

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06611

研究課題名(和文) 新規直鎖状ユビキチン結合タンパク質ファミリーのNF- κ B制御メカニズムの解明研究課題名(英文) Clarification of the molecular mechanism of NF- κ B regulation by novel family of linear ubiquitin binding protein

研究代表者

高橋 宏隆 (Takahashi, Hirotaka)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：70432804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のユビキチン(Ub)化において、タンパク質に結合したUbに別のUb分子が重合し8種のPolyUb鎖を形成する。個々のPolyUb鎖の機能や役割は、これに結合するユビキチン結合タンパク質(UBP)によって決定される。本研究では、先行研究で見出した新規M1鎖UBPであるZFANDファミリーに属するZFAND3, 5, 6のNF- κ Bシグナル制御の役割の解明を目指した。本研究の成果により、M1鎖に高い結合能を示すZFAND5は、NF- κ Bシグナル活性化経路において、他のUBPと協調してK63やM1鎖のユビキチン修飾を受ける因子に作用することでシグナル伝達を抑制していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NF- κ Bシグナル伝達経路は細胞の炎症や免疫、生存を左右する非常に重要な経路であり、これまでに多くの研究が成されている。しかし、個々の細胞イベントによって、使われる因子やそのアウトプットとして起こる細胞応答は複雑多岐にわたっており、まだ未詳な点が少なくない。本研究において、これまで機能未知だったZFANDファミリーに焦点を絞り、その機能の一端の解明に成功した。これらの結果から、NF- κ B活性化時に形成されるユビキチン鎖に、ZFAND5をはじめとするUBPが数多く集結し、その活性を制御していることが示唆されており、上記の炎症や免疫のイベントに寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In protein ubiquitination process, eight kinds of polyubiquitin chains are formed by conjugation of one ubiquitin molecule to another ubiquitin that binds to target proteins. The functions and roles of individual polyubiquitin chains are mainly decided by ubiquitin binding proteins (UBPs). In this study, we attempted to clarify the roles of novel M1-UBPs belonging to ZFAND family, which has been identified in our previous study, in a signal transduction of NF- κ B activation. Our results strongly suggested that ZFAND5 that showed high binding activity with M1-ubiquitin chain suppressed the NF- κ B signaling by acting with proteins that are subjected with K63- and M1-polyubiquitination. Interestingly, this suppression was proceeded in concert with other UBPs.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：ユビキチン結合タンパク質 ZFAND 直鎖ユビキチン鎖 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のユビキチン (Ub) 化において、タンパク質に結合した Ub に別の Ub 分子が重合し PolyUb 鎖を形成する。PolyUb 鎖は 8 種類の重合様式が存在し、個々の PolyUb 鎖の機能や役割は、これに結合するユビキチン結合タンパク質 (UBP) によって決定される。本申請研究で対象とする NF-κB シグナル活性化経路では、K63 鎖や M1 鎖などの PolyUb 鎖が形成され、K63 鎖に結合する TAB2/3 や、M1 鎖に結合する NEMO や A20 が、NF-κB シグナルの下流への伝達を制御する主要な UBP として働く。しかし、これらの UBP が全ての細胞で主要な UBP として機能する訳ではなく、細胞によっては別の UBP が制御に寄与すると考えられるが、その多くは未同定のままである。そのため、これら未知の UBP を同定することは、複雑多岐な NF-κB 制御の分子メカニズムの解明に大きく貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

