

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249008

研究課題名(和文) ユビキチンが司る新規NF- κ B活性化機構の機能解析研究課題名(英文) Analysis of pathophysiology of LUBAC mediated NF- κ B activation

研究代表者

岩井 一宏 (Iwai, Kazuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60252459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,700,000円、(間接経費) 11,010,000円

研究成果の概要(和文)：LUBACユビキチンリガーゼ複合体は直鎖状ポリユビキチン鎖を生成することでNF- κ Bを活性化する。本研究において、SHARPINが新規サブユニットであることを同定し、LUBACはHOIL-1L、HOIP、SHARPINの3者複合体であることを明らかにした。またSHARPINを欠損した自然変異マウスcpdmはSHARPINの欠損に加え、他の2つのサブユニットが不安定化することで、慢性皮膚炎をはじめとする多様な症状を呈する事を示した。さらに、直鎖状ポリユビキチン鎖はコンベンショナルなB細胞の分化は正常であるが、抗原に応答できないこと、腹腔に存在するB1細胞が著減することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The LUBAC ubiquitin ligase activates NF- κ B by generating linear polyubiquitin chains. Previously, we have identified HOIL-1L and HOIP as components of LUBAC. In this study, we identified SHARPIN as the other subunit of LUBAC. Cpdm mice, a spontaneous mutant mice that exhibit pleomorphic phenotypes including chronic dermatitis, lack SHARPIN. We found that destabilization of the other subunits of LUBAC and lack of SHARPIN are causative for the phenotypes of cpdm mice. We also examined the roles of LUBAC mediated linear polyubiquitination in B cells and found that LUBAC's ligase activity is necessary for B1 cell development and antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent-II antigens.

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：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系は、2004年のノーベル化学賞がユビキチン依存性タンパク質分解系の発見者らに授与されたこともあり、我が国でも広く認知されるようになった。現状では「ユビキチン化」=「タンパク質分解」と理解されていることがほとんどであるが、ユビキチン修飾系の研究は急速に発展しており、多彩な様式でタンパク質の機能を制御していることが次々と判明している。すなわち、ユビキチン修飾系の研究はタンパク質分解の枠組みを遙かに凌駕し、新時代に突入している。

これまで、ポリユビキチン鎖はユビキチンのリジン残基を介してのみ生成されると考えられてきたが、申請者らはN末端のメチオニンを介した直鎖状ポリユビキチン鎖を生成するHOIL-1L/HOIPユビキチンリガーゼ複合体を同定するとともに(EMBO J. 2006)、同リガーゼ複合体がIKK複合体中のNEMOを直鎖状ポリユビキチン化してNF- κ Bを選択的に活性化すること、すなわち、直鎖状ポリユビキチン修飾による選択的NF- κ B活性調節系の存在を世界に先駆けて示してきた(Nature Cell Biology 2009)。

さらに、申請者らが樹立したHOIL-1Lノックアウト(KO)マウスはNF- κ B活性化不全は呈するが致死ではないのに対し、リガーゼ複体のもう1つの構成成分であるHOIP KOマウスは胎生致死であったので、HOIPと結合するHOIL-1L以外のタンパク質の存在を想定して解析し、新規HOIP結合タンパク質を同定した。

驚いたことに、その新規タンパク質は原因不明の慢性皮膚炎、免疫異常等の多彩な症状を呈するマウスで変異していることが報告されていた。これまでの予備的実験から、申請者らは新規HOIP結合タンパク質も直鎖状ポリユビキチン化、NF- κ Bの活性化に関与するとの知見を得ている。それゆえ、新規HOIP結合タンパク質変異マウスは、何らかのシグナルに対するNF- κ Bの活性化が減弱したことで慢性皮膚炎等の多彩な表現系を示していると考えられる。それゆえ、申請者らが見出したLUBACリガーゼによる直鎖状ポリユビキチン鎖生成機構と種々の疾患との関連が想定される。

2. 研究の目的

上記を踏まえ、以下の3点から研究を進め、直鎖状ポリユビキチン鎖によるNF- κ B活性化をNF- κ B活性化の新たなパラダイムとして確立するとともに、選択的NF- κ B活性化調節剤開発の基礎的検討を進める。

