

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

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：22117002

研究課題名(和文) 翻訳後修飾によるNF- κ B活性化シグナルの制御機構と疾患発症との関連研究課題名(英文) Regulation of NF- κ B signaling by post-translational modifications and its relation to disease onsets

研究代表者

井上 純一郎(Inoue, Jun-ichiro)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70176428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 249,600,000円

研究成果の概要(和文)：1. p47はNEMOをリソゾームで分解させることでNF- κ Bを負に制御する。2: ヒト白血病ウイルスTaxによるNF- κ B活性化にはK63型ユビキチン鎖の形成が必須である。3: 悪性乳がんでは非がん幹細胞におけるNF- κ BがJAG1を発現誘導してがん幹細胞を刺激することで幹細胞を維持している。またNF- κ Bの恒常的活性化がTMOD1を発現誘導し癌の浸潤性を高める。4. RelB-Venusノックインマウスを作成しRelBを時空間的な活性化を解析するシステムを確立した。

研究成果の概要(英文)：1. p47 inhibits NF- κ B activation by inducing degradation of NEMO in lysosome. 2. NF- κ B activation by HTLV-1 Tax protein requires generation of K63-linked polyubiquitin chains. 3. NF- κ B activation in non-cancer stem cells induces expression of JAG1, which in turn stimulates cancer stem cells to increase stem cell population. NF- κ B activation also induces expression of TMOD1, which leads to induction of MMP13, a protease that degrades extracellular matrix. 4. RelB-Venus knock-in mice is a tool to analyze spatiotemporal regulation of RelB.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳後修飾 シグナル伝達 疾患 数理モデル 構造生物学 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

転写因子 NF- κ B は、通常その抑制因子 I κ B により細胞質に係留され不活性化されているが、サイトカイン等の活性化シグナルにより I κ B のリン酸化とそれに続く Lys48 型ポリユビキチン化により I κ B がプロテアソーム依存的に分解されることで、NF- κ B が核移行し標的遺伝子の発現が誘導される。また I κ B をリン酸化する I κ B kinase 複合体の活性化には、タンパク質の Lys63 型ポリユビキチン化を介したシグナル複合体形成が必要であると考えられている。さらに、近年、NEMO の直鎖型ポリユビキチン化が NF- κ B 活性化に関与することを報告された。しかし、これらポリユビキチン鎖を介した NF- κ B シグナルの制御機構については報告間で矛盾点も多く、解明すべき問題点が残されている。また、多様な腫瘍や疾患において、NF- κ B の活性化異常が発症や進行に関与していることが報告されているがその詳細な機構は明らかでない。さらに、本領域項目 A01 の他の計画班員が扱う経路においても未知の翻訳後修飾による制御機構の存在が予想され、その解明は新たなシグナル制御機構の解明につながる。

2. 研究の目的

以上の学術的背景をもとに、以下の研究目的を提唱する。

目的 (1) NF- κ B 活性化シグナルにおけるユビキチン化の役割と疾患発症との関連を解明する。

目的 (2) 成人 T 細胞白血病(ATL)の原因ウイルス HTLV-I の癌タンパク質 Tax による NF- κ B 活性化におけるユビキチン化の役割と白血病発症との関連を解明する。

目的 (3) 癌細胞における NF- κ B 恒常的活性化およびそれによる癌悪性化の分子機構を解明する。

目的 (4) NF- κ B 活性化シグナルを時空間的に可視化する技術基盤の開発する。

目的 (5) A01 他計画班員との共同研究としての質量分析を実施する (研究分担者尾山が担当)。

3. 研究の方法

上記目的ごとに方法を記載する。

(1) NF- κ B 活性化におけるユビキチン化の役割と疾患発症:活性化 IKK 複合体を細胞から精製し、質量分析によりその構成因子を同定する。それらの中から IKK の活性制御にユビキチンを介して関与するタンパク質を明らかにしその作用機構と疾患との関係を解明する。また A03 市川班と連携してのシグナル複合体形成の数理モデルをもとにした NF- κ B の活性化モデルを提唱する。

(2) HTLV-I Tax による NF- κ B 活性化の分子機構と白血発症: これまでに確立した無細胞系 Tax 依存的 IKK 活性化システムを用いて、活性化に関与する宿主因子を同定しユビキチン鎖の関与について解明する。

