

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05499

研究課題名(和文)ケモテクノロジーを利用したユビキチン鎖の機能解析と制御

研究課題名(英文)Functional regulation of ubiquitin chains using chemo-technologies

研究代表者

岩井 一宏(KAZUHIRO, IWAI)

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) 105,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン修飾は特異的なデコーダー分子(UBD)に認識されることで機能を発現する。本研究ではケミカルツールなどを利用して直鎖状ユビキチン鎖(M1鎖)のUBD認識による機能発現機構、及び、機能阻害による疾患治療の可能性について検索した。そして、M1鎖による新規シグナル伝達抑制機構、M1鎖阻害によるがん治療の可能性を示した。加えて、LUBAC機能亢進の全身性エリテマトーデス発症への寄与も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者はユビキチンが数珠状に連なったユビキチン鎖の1つである直鎖状ユビキチン鎖(M1鎖)を発見していた。本研究ではケミカルツールなどを用いてM1鎖が、がん、自己免疫疾患などの疾患の発症に関わっていることを明らかにし、それらの疾患の治療に新たな道を拓いた。研究代表者は、それらの成果を所属研究機関を通して適切にプレスリリースしている。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin modifications express their functions when they are recognized by specific decoder molecules (UBDs). In this study, we investigated the mechanism of functional expression of linear ubiquitin chains (M1 chains) by UBD recognition using chemical tools, and the possibility of disease therapy by inhibition of the function. We demonstrated a novel mechanism of inhibition of signal transduction by M1 chains and the possibility of cancer therapy by M1 chain inhibition. In addition, the contribution of LUBAC hyperfunction to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus was also elucidated.

研究分野：生化学・分子生理学

キーワード：ユビキチン ケミカルツール 直鎖状ユビキチン鎖 ユビキチンシグナル がん 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾は、修飾酵素群 (E3) によってタンパク質に結合し、特異的なデコーダー分子 (UBD) に認識されることで機能を発現する。そして、脱ユビキチン化酵素で切断されることでその機能が終焉する。生体内には多様なユビキチン修飾が存在し、認識するデコーダー分子の違いにより同一のユビキチン修飾が生命現象を ON にも OFF にも制御する。したがって、詳細な機能解析にはユビキチンと個々のデコーダー分子との結合の選択的な阻害が不可欠であるが、既存の手法では解析は不可能であり新たな技術開発が必要である。研究代表者は自らが発見した直鎖状ユビキチン鎖 (M1 鎖) の研究に、構造情報に基づいて作製したケミカルツールである短鎖架橋ペプチド (ステープルペプチド) がタンパク質間相互作用を選択的にかつ効率的に阻害できることを見出した。

そこで本研究では、優れたケミカルバイオロジストである分担者とともに、ユビキチン修飾とそのユビキチン修飾を特異的に認識するデコーダータンパク質の相互作用を選択的に阻害することで、それぞれのユビキチン修飾が果たす役割の詳細な解析を可能にすることを目指した。加えて、研究代表者がこれまで科学研究費補助金などで研究を推進してきたユニークなユビキチン修飾である、M1 鎖が制御する新規バイオロジーを検索し、新規な M1 鎖と認識タンパク質の結合が織りなす制御システムの解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究ではケモテクノロジーを用いてユビキチン修飾の多様な機能を以下の 3 点から解析した。

1. ケモテクノロジーによるユビキチン鎖認識の選択的阻害

直鎖状ユビキチン鎖 (M1 鎖) をはじめとして複数のユビキチン修飾が有機的に連携して機能する TNF- α シグナル系をモデルとして解析する。TNF- α シグナル系に關与する UBD に対する阻害ステープルペプチドを創製し、TNF- α 刺激依存的な NF- κ B 活性化、細胞死抑制への影響を検索する。