A. 新規HOIP結合タンパク質のNF- κ B活性化への関与と表現系との関連の解析

B. 遺伝子改変マウス等を用いた直鎖状ポリユビキチン鎖によるNF- κ B活性化機構の生理学および病理学的役割の解明

C. 直鎖状ポリユビキチン鎖形成阻害剤スクリーニング系の構築

3. 研究の方法

NF- κ Bはヘテロ(またはホモ)2量体で構成される転写因子であり、非活性化状態では阻害タンパク質と結合して細胞質に存在しているが、種々の刺激によって活性化されると核に移行して多彩な遺伝子の発現を亢進させる。TNF- α やIL-1 β の刺激により、HOIL-1L/HOIPユビキチンリガーゼが選択的にIKK(I κ Bキナーゼ)複合体に存在する活性調節因子であるNEMOを識別して直鎖状ポリユビキチン化することで、IKK複合体を活性化する。その結果NF- κ Bを細胞質に局在させる阻害タンパク質であるI κ B α の特定のセリン残基をリン酸化することでI κ B α のポリユビキチン化依存的な分解を引き起こして、NF- κ Bが核に移行して活性化される。本研究では新規HOIP結合タンパク質のNF- κ B活性化における役割を中心に研究を進める。

1. 新規HOIP結合タンパク質のNF- κ B活性化への関与と表現系との関連の解析

申請者らは、新規HOIP結合タンパク質はHOIL-1Lとは直接結合しないが、HOIPを共存した場合には両者が結合することを見出している。HOIPは600kD程度の高分子量複合体を形成していることも示している。新規HOIP結合タンパク質はHOIPとのみ複合体を形成するのではなく、HOIP、HOIL-1L、新規HOIP結合タンパク質が3者複合体を形成する可能性も想定される。前述のように、HOIPは約600kDの複合体中に存在するので、分子量を鑑みれば、この高分子量複合体にはHOIPが3分子存在すると想定される。HOIL-1Lと新規HOIP結合タンパク質は結合しないことから、3者複合体を形成する場合には、複合体はHOIP/新規タンパク質、HOIL-1L/HOIPヘテロダイマーが混在して形成されることが考えられる(図3)。

そこで、

a. 新規HOIP結合タンパク質の存在様式をゲル濾過、シーケンシャル免疫沈降法などを用いて検討する。3つのタンパク質からなる複合体である場合には複合体の多様性を検討する。

b. すでに入手している新規HOIP結合タンパク質変異マウスから胎児線維芽細胞(MEF)を樹立したので、これまでに樹立しているHOIL-1L KO、HOIP

KO MEF と TNF- α への反応性などを比較検討して新規 HOIP 結合タンパク質の機能を検証する。

2. 遺伝子改変マウス等を用いた直鎖状ポリユビキチン鎖による NF- κ B 活性化機構の生理学および病理学的役割の解明

a. HOIP KO マウスの解析

HOIL-1L KO や新規 HOIP 結合タンパク質変異マウスとは異なり、HOIP KO マウスは胎生致死となる。NF- κ B 活性化経路の分子の KO マウスで胎生致死を示すものは TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化の不全による肝細胞のアポトーシスが原因となる場合が多く報告されている。そこで、肝臓に焦点を絞って解析を進めるとともに、TNF- α KO マウスとの交配実験を進め、その原因を解明する。

b. 直鎖状ポリユビキチン鎖の B 細胞機能への関与の解析

新規 HOIP 結合タンパク質変異マウスは慢性皮膚炎以外にもリンパ濾胞形成不全、クラススイッチ不全などの免疫異常を呈する。そこで、B 細胞特異的な mb-1-Cre(フライブルグ大学・Reth 教授より供与)と交配した HOIP コンディショナルノックアウト(CKO)、HOIL-1L KO、新規 HOIP 結合タンパク質変異マウスの B 細胞について CD40、抗原受容体による NF- κ B 活性化を中心とした刺激伝達の解析および表現系の解析を進める。

c. 新規 HOIP 結合タンパク質 CKO マウスの作製

新規 HOIP 結合タンパク質変異マウスは多彩な表現系を示すので、特定の臓器、細胞種での新規 HOIP 結合タンパク質の役割の解析は難しい。そこで種々の臓器特異的な Cre マウスと交配して特定の臓器異常の解析を容易にする目的で、平成 22 年度は同タンパク質の CKO マウスの作製に着手する。

