直鎖状ポリユビキチン化修飾による新たなNF- κ B活性化機構と病態との関連研究課題名(英文)Studies on novel NF- κ B activation mechanism through linear ubiquitination and its related disorders

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 105,500,000円

研究成果の概要(和文)：細菌やウイルス感染、紫外線・放射線など様々な外界刺激に対して、ヒトは免疫や炎症応答によって対応します。この過程で重要な細胞内シグナル伝達機構としてNF- κ Bシグナルがあります。私たちは、ユビキチンという分子が直鎖状に連結することでNF- κ Bシグナルを活性化するという新しい生理機構を同定しました。また、直鎖状ユビキチンを生成する酵素(LUBACと命名)の構成因子が欠損すると重篤な皮膚炎を発症すること、またB細胞リンパ腫などのがん発症にも関連することを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：NF- κ B is a critical signal transduction pathway to regulate immune and inflammatory responses, which are induced by various stimuli such as bacterial and viral infections and irradiation. We identified a novel physiological regulatory mechanism that is mediated by linearly linked ubiquitin molecules. We showed that genetic deficiency of a component of linear ubiquitin-generating enzyme (LUBAC) induces severe chronic dermatitis. Furthermore, we revealed that LUBAC activity is related with B cell lymphomas.

研究分野：機能生物化学

キーワード：酵素 タンパク質 細胞・組織 シグナル伝達 免疫学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のユビキチン修飾は分解に導くシグナルとして発見され、時間・空間特異的な細胞内タンパク質分解の生理的重要性に鑑みて2004年にユビキチン系の発見者らにノーベル化学賞が受賞されるに至った。しかしその後の研究から、ユビキチン修飾はタンパク質分解のみならず、シグナル伝達、DNA修復、エンドサイトーシスなど多彩な生理機能に関与することが明らかにされ、ユビキチン系研究は拡大の一途を辿っている。ユビキチン修飾系の多様な生理機能発現の差違にはポリユビキチン鎖の結合様式が反映しており、Lys48型ポリユビキチン鎖はタンパク質分解シグナルとなるがLys63型ポリユビキチン鎖はシグナル伝達など非分解シグナルとして機能することが知られている。炎症や免疫制御シグナルとして重要なNF- κ B経路やMAPキナーゼ活性化にLys63型ポリユビキチン鎖生成が深く関与することはChenら(米国)や領域代表の井上らを中心に解明されてきたが、Lys63型ポリユビキチン鎖生成に必須な酵素(Ubc13)をノックアウトしてもNF- κ B活性化にほとんど影響を与えないことが審良ら(阪大)によって示され、Lys63型ポリユビキチン鎖以外にもNF- κ B活性化に寄与するポリユビキチン鎖の存在が示唆された。

我々はRING型ユビキチンリガーゼのHOIL-1を発見し(*Nature Cell Biol.*, 2003)、HOIL-1のスプライシングアイソフォームであるHOIL-1Lとその結合タンパク質(HOIP)が高分子量複合体(LUBAC)を形成することで、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」を生成することを見いだした(*EMBO J.*, 2006)。さらに我々は、LUBACはNEMOを標的として直鎖状ポリユビキチン化することでNF- κ B経路を特異的に活性化することを世界に

先駆けて報告した(*Nature Cell Biol.*, 2009)。これはLys63型ポリユビキチン鎖だけでなく、直鎖状ポリユビキチン化修飾がトリガーとなってNF- κ B経路を活性化することを示す新たな知見である。

2. 研究の目的

本研究では、直鎖状ポリユビキチン鎖生成ユビキチンリガーゼ複合体(LUBAC)のNF- κ B経路制御と病態発現における役割を明らかにすることを到達目標とする。そのために、炎症性サイトカイン刺激に応答して直鎖状ポリユビキチン化を受ける基質候補を同定する、直鎖状ポリユビキチンに特異的に結合する細胞内タンパク質を同様に質量分析によって解析し、LUBAC依存性NF- κ B活性制御の役割を明らかにする、直鎖状ポリユビキチン鎖と同定された結合タンパク質との複合体を結晶化し、構造解析を行う、これらの分子の細胞機能をNF- κ B経路、MAPキナーゼ経路、インターフェロン産生経路などのシグナル伝達経路を中心に解明する、NF- κ B活性を抑制することが知られる脱ユビキチン化酵素であるCYLD(円柱腫の病因タンパク質)やA20を中心に、直鎖状ポリユビキチン鎖の分解に関わる酵素を同定し、LUBAC依存性NF- κ B活性制御機構を解析する。

3. 研究の方法

シグナル依存的に直鎖状ポリユビキチン化されるタンパク質を特異的抗体カラム、またはNEMOの直鎖状ポリユビキチン結合性UBANドメインを用いて精製し、質量分析により同定する。