ポリユビキチン (PolyUb) 鎖を介したシグナル伝達においては、その PolyUb 鎖に結合するユビキチン結合タンパク質 (UBP) がその制御に重要な働きを示す。先行研究において、NF-κB シグナルの活性化因子である直鎖型 PolyUb 鎖 (M1 鎖) に結合する UBP として、ZFAND ファミリーに属する 4 つのタンパク質を見出した。これらの ZFAND は、いずれも細胞において NF-κB シグナルを抑制することから、NF-κB シグナルの新規制御因子として注目した。本研究では、この 4 つの ZFAND のうち、A20 型 Zinc フィンガー (A20-Zinc) ドメインを有する ZFAND3, 5, 6 に着目し、PolyUb 鎖の特異性や結合アフィニティー、結合様式などの生化学的性質を明らかにする。得られた生化学的性質をもとに、ZFAND の NF-κB シグナル制御機構を細胞生物学的手法により明らかにし、細胞内での 3 つの ZFAND のそれぞれの役割やその生理学的意義の解明を目指す。

3. 研究の方法

ZFAND の PolyUb 鎖との結合解析・・・申請者によって M1-UBP として見出された ZFAND3, 5, 6 について、組換えタンパク質を合成・精製し、生化学的解析からそれぞれの ZFAND の PolyUb 鎖への結合力を調べ、それぞれの ZFAND の PolyUb 鎖結合能や PolyUb 鎖特異性の決定を目指した。得られた結果をもとに、各 ZFAND とそれに結合する PolyUb 鎖の結合様式の予測を行った。これらの情報をもとに、PolyUb 鎖との結合に関わるアミノ酸を置換した変異体や、PolyUb 鎖の特異性が異なる ZFAND 同士で、結合ドメインをスワップさせた変異体を作製し、結合部位の特定を目指した。

ZFAND の細胞内における役割の解明・・・また各 ZFAND の細胞内での役割を調べるため、NF-κB シグナル活性化時の各 ZFAND の mRNA 発現量の変化を調べる。また ZFAND が NF-κB シグナルのどのステージに作用しているかを、上流・中流・下流域の活性化因子の高発現から調べた。さらに、申請者の研究室で開発した改良型ビオチン化酵素 Air-ID を ZFAND に融合し、定常時および NF-κB シグナル活性化時に各々の ZFAND と相互作用することでビオチン化された細胞内タンパク質を質量分析で網羅的に同定し、細胞内における役割の解明を目指した。

4. 研究成果

ZFAND の PolyUb 鎖との結合解析・・・当初予定していた Surface plasmon resonance (SPR) 解析による ZFAND ファミリーと 7 種類の PolyUb 鎖の結合解析は、条件検討が困難で PolyUb 鎖の解離が認められず、断念した。一方で、本研究室で開発された 10 アミノ酸からなる高親和性タグを用いた ZFAND のプルダウンアッセイでは、共沈降したユビキチン鎖を確認することができた。これを用いて、ZFAND3 および ZFAND5 と K48, K63 および M1 鎖との結合を調べたところ、ZFAND5 は K63 および M1 鎖に強い結合を示し、K48 鎖にも弱いながら結合を示した (図 1)。一方の ZFAND3 は K63, M1 鎖に結合を示したものの、K48 鎖への結合は認められなかった。同じく A20-Zinc ドメインである A20 の ZF7 は M1 鎖への特異性が非常に高いことが知られているが、ZFAND の A20-Zinc ドメインは ZF7 とのアミノ酸配列の相同性も低く、PolyUb 鎖に対する結合様式が ZF7 とは異なっている可能性が強く示唆された。また、先行研究において ZFAND3 は、ZFAND5, 6 と比較して、M1 鎖に対する

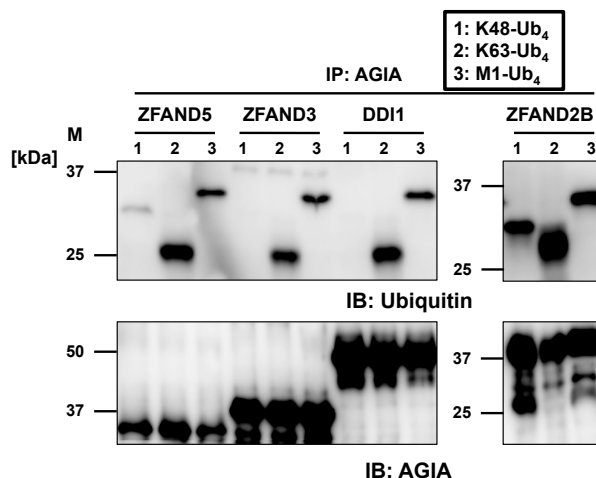


図 1. AGIA 抗体を用いた K48, K63, M1 テトラ PolyUb 鎖のプルダウンアッセイ。既知の M1-UBP である DDI1 をポジティブコントロールとして用いた。