3. 直鎖状ポリユビキチン鎖形成阻害剤スクリーニング系の基礎的検討

NF- κ B の活性調節異常はアレルギー性疾患、ガンなど幅広い疾患で認められることから、直鎖状ポリユビキチン鎖の制御薬剤は臨床へ応用できる可能性も高い。そこで、すでに樹立している *in vitro* における直鎖状ポリユビキチン鎖生成系を用いて、直鎖状ポリユビキチン鎖生成阻害物質のスクリーニングを可能とするハイスループット解析系を構築する第一段階として、直鎖状ポリユ

ビキチン鎖の高感度検出系の樹立を進める。

4. 研究成果

1. 新規 HOIP 結合タンパク質の NF- κ B 活性化への関与と表現系との関連の解析

a. 新規 HOIP 結合タンパク質は SHARPIN と呼ばれているタンパク質である。SHARPIN は HOIP、HOIL-1L とともに 3 者で安定した LUBAC 複合体を形成して存在していた。LUBAC 複合体の多様性を検討したが、多様性はなく一般的な複合体であると考えられた。但し、複合体中のサブユニットの存在数は明確にはできなかった。これらの結果から HOIP、HOIL-1L、SHARPIN から構成される LUBAC が刺激依存的に IKK 複合体の NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することによって NF- κ B の活性化に導くと考えられた。

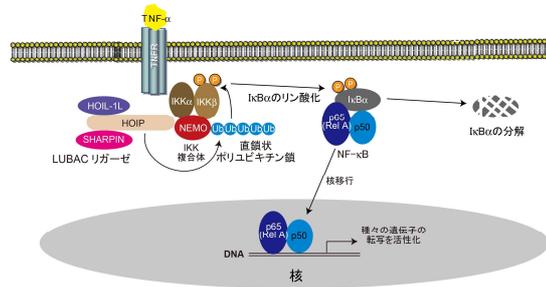


図 1 直鎖状ポリユビキチン鎖による NF- κ B 活性化機構

b. SHARPIN を欠失した自然変異マウスは cpdm マウスである。Cpdm マウス由来の MEF を TNF- α で刺激したところ TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化は減弱していた。cpdm MEF の TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化の減弱は HOIL-1L KO MEF とほぼ同程度であったが、直鎖状ポリユビキチン鎖形成能を消失した HOIP(HOIP Δ linear)を発現する MEF と比して減弱は軽度であった。

c. cpdm マウスでは SHARPIN の欠失により、LUBAC の他の 2 つのサブユニットも不安定化して、LUBAC の量が減少して直鎖状ポリユビキチン鎖生成能が減弱するので、LUBAC リガーゼの減少と SHARPIN の消失の両者が皮膚炎などの症状の発症に関与すると考えられた(Nature 2011)。

2. 遺伝子改変マウス等を用いた直鎖状ポリユビキチン鎖による NF- κ B 活性化機構の生理学および病理学的役割の解明

a. HOIP KO マウスの解析

NF- κ B 活性化経路の分子の KO マウスで胎生致死を示すものは TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化の不全による肝細胞のアポトーシスが原因となって胎生 12.5 日から 14.5 日程度