2. ユビキチン修飾の新機能の解析

M1 鎖の新機能 (オートファジーによる NF- κ B 活性化抑制への関与等) の解明を推進する。

3. ケモテクノロジーを用いた LUBAC リガーゼの制御とその応用展開

M1 鎖は LUBAC ユビキチンリガーゼ複合体によって特異的に生成される。それゆえ、LUBAC の機能を阻害する低分子化合物は M1 鎖の機能を全て阻害できる。そこで、すでに樹立している TR-FRET を用いたスクリーニング系を用いて、低分子化合物阻害剤を開発する。LUBAC の機能亢進が免疫チェックポイント、シスプラチン耐性に關与することが報告されており、抗がん剤のリード化合物となる可能性も大きいので精力的に解析する。

3. 研究の方法

ケミカルツールの合成、試験管内 1 次スクリーニングは領域内共同研究で施行し、試験管内、及び細胞内 2 次スクリーニングは本研究グループで施行した。また、直鎖状ユビキチン鎖が制御する新規バイオロジーの検索は細胞株を用いた細胞生物学実験に加え、研究代表者らがすでに作出しているサブユニットのドメイン欠失ノックアウトなどを用いた個体レベルでの研究などの多彩な研究手法を用いて研究を推進した。ケミカルツールの 1 次スクリーニング以外のほとんどの研究は研究代表者の研究室の設備を用いて施行したが、タンパク質の質量分析、リンパ腫ゲノム解析などは外部委託、あるいは共同研究者との共同研究として施行した。

4. 研究成果

1. ケモテクノロジーによるユビキチン鎖認識の選択的阻害

a) ケミカルツールを用いた TNF- α シグナル系の解析

1 に複数のユビキチン修飾が有機的に連携して機能する TNF- α シグナル系を示す。直鎖状ユビキチン鎖 (M1 鎖) が IKK 複合体の活性調節サブユニットである NEMO の UBAN ドメインに認識されると NF- κ B の活性化が誘導され、A20 の ZF7 によって認識されると NF- κ B 活性化が抑制される。また、M1 鎖を特異的に生成する LUBAC のサブユニットである HOIL-1L の NZF も M1 鎖を特異的に認識することが知られているが、その機能は明確ではない。そこで、NEMO UBAN、A20 ZF7、HOIL-1L NZF と M1 鎖との特異的に結合を阻害する複数のステープルペプチドを設計した。しかし残念なことに、設計した全てのステープルペプチドが細胞を用いたアッセイで阻害効果が認められなかったの