結合能が低い結果が得られていた。これらの ZFAND の A20-Zinc ドメインのアミノ酸配列比較から、結合能の差は A20-Zinc ドメインの N 末側の 2 つのシステイン間のループ構造 (1st-loop) の違いに起因していると考えられた。そこで、ZFAND5 と ZFAND3 の A20-Zinc ドメインを置換したドメインスワップ変異体を作製し、M1 鎖への結合能を調べた。その結果、ZFAND5 の 1st-loop を ZFAND3 に置換した変異体では、顕著な M1 鎖への低下が認められた。一方で、ZFAND3 の 1st-loop を ZFAND5 に置換した変異体は M1 鎖への結合能が大きく向上したものの、野生型 ZFAND と比較すると依然として低かった。これらの結果は、ZFAND3,5 の M1 鎖への結合能の差異は 1st-loop に起因するところが大きいものの、他の領域の関与も示唆された。ZFAND の細胞内における役割の解明・NF- κ B の活性化因子である TNF を 1, 2, 4 時間処理した細胞における各 ZFAND3, 5, 6 の発現量を調べた。しかし、いずれの ZFAND も TNF 刺激により発現が誘導されることはなかった。また、NF- κ B の抑制効果が強く認められた ZFAND5 について、上流因子 RIP、中流の NEMO、下流の RelA の高発現によって活性化した NF- κ B シグナルについて、ZFAND5 の共発現の影響を調べた。その結果、RIP および NEMO の活性化は顕著に抑制したものの、RelA についても抑制は認められたものの、RIP や NEMO と比較すると弱かった (図 2)。RIP や NEMO はいずれも、ZFAND5 が高い結合能を示す K63 や M1 鎖によるユビキチン化修飾を受けることが知られており、RIP や NEMO によって惹起される NF- κ B シグナル活性化への抑制効果が強いことは、生化学的データと一致している。これらの結果から、ZFAND5 および 6 は、細胞内において K63 や M1 鎖を足場とする NF- κ B シグナル活性化の際に、この K63 や M1 鎖に結合することで、シグナルを抑制している可能性が強く示唆された。

また、M1 鎖形成に関わる唯一の E3 である LUBAC の高発現細胞および非発現のコントロール細胞において、AirID を融合した ZFAND3 および 5 を発現させ、ZFAND の相互作用の同定を試みた。この結果、M1 鎖への結合能および NF- κ B シグナルの抑制効果が高い ZFAND5 は LUBAC の構成因子である HOIP, HOIL-1L および SHARPIN との強い相互作用が認められたが、M1 鎖への結合能および NF- κ B シグナルの抑制効果が低い ZFAND3 は顕著な相互作用が認められなかった。また、数多くの相互作用タンパク質が検出され、ZFAND3 と比較して ZFAND5 により高い結合を示し、かつ LUBAC の高発現によってより ZFAND5 に高い結合を示すタンパク質群の同定に成功した (図 3, 赤枠)。この中には、NF- κ B 活性化経路に関わる複数のタンパク質が含まれており、特に ZFAND と同じく PolyUb 鎖に高い結合を示し、NF- κ B シグナルを抑制するタンパク質も含まれていた。現在、これらの UBP 同士の相互作用や NF- κ B シグナル制御メカニズムについての詳細な解析を行なっている。