で死亡する。しかし、研究代表者らが樹立した鎖状ポリユビキチン鎖形成能を消失した HOIP(HOIP Δ linear)を発現するマウスは胎生 10.5 日に血管形成不全で死亡することが判明した。研究代表者らは LUBAC が細胞死制御にも関与することを見出しているが、この表現系は細胞死制御系の分子の KO マウスと類似するので、現在解析を進めている。

b. 直鎖状ポリユビキチン鎖の B 細胞機能への関与の解析

HOIP Δ linear CKO マウスを B 細胞特異的な mb-1-Cre(フライブルグ大学・Reth 教授より供与)と交配し、B 細胞における LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖の役割について解析を進めた。コンベンショナルな B 細胞の分化は正常であるが、抗原に反応できないこと、腹腔に存在する B1 細胞が著減することを見出した。また TNF 受容体ファミリーである CD40 依存的に NF- κ B のみならず ERK の活性化も減弱するが、MALT1-CARMA1-BCL10 を介する B 細胞抗原受容体依存的な NF- κ B 活性化は障害されないことを示した。このことから、LUBAC は IKK 活性化を介して NF- κ B のみならず、ERK の活性化にも関与すること、IKK の活性化には複数の経路が存在することが判った(Sasaki et al. EMBO J. 2013)。

c. 新規 HOIP 結合タンパク質 CKO マウスの作製

SHARPIN を欠損した cpdm マウスは多彩な表現系を示す、そこで SHARPIN の CKO マウスを樹立した。現在、B 細胞特異的な mb-1-Cre、皮膚ケラチノサイト特異的な K5-Cre との交配を進めている。

3 . 直鎖状ポリユビキチン鎖形成阻害剤スクリーニング系の基礎的検討

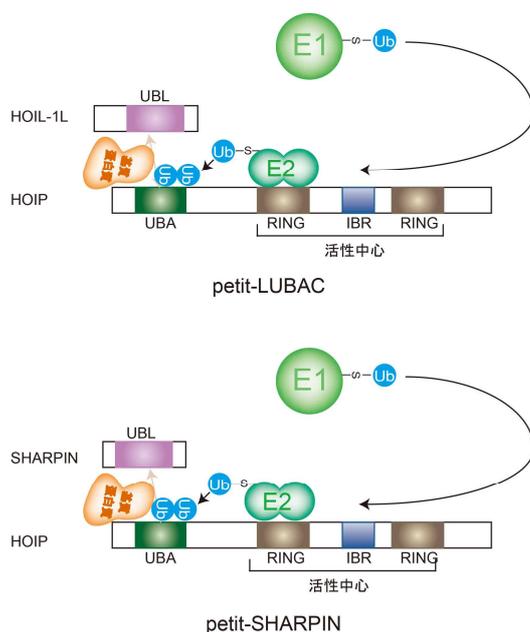


図 2 petit-LUBAC、petit-SHARPIN の模式図

ハイスループットスクリーニングに必要な量の全長の LUBAC の精製は困難であったので、直鎖状ポリユビキチン鎖生成活性を有する LUBAC の部分フラグメント (petit-LUBAC、petit-SHARPIN) の高発現系を樹立した(図 2)。

直鎖状ポリユビキチン鎖生成阻害物質のスクリーニングを可能とするハイスループット解析系の構築、スクリーニングはターゲットタンパク研究プログラムの研究費を用いて東京大学 創薬オープンイノベーションセンターと共同で施行した。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 11 件)

1. Inn, K.-S., Gack, M. U. Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.-Y., Iwai, K. (corresponding author) and Jung, J. U. Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type-I interferon induction. **Molecular Cell** 41:354-365, 2011.
2. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sataka, S.-I., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, K. SHARPIN is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin chain assembly complex. **Nature** 471:633-636, 2011.
3. Ikeda, F., Deribe, Y. L., Skånland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J.L., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Rittinger, K., Schaefer, L., Macek, B. and Dikic, I. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. **Nature** 471:637-641, 2011.
4. Niu, J., Shi, Y., Iwai, K. and Wu, Z.-H. LUBAC regulates NF- κ B activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO. **EMBO J.** 30: 3741-3753, 2011.
5. Sato, Y., Fujita, H., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., Kaiser, S. E., Iwai, K., and Fukai, S. Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by the HOIL-1L NZF domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108:20520-20525, 2011.
6. 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.