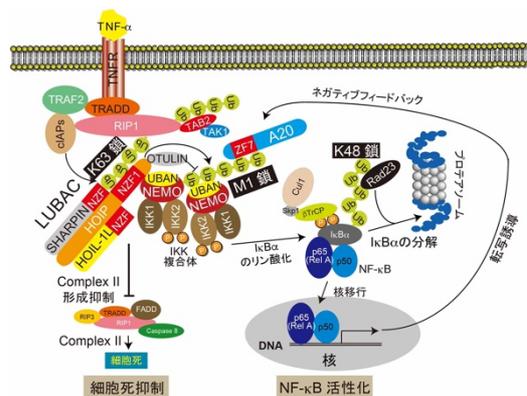


図 1 TNF- α シグナル伝達系

で、ステーブルペプチドの実験は中断した。

b) HOIL-1L NZF による M1 鎖認識の機能解析

図2にM1鎖を特異的に生成するLUBACリガーゼの構造を示す。

LUBACに存在する4つのNZFドメインの中で、M1鎖と結合するものはHOIL-1LとSHARPINのNZFである。前者はM1鎖と特異的に結合するが、後者はM1鎖のみならず、K63鎖とも結合する。加えて、研究代表者はSHARPINのNZFは細胞死制御に寄与することを報告していたので、本研究ではケミカルツールを用いて、機能が未同定であるHOIL-1LのNZFドメインの解析を推進した。そこで、領域の吉田と共同でHOIL-1L NZFとM1鎖との結合阻害のハイスループットスクリーニング系を作製し、同スクリーニング系でM1鎖とHOIL-1L NZFの結合を阻害する化合物を同定した。さらに2次スクリーニングを施行し、細胞内でM1鎖とHOIL-1L NZFの結合を阻害する2つの化合物を同定した。同定した2種の化合物のうち、1つはNF-κB活性化を抑制するが、細胞死を抑制しないこと、もう1つは細胞死を亢進させることを示した。2つの化合物が異なる特徴を示すのは、細胞死を亢進させる化合物はHOIL-1LのNZFだけではなく、SHARPINのNZFとM1鎖の結合を阻害するためであることを示した。これらの化合物を用いた解析からHOIL-1LのNZFは主にNF-κB活性化に、SHARPINのNZFは主に細胞死抑制に機能することが明確となった。現在、論文投稿準備中である。

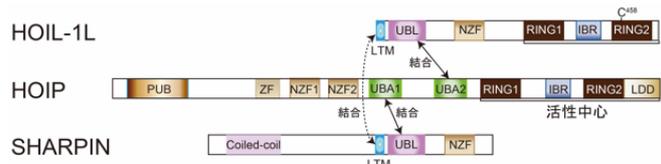


図2 LUBAC ユビキチンリガーゼの構造

本研究ではケミカルツールを用いて、機能が未同定であるHOIL-1LのNZFドメインの解析を推進した。そこで、領域の吉田と共同でHOIL-1L NZFとM1鎖との結合阻害のハイスループットスクリーニング系を作製し、同スクリーニング系でM1鎖とHOIL-1L NZFの結合を阻害する化合物を同定した。さらに2次スクリーニングを施行し、細胞内でM1鎖とHOIL-1L NZFの結合を阻害する2つの化合物を同定した。同定した2種の化合物のうち、1つはNF-κB活性化を抑制するが、細胞死を抑制しないこと、もう1つは細胞死を亢進させることを示した。2つの化合物が異なる特徴を示すのは、細胞死を亢進させる化合物はHOIL-1LのNZFだけではなく、SHARPINのNZFとM1鎖の結合を阻害するためであることを示した。これらの化合物を用いた解析からHOIL-1LのNZFは主にNF-κB活性化に、SHARPINのNZFは主に細胞死抑制に機能することが明確となった。現在、論文投稿準備中である。

2. ユビキチン修飾の新機能の解析

前述のNEMO以外にもUBANドメインを持つユビキチン結合タンパク質が同定されている。その中の1つであるABIN1はSLEの疾患感受性遺伝子であり、M1鎖に結合することでシグナル伝達を抑制することが示されているが、その分子メカニズムは明確ではなかった。そこで、ABIN1によるM1鎖依存的なシグナル伝達の抑制メカニズムの解析を推進した。その結果、ABIN1はToll様受容体(TLR)にリガンドが結合することでリン酸化され、リン酸化されることによってオートファジアダプターとして機能することを示した。さらに、TLRリガンド刺激はその下流のシグナル伝達分子群(MyD88, IRAK1など)のM1鎖修飾を誘導する。研究代表者はABIN1が刺激依存的にシグナル分子群を修飾するM1鎖を認識して、それらのシグナル分子群をオートファジーに導くことで刺激伝達を抑制することを明らかにした(図3)。マウスを用いた解析からMyD88シグナル伝達系はABIN1によるSLE発症に寄与していることが示されているので、本研究成果はABIN1がSLE発症に寄与する分子メカニズムの解明に繋がると考えられる。