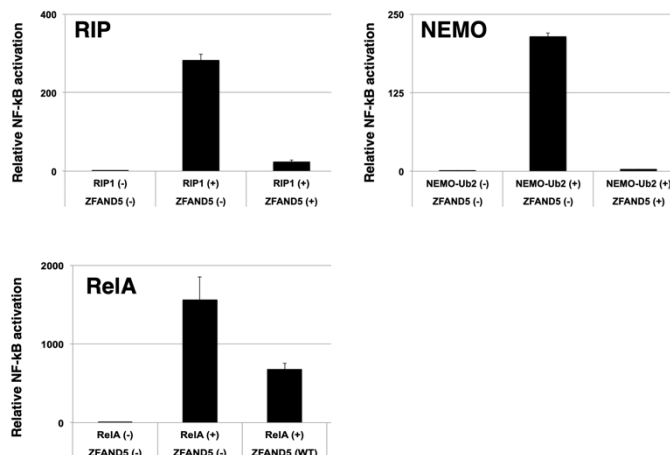


図 2. NF- κ B シグナル構成因子の高発現細胞における ZFAND5 のシグナル伝達制御。HEK293T に ZFAND5 と、RIP, NEMO および RelA を共発現させ、NF- κ B シグナルをルシフェラーゼプロモーターアッセイで調べた。