このようにして同定された基質タンパク質候補は、LUBACによる*in vitro*ユビキチン化反応、細胞内過剰発現またはsiRNAを用いたノックダウンによってNF- κ B活性、MAPキナーゼ活性、インターフェロン産生経路制御における機能解析を行う。

脱ユビキチン化酵素に関してはポリユビキチン鎖特異性を解析するとともにLUBAC 活性を負に制御するか明らかにする。特にこれまで NF- κ B 制御で同定された CYLD と A20 は重点的に解析する。

4. 研究成果

NF- κ Bシグナル制御ではリン酸化やユビキチン化など時空間特異的な翻訳後修飾が重要な調節機能を果たす。これまでタンパク質のユビキチン化は、ユビキチンのLys残基側鎖を介するイソペプチド結合性のポリユビキチン鎖が形成されると知られていたが、我々はユビキチンのN末端 α -NH₂基を介してペプチド結合で連結した新規「直鎖状ユビキチン鎖」を特異的に形成するユビキチンリガーゼ複合体(LUBAC)を同定し、これが炎症応答や免疫制御に重要なNF- κ Bシグナル制御に必須であることを見いだした。

そこで本新学術領域研究では、LUBACによるタンパク質の直鎖状ユビキチン化修飾とその生理機能および破綻がもたらす病態との関連の解明を目指した。まず、我々は、LUBACの構成サブユニットとして、HOIL-1LとHOIPに加えて新たにSHARPINを同定した。*Sharpin*遺伝子の自然突然変異マウス(*cpdm*マウス)は、重篤な慢性皮膚炎を呈するが、我々はその原因がLUBAC欠損によってNF- κ B活性制御が不全になることに起因すると明らかにした(*Nature*, 2011)。さらに、LUBACはインターフェロン産生経路を抑制することでNF- κ B活性を特異的に亢進するのみならず(*Mol. Cell*, 2011)、癌転移にも重要であった(*Int. J. Oncol.*, 2012)。興味深いことに、LUBAC複合体形成には、HOIL-1Lのユビキチン様(UBL)ドメインとHOIPのユビキチン結合(UBA)ドメイン間の新規会合様式が関わっていた(*EMBO Rep.*, 2012)。また、NF- κ B経路では、NEMO(NF- κ B essential modulator)に2分子ユビキチンが直鎖状に付加されることで十分な活性化を現すこと

を見出した(*J. Biol. Chem.*, 2012)。さらに我々は石谷班との共同研究として、脱ユビキチン化酵素のA20が直鎖状ユビキチン鎖を分解することはできないが、7番目のzinc fingerドメインを介して直鎖状ユビキチンに特異的に結合することで、TNF受容体からNF- κ B活性化因子を解離させNF- κ B活性を抑制することを見出した(*EMBO J.*, 2012)。石谷班とは、自然免疫応答において重要なDNAセンサータンパク質で、2ndメッセンジャーとして働くcAMP-cGMP(cGAMP)を産生する酵素であるヒトcGASの構造と生理機能相関についても解明した(*PLoS One*, 2013)。また、佐藤班、井上班、武川班との共同研究として脱ユビキチン化酵素CYLDが直鎖状ユビキチンとK63ユビキチンを分解する分子メカニズムと、NF- κ BやMAPK活性など生理機能制御との連関を明らかにした(*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2015)。

この様に我々は、本新学術領域研究において直鎖状ユビキチン化という新規翻訳後修飾の生理機能解析を中心として、その生体防御における役割を領域内の他班と密接に連携することで解明できたと考える。

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24件)

1. Kato, M., Shimizu, A., Yokoyama, Y., Kaira, K., Shimomura, Y., Ishida-Yamamoto, A., Kamei, K., Tokunaga, F., and Ishikawa, O.: A novel autosomal recessive mutation of DSG4 causes monilethrix through the ER stress response. *J. Invest. Dermatol.*, 135(5), 1253-1260, (2015), 査読有。
2. 徳永文稔: 直鎖状ユビキチン鎖による炎症制御 **臨床免疫・アレルギー科**, 63(5), 495-501, (2015), 査読無。
3. Sato, Y., Goto, E., Shibata, Y., Kubota, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., Inoue, J., Takekawa, M., Tokunaga, F., and Fukai, S.:

- Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 22(3), 222-229, (2015), 査読有.
4. 徳永文稔 : 8 番目のユビキチン鎖「直鎖状ユビキチン鎖」の機能と疾患への関わり - 炎症、免疫応答に重要な NF- κ B 経路の新しい制御機構- **化学と生物**, 52(11) 716-718, (2014), 査読無.
 5. 櫻井宏明、徳永文稔 : 次世代シグナル伝達研究 -先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開- **生化学**, 85(6), 403-404, (2013), 査読無.
 6. 徳永文稔 : 直鎖状ユビキチン化を介した NF- κ B 制御機構と疾患 **生化学**, 85(6), 414-422, (2013), 査読無.
 7. Kato, K., Ishii, R., Goto, E., Ishitani, R., Tokunaga, F., and Nureki, O.: Structural and functional analyses of DNA-sensing and immune activation by human cGAS. *PLoS One*, 8, e76983, (2013), 査読有.
 8. Fujita, N., Morita, E., Itoh, T., Tanaka, A., Nakaoka, M., Osada, Y., Umemoto, T., Saitoh, T., Nakatogawa, H., Kobayashi, S., Hataguchi, T., Guan, J.L., Iwai, K., Tokunaga, F., Saito, K., Ishibashi, K., Akira, A., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T.: Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J. Cell Biol.* 203, 115-128, (2013), 査読有.
 9. Tokunaga, F.: Linear ubiquitination- mediated NF- κ B regulation and its related disorders. *J. Biochem.* 154, 313-323, (2013), 査読有.
 10. Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., and Nureki, O.: 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.
 11. Kensche, T., Tokunaga, F., Ikeda, F., Goto, E., Iwai, K., and Dikic, I.: 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.
 12. Yagi, H., Ishimoto, K., Hiromoto, T., Fujita, H., Mizushima, T., Uekusa, Y., Yagi-Utsumi, M., Kurimoto, E., Noda, M., Uchiyama, S., Tokunaga, F., Iwai, K., and Kato, K.: Non-canonical UBA-UBL interaction mediates formation of linear ubiquitin chain assembly complex. *EMBO Rep.*, 13, 462-468, (2012), 査読有.
 13. Uekusa, Y., Miura, S., Sasakawa, H., Kurimoto, E., Sakata, E., Oliver, S., Yagi, H., Tokunaga, F., Iwai, K., and Kato, K.: 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.
 14. Tomonaga, M., Hashimoto, N., Tokunaga, F., Onishi, M., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Iwai, K.: 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.
 15. Tokunaga, F. 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.
 16. Tokunaga, F. and Iwai, K.: LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses. *Microbes Infect.*, 14, 563-572, (2012), 査読有.
 17. 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), 査読無.
 18. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, K.: SHARPIN is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin assembly complex. *Nature*, 471, 633-636, (2011), 査読有.
 19. Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skånland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., van Wijk, S., Franz-Wachtel, M., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Schaefer, L., Macek, B., Rittinger, K., and Dikic: SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating