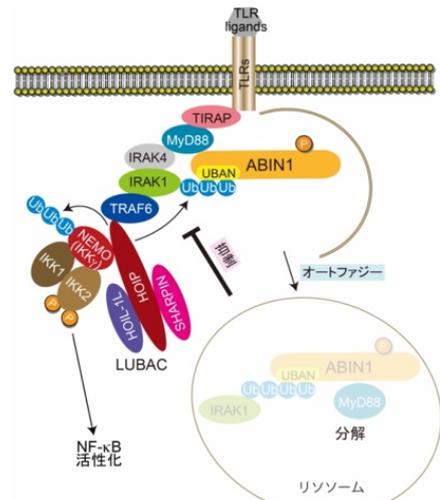


図3 ABIN1によるM1鎖依存的シグナル伝達抑制機構

3. ケモテクノロジーを用いたLUBACリガーゼの制御とその応用展開

研究代表者らはLUBAC活性増強がABC様のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(ABC-DLBCL)発症に関与することを示してしていたが(Cancer Discov. 2014)、その詳細な分子メカニズムは不明であった。加えて、代表者らのデータベース解析でヒトABC-DLBCLではLUBACの活性中心であるHOIPの発現が他のB細胞リンパ腫と比べて増加しており、ABC-DLBCLではLUBAC活性が増強していることが示唆された。そこで、疾患モデルマウスを作製してLUBACの活性亢進がDLBCL発症に寄与する分子メカニズムを解析した。その結果、LUBACの活性亢進はNF-κB活性化だけではなく、DNA損傷依存的な細胞死を抑制することでB細胞リンパ腫発症を促進していた。さらに、マウスの移植モデルを用いて、領域の吉田との共同研究で新たに同定したLUBAC阻害化合物がB細胞リンパ腫の増殖を抑制することを明らかにした。この結果は、LUBAC阻害剤が優れた抗がん剤である可能性を示した。



図4 LUBAC 阻害剤によるBリンパ腫の増殖抑制

本研究ではケミカルツールを用いて、機能が未同定であるHOIL-1LのNZFドメインの解析を推進した。そこで、領域の吉田と共同でHOIL-1L NZFとM1鎖との結合阻害のハイスループットスクリーニング系を作製し、同スクリーニング系でM1鎖とHOIL-1L NZFの結合を阻害する化合物を同定した。さらに2次スクリーニングを施行し、細胞内でM1鎖とHOIL-1L NZFの結合を阻害する2つの化合物を同定した。同定した2種の化合物のうち、1つはNF-κB活性化を抑制するが、細胞死を抑制しないこと、もう1つは細胞死を亢進させることを示した。2つの化合物が異なる特徴を示すのは、細胞死を亢進させる化合物はHOIL-1LのNZFだけではなく、SHARPINのNZFとM1鎖の結合を阻害するためであることを示した。これらの化合物を用いた解析からHOIL-1LのNZFは主にNF-κB活性化に、SHARPINのNZFは主に細胞死抑制に機能することが明確となった。現在、論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki Katsuhiko, Hayamizu Yoshie, Murakami Ryuji, Toi Masakazu, Iwai Kazuhiro	4. 巻 597
2. 論文標題 Linear ubiquitination induced necrotic tumor remodeling elicits immune evasion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14623	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 Shinkawa Yutaka, Imami Koshi, Fuseya Yasuhiro, Sasaki Katsuhiko, Ohmura Koichiro, Ishihama Yasushi, Morinobu Akio, Iwai Kazuhiro	4. 巻 596
2. 論文標題 ABIN1 is a signal induced autophagy receptor that attenuates NF B activation by recognizing linear ubiquitin chains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1147 ~ 1164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14323	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 Nitschke Silvia, Sullivan Mitchell A, et al.	4. 巻 145
2. 論文標題 Glycogen synthase downregulation rescues the amylopectinosis of murine RBCK1 deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 2361 ~ 2377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awac017	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 該当する
1. 著者名 Jo Tomoyasu, Nishikori Momoko, Kogure Yasunori, Arima Hiroshi, Sasaki Katsuhiko, Sasaki Yoshiteru, Nakagawa Tomoko, Iwai Fumie, Momose Shuji, Shiraishi Aki, Kiyonari Hiroshi, Kagaya Noritaka, Onuki Tetsuo, Shin-ya Kazuo, Yoshida Minoru, Kataoka Keisuke, Ogawa Seishi, Iwai Kazuhiro, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 136
2. 論文標題 LUBAC accelerates B-cell lymphomagenesis by conferring resistance to genotoxic stress on B cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 684 ~ 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019002654	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 Iwai Kazuhiro	4. 巻 288
2. 論文標題 Discovery of linear ubiquitination, a crucial regulator for immune signaling and cell death	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1060 ~ 1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15471	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 Futaki Shiroh, Arafiles Jan Vincent V., Hirose Hisaaki	4. 巻 49
2. 論文標題 Peptide-assisted Intracellular Delivery of Biomacromolecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1088 ~ 1094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200392	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 Fuseya Yasuhiro, Fujita Hiroaki, Kim Minsoo, Ohtake Fumiaki, Nishide Akira, Sasaki Katsuhiro, Saeki Yasushi, Tanaka Keiji, Takahashi Ryosuke, Iwai Kazuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 The HOIL-1L ligase modulates immune signalling and cell death via monoubiquitination of LUBAC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 663 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-020-0517-9	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 Sasaki Katsuhiro, Himeno Ai, Nakagawa Tomoko, Sasaki Yoshiteru, Kiyonari Hiroshi, Iwai Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Modulation of autoimmune pathogenesis by T cell-triggered inflammatory cell death	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11858-7	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 MacDuff Donna A., Baldrige Megan T., Qaqish Arwa M., Nice Timothy J., Darbandi Azad D., Hartley Victoria L., Peterson Stefan T., Miner Jonathan J., Iwai Kazuhiro, Virgin Herbert W.	4. 巻 92
2. 論文標題 H0IL1 Is Essential for the Induction of Type I and III Interferons by MDA5 and Regulates Persistent Murine Norovirus Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01368-18	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 該当する