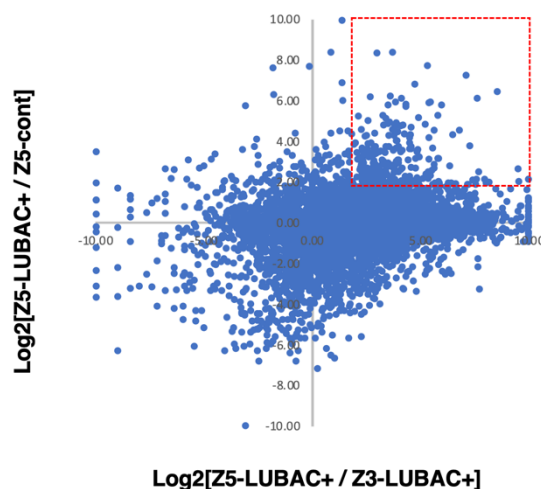


図 3. BioID によって見出された ZFAND5 結合タンパク質。縦軸は各相互作用タンパク質の LUBAC 高発現と非発現における ZFAND5 への結合の比較を、横軸は LUBAC 高発現下における ZFAND5 と ZFAND3 との結合の比較を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Oikawa Daisuke, Gi Min, Kosako Hidetaka, Shimizu Kouhei, Takahashi Hiroataka, Shiota Masayuki, Hosomi Shuhei, Komakura Keidai, Wanibuchi Hideki, Tsuruta Daisuke, Sawasaki Tatsuya, Tokunaga Fuminori	4. 巻 13
2. 論文標題 OTUD1 deubiquitinase regulates NF- B- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-022-05145-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takaoka Yousuke, Suzuki Kaho, Nozawa Akira, Takahashi Hiroataka, Sawasaki Tatsuya, Ueda Minoru	4. 巻 298
2. 論文標題 Protein-protein interactions between jasmonate-related master regulator MYC and transcriptional mediator MED25 depend on a short binding domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101504 ~ 101504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shioya Ryouhei, Yamada Kohdai, Kido Kohki, Takahashi Hiroataka, Nozawa Akira, Kosako Hidetaka, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 592
2. 論文標題 A simple method for labeling proteins and antibodies with biotin using the proximity biotinylation enzyme TurboID	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 54 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakakibara Iori, Yanagihara Yuta, Himori Koichi, Yamada Takashi, Sakai Hiroshi, Sawada Yuichiro, Takahashi Hiroataka, Saeki Noritaka, Hirakawa Hiroyuki, Yokoyama Atsushi, Fukada Soichiro, Sawasaki Tatsuya, Imai Yuuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Myofiber androgen receptor increases muscle strength mediated by a skeletal muscle splicing variant of Mylk4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102303 ~ 102303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamanaka Satoshi, Murai Hidetaka, Saito Daisuke, Abe Gembu, Tokunaga Etsuko, Iwasaki Takahiro, Takahashi Hirotaka, Takeda Hiroyuki, Suzuki Takayuki, Shibata Norio, Tamura Koji, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 40
2. 論文標題 Thalidomide and its metabolite 5 hydroxythalidomide induce teratogenicity via the cereblon neosubstrate PLZF	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e105375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020105375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hirotaka, Yamanaka Satoshi, Kuwada Shohei, Higaki Kana, Kido Kohki, Sato Yusuke, Fukai Shuya, Tokunaga Fuminori, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 8
2. 論文標題 A Human DUB Protein Array for Clarification of Linkage Specificity of Polyubiquitin Chain and Application to Evaluation of Its Inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 152 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8060152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osamu Nakabayashi, Hirotaka Takahashi, Kenta Moriwaki, Sachiko Komazawa-Sakon, Fumiaki Ohtake, Shin Murai, Yuichi Tsuchiya, Yuki Koyahara, Yasushi Saeki, Yukiko Yoshida, Soh Yamazaki, Fuminori Tokunaga, Tatsuya Sawasaki, Hiroyasu Nakano	4. 巻 4
2. 論文標題 MIND Bomb 2 prevents TNF-induced apoptosis via two distinct mechanisms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01603-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高橋宏隆
2. 発表標題 無細胞蛋白合成系を用いた、ユビキチン化によって制御されるNF-kBおよびIFNシグナル伝達経路の分子機構解明
3. 学会等名 第17回感染症サイトカイン研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Higaki K, Yamanaka S, Iwata K, Sato Y, Takaya D, Honma T, Tokunaga F, Takahashi H, Sawasaki T
2. 発表標題 Development of small chemical compounds that specifically inhibit the deubiquitinating enzyme USP15
3. 学会等名 The 19th Protein Island Matsuyama International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 重松 裕樹, 鈴木 陽一, Vasudevan G. Subhash, 澤崎 達也
2. 発表標題 デングウイルスNS3に結合する新規宿主因子SIGIRRの機能解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 坂口 詩穂, 林 徳宙, 入江 崇, 小迫 英尊, 澤崎 達也
2. 発表標題 In vitroおよび細胞レベルの2つの相互作用解析を基盤としたウイルスRNA受容体MDA5の新規結合タンパク質の網羅的同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 重松 裕樹, 鈴木 康嗣, 渡辺 幸三, 鈴木 陽一, Subhash G. Vasudevan, 澤崎 達也
2. 発表標題 デングウイルスNS3に結合する新規宿主因子SIGIRRの同定と機能解析
3. 学会等名 第27回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 山中 聡士, 栗田 翔平, 檜垣 佳奈, 佐藤 裕介, 深井 周也, 徳永 文稔, 澤崎 達也。
2. 発表標題 USPファミリーの脱ユビキチン化酵素を特異的に阻害する低分子化合物の開発。
3. 学会等名 第93回生化学会。シンポジウム「ケモテクノロジーが拓くユビキチンニューフロンティア」。(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 宏隆
2. 発表標題 コムギ無細胞タンパク質アレイ技術を用いたユビキチンシグナル解析
3. 学会等名 第6回日本血管生物学会若手研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 長尾 和哉, 岩崎 誠, 佐藤 裕介, 及川 大輔, 徳永 文稔, 澤崎 達也
2. 発表標題 コムギ無細胞系を用いた直鎖状ユビキチン鎖の新規デコーダー分子の網羅的探索と機能解析。
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 ワークショップ「多彩な生理機能を発揮するユビキチンコードのバイオロジー」
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Morishita R, Takahashi H, Sawasaki T	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 10
3. 書名 Methods of Mathematical Oncology, Fusion of Mathematics and Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------