7. Yagi, H., Ishimoto, K., Takeshi Hiromoto, T., Fujita, H., Mizushima, T., Uekusa, Y., Yagi-Utsumi, M., Kurimoto, E., Noda, M., Uchiyama, S., Tokunaga, F., Iwai, K. (Correspondence author) and Kato, K. Non-canonical UBA–UBL interaction mediates formation of linear ubiquitin chain assembly complex. **EMBO Rep.** 13:462-468, 2012.
 8. Kensche, T., Tokunaga, F., Ikeda, F., Goto, E., Iwai, K. and Dikic, I. Analysis of Nuclear factor- κ B (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(28):23626-23634, 2012.
 9. Belgnaoui, S.M., Paz, S., Samuel, S., Goulet, M.L., Sun, Q., Kikkert, M., Iwai, K., Dikic, I., Hiscott, J. and Lin, R. Linear ubiquitination of NEMO negatively regulates the interferon antiviral response through disruption of the MAVS-TRAF3 complex. **Cell Host Microbe.** 12(2):211-222, 2012.
 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(19):3856-3870, 2012.
 11. Sasaki, Y., Sano, S., Nakahara, M., Murata, S., Kometani, K., Aiba, Y., Sakamoto, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Kurosaki, K. and Iwai, K. Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells. **EMBO J.** 32: 2463- 2476, 2013.
- [学会発表] (計 9 件)
1. Iwai, K. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B signaling. 2010 FASEB Summer Research Conferences “Ubiquitin and Cellular Regulation” June 13-18, 2010, Saxtons River, Vermont, USA. (Invited)
 2. Ueta, R. and Iwai, K. Dissection of intracellular heme transport mechanism using a baker’s yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. JSH International Symposium 2010 in Akita, Seven Wonders of Erythropoiesis, July 16-17, Akita, Japan. (Invited)
 3. Iwai, K. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B signaling. Banbury Center meetings, “SIGNALING THROUGH UBIQUITIN” November 14-17, 2010, The Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. (Invited)
4. Iwai, K. Linear polyubiquitination : A new regulator of NF- κ B activation. The EMBO Conference “Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers: From functional modules to system biology” September 21-25, Cavtat, 2011 Croatia. (Invited)
 5. Iwai, K., Fujita, H., Nakahara, M., Sano, S. and Tokunaga, F. Linear polyubiquitination : A crucial regulator of NF- κ B signaling. Keystone Symposium “NF- κ B signaling and Biology: From Bench to Bedside” and “Ubiquitin Signaling” March 18-23, 2012 Whistler, Canada. (Invited)
 6. Iwai, K. Linear polyubiquitination: a regulator of NF- κ B activation. 2012 FASEB Summer Research Conferences “Ubiquitin & Cellular Regulation” June 24-29, 2012, Saxtons River, Vermont, USA (Invited)
 7. Iwai, K. Mechanism underlying generation of linear polyubiquitin chains. 4th Annual Ubiquitin Drug Discovery & Diagnostics Conference 2012 July 23- 25, 2012, Four Seasons Hotel, Philadelphia, USA (Invited)
 8. Fujita, H., Sasaki, Y., Nakahara, M. Iwai, K. Linear polyubiquitination: A crucial regulator of NF- κ B signalling ZOMESVII conference September 18-22, 2012, Munich Germany (Invited)
 9. Iwai, K. Linear polyubiquitination : A crucial regulator of NF- κ B signaling. The 3rd International Symposium "Signaling and Regulation in the Immune and Nervous Systems“ November 22-23, 2012, Magdeburg, Germany (Invited)
- [図書] (計 5 件)
1. Iwai, K. Linear polyubiquitin chains: a new modifier involved in NF- κ B activation and chronic inflammation including dermatitis. **-Extra View- Cell Cycle** 10:3095–3104, 2011.
 2. 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.
 3. Walczak, H., Iwai, K., and Dikic, I. Generation and physiological roles of linear ubiquitin chains. **BMC Biol.** 2012 Mar 15;10:23.
 4. Iwai, K. Diverse ubiquitin signaling in NF- κ B activation. **Trends Cell Biol.** 22(7):355-364, 2012.

5. Tokunaga, F. and Iwai K. Linear ubiquitination: A novel NF- κ B regulatory mechanism for inflammatory and immune responses by the LUBAC ubiquitin ligase complex **Endocr J.** 59(8):641-652, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔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

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：6052459