- NF- κ B activity and apoptosis. *Nature*, 471, 637-641, (2011), 査読有.
20. Inn, K.S., Gack, M.U., Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.Y., Iwai, K., and Jung, J.U.: Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. *Mol. Cell*, 41, 354-365, (2011), 査読有.
 21. 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), 査読無.
 22. 徳永文稔、岩井一宏：ユビキチン修飾系による NF- κ B シグナル伝達制御：新規直鎖状ポリユビキチン鎖形成を介する NF- κ B 制御機構の発見 **細胞工学**, 29, 1224-1230, (2010), 査読無.
 23. 徳永文稔：ユビキチン-プロテアソーム系の多彩な生理機能と疾患への関与 **BIO Clinica**, 25, 1092-1097, (2010), 査読無.
 24. Kumanomidou T., Nakagawa T., Mizushima T., Suzuki A., Tokunaga F., Iwai K., Yoshida Y., Tanaka K., and Yamane T.: Crystallization and preliminary X-ray characterization of the Skp1-Fbg3 complex. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 66, 95-98, (2010), 査読有.
- [学会発表] (計 28 件)
1. Tokunaga, F.: Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation, **2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling**, Jan. 23, 2015, Tokyo
 2. Nakazawa, S., Ishii, R., Oikawa, D., Ishii, R., Nureki, O., and Tokunaga, F.: Linear ubiquitin-binding of optineurin regulates NF- κ B signaling, **2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling**, Jan. 23, 2015, Tokyo
 3. 及川大輔、石井亮平、中澤世識、石谷隆一郎、濡木理、徳永文稔：Optineurin の直鎖状ユビキチン結合を介した NF- κ B 制御と疾患との関連、**第 37 回日本分子生物学会**、2014 年 11 月 26 日、横浜
 4. 後藤栄治、徳永文稔：CRISPR/Cas9 法を用いた LUBAC 欠損細胞の作製と NF- κ B 活性制御への影響、**第 37 回日本分子生物学会**、2014 年 11 月 26 日、横浜
 5. Nakazawa, S., Oikawa, D., Ishii, R., Hatada, I., Nureki, O., and Tokunaga, F.: Optineurin regulates NF- κ B via linear ubiquitin-binding, **International Symposium on Homeostasis through Development, Life, and Diseases**, Nov. 7, 2014, Maebashi
 6. 及川大輔、石井亮平、中澤世識、石谷隆一郎、濡木理、徳永文稔：Optineurin の NF- κ B シグナル制御の細胞機構と疾患、**第 9 回臨床ストレス応答学会**、2014 年 11 月 1 日、岡山
 7. 野口拓也、熊澤琢也、徳永文稔：癌抑制遺伝子 STK11 による細胞死制御機構、**第 87 回日本生化学会大会**、2014 年 10 月 17 日、京都
 8. 徳永文稔：直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B シグナル制御の分子基盤、**第 87 回日本生化学会大会**、2014 年 10 月 16 日、京都
 9. 及川大輔、中澤世識、徳永文稔：新規 LUBAC シグナル複合体構成因子の探索と細胞機能解析、**第 66 回日本細胞生物学会**、2014 年 6 月 13 日、奈良
 10. 徳永文稔：直鎖状ポリユビキチン修飾を介した NF- κ B 制御の B 細胞リンパ腫発症における役割、**日本薬学会第 134 年会 シンポジウム：翻訳後修飾に着目したシグナル伝達研究と創薬の最前線**、2014 年 3 月 30 日、熊本
 11. 徳永文稔：直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B シグナル制御と疾患、**東京工業大学バイオサイエンスシンポジウム招待講演**、2014 年 2 月 18 日、横浜
 12. 徳永文稔：ユビキチン修飾による細胞機能制御と疾患、**第 60 回北関東医学会総会特別講演**、2013 年 9 月 26 日、前橋
 13. Tokunaga, F.: Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation mechanism and its related disorders、**プロテイン・アイランド・松山(PIM)国際シンポジウム 2013 招待講演**、2013 年 9 月 18 日、松山
 14. 徳永文稔：直鎖状ポリユビキチン化を介した NF- κ B 制御と疾患、**第 86 回日本生化学会 シンポジウム 次世代シグナル伝達研究への展開**、2013 年 9 月 12 日、横浜
 15. 徳永文稔、西増弘志、石谷隆一郎、濡木理：直鎖状ユビキチン化を介する NF- κ B 制御に関わる脱ユビキチン化酵素と疾患、

病態プロテアーゼ学会、2013年8月16日、大阪

16. Tokunaga, F.: Down-regulation mechanism for LUBAC-induced NF- κ B pathway, **The 35th Naito Conference: The ubiquitin-proteasome system: From basic mechanisms to pathophysiological roles**, Jul. 11, 2013, Sapporo
17. Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., and Nureki, O.: 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**, Feb.12, 2013, Tokyo
18. Tokunaga, F.: Activation and regulation mechanisms of the linear ubiquitination-mediated NF- κ B pathway, **1st International Symposium on Protein Modification in Pathogenic Dysregulation of Signaling**, Feb. 1, 2013, Tokyo
19. 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細胞リンパ腫との連関、**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
20. 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：ペールを脱いだユビキチン系の新機能**、2012年12月16日、福岡
21. 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
22. Tokunaga, F.: Specific recognition of linear ubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation, **Keystone Symposium**, Mar. 21, 2012, Whistler, Canada
23. 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
24. 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**、2011年9月23日、京都
25. 徳永文稔：新規直鎖状ポリユビキチン鎖

形成を介したNF- κ Bシグナル制御（シンポジウム）**新学術領域研究「修飾シグナル病」第1回公開シンポジウム**、2011年1月29日、東京

26. Tokunaga, F.: Linear polyubiquitination: A new regulator of NF- κ B activation (Invited Lecture). **Pacificchem**, Dec. 19, 2010, Honolulu, U.S.A.
27. 徳永文稔、岩井一宏：新規直鎖状ポリユビキチン化によるNF- κ B活性化制御と疾患（ワークショップ）**BMB2010**、2010年12月8日、神戸
28. 徳永文稔、岩井一宏：直鎖状ポリユビキチン鎖生成ユビキチンリガーゼ（LUBAC）の新規サブユニットの同定、**第2回シグナルネットワーク研究会**、2010年5月14日、大阪

〔図書〕(計1件)

1. 井上純一郎、武川睦寛、徳永文稔、今井浩三（編集）**実験医学増刊「シグナル伝達研究最前線2012」**羊土社 2012.

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）
該当なし

取得状況（計0件）
該当なし

〔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

(<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molcb/>)

群馬大学生体調節研究所

(<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/>)

新学術領域「修飾シグナル病」

(<http://shushoku-signal.com/>)

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