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Iwai, K.
2. 発表標題 Regulation and function of LUBAC-mediated linear ubiquitination in immunity
3. 学会等名 The International Symposium in Tokyo 2022 “Ubiquitin New Frontier from Neo-Biology to Targeted Protein Degradation” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iwai, K.
2. 発表標題 Unexpected functions of H0IL-1L E3: regulation of LUBAC, glycogen metabolism and beyond
3. 学会等名 EMBO Workshop “Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in health and disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iwai, K.
2. 発表標題 Linear ubiquitination : a new regulator of chronic inflammation and oncogenesis
3. 学会等名 第44日本基礎老化学会大会 International Symposium “Mechanism of aging” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩井 一宏
2. 発表標題 直鎖状ユビキチン鎖の発見とその機能
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会シンポジウム 「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Futaki, S.
2. 発表標題 Attenuated cationic lytic peptides for intracellular delivery
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩井 一宏
2. 発表標題 LUBACの2つのユビキチンリガーゼ活性による免疫シグナル制御
3. 学会等名 第45回医用マスペクトル学会年会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井 一宏
2. 発表標題 直鎖状ユビキチン鎖：免疫疾患、がんに寄与する新規シグナル伝達系
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会 特別講演 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Futaki, S
2. 発表標題 Attenuated cationic lytic peptides for intracellular delivery
3. 学会等名 Controlled Release Society 2020 Annual Meeting & Exposition (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井 一宏
2. 発表標題 がん、免疫疾患を惹起するユビキチン・シグナリング系：ケミカルバイオロジーを用いた介入の可能性
3. 学会等名 日本生化学会 近畿地方会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学・大学院医学研究科・細胞機能制御学 http://www.mcp-kyoto-u.jp</p>

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
研究分担者	二木 史朗 (SHIROH FUTAKI) (50199402)	京都大学・化学研究所・教授 (14301)	ペプチド化学・ペプチド設計と精製

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
---------	---------