(3) NF- κ B 恒常的活性化と癌悪性化の分子機構: 悪性乳癌における恒常的 NF- κ B 活性化によって発現誘導される遺伝子の中で癌細胞の悪性化に関与するものを同定しその作用機構を解明する。

(4) NF- κ B 活性化シグナルの時空間的可視化: 作製した RelB-Venus ノックインマウスの細胞を用いて NF- κ B のサブユニットである RelB の刺激依存的挙動に関する時空間的解析系を確立し、細胞特異的な挙動について解明する。

(5) 領域内共同研究としての質量分析: 計画班が研究対象とするシグナルにおいて翻訳後修飾を介して制御する分子を質量分析により同定する。

4. 研究成果

研究目的ごとに成果を記載する。

(1) ポリユビキチン鎖を介し NF- κ B を負に制御する p47 の同定

NF- κ B の詳細な制御機構の解明のため、質量分析を担当する A01 尾山との連携で、活性化 I κ B キナーゼ(IKK)複合体に結合するタンパク質として p47 を同定した。p47 は UBA ドメインを介して Lys63 型や直鎖状ユビキチン鎖に結合する性質を持ち、刺激依存的にユビキチン化 NEMO (IKK 複合体の構成因子) に結合した。さらに p47 に結合した NEMO はリソゾームで分解され、NF- κ B の活性化が負に制御されることが明らかとなった (図 1)。従来の負の制御因子が活性化の持続時間を抑制するのに対して p47 は活性化のレベルを抑制する新たな制御機構を担う因子と考えられた。また、NF- κ B の恒常的活性化が腫瘍の生存に必須な ATL 腫瘍細胞において p47 の発現が抑制されていることを見出した。Shibata Y. et al. *Nat. Commun.* 3, 1061 (2012)。

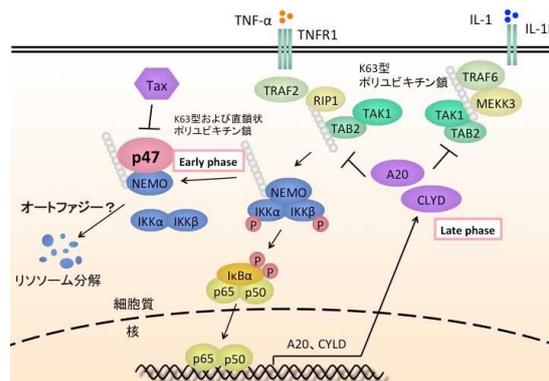


図 1: p47 による NF- κ B の抑制機構

また、市川班と連携して NF- κ B の核内濃度振動に関する 3D シミュレーションの成功した。Ohshima, D. et al. *PLoS ONE* 7:e46911(2012)

(2) Jurkat T 細胞の S-100 分画に Tax を加えると IKK の活性化が誘導されるのに対して S-100 から精製した IKK 複合体に Tax を加えても活性化は誘導されなかったことから Tax は IKK 以外の宿主細胞因子を要求することが明らかになった。また、Lys63 型ユビキチ

ン鎖の合成を抑制すると IKK 活性化が抑制されることから E2 として Ubc13 が関与することが明らかになったが E3 の分子種は種々の E3 欠損細胞を用いて解析したが同定できなかった。Shibata, Y. et al. *J. Biochem.* 150, 679-686 (2011).

(3) 悪性度の極めて高いトリプルネガティブ (TN) 型乳癌の癌幹細胞の維持における NF-κB 活性化の役割を解析した。その結果 TN 型乳癌の中の Basal 型乳癌では癌幹細胞の割合が NF-κB によって制御されていることを見出し、癌幹細胞自体の NF-κB 活性化が重要なだけでなく、周囲の非幹癌細胞の NF-κB 活性化が重要であることが明らかとなった。さらに解析を進め Notch シグナルのリガンドの 1 つである JAG1 が NF-κB 活性化により非癌幹細胞で発現誘導され、それが癌幹細胞の Notch を刺激することで癌幹細胞の自己複製が促進されていることを見出した (図 2)。

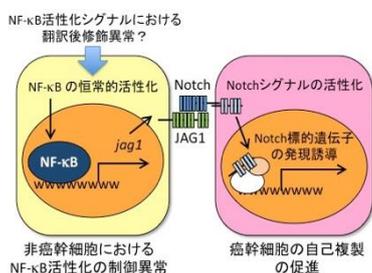


図 2: NF-κB による癌幹細胞維持機構

Yamamoto, M. et al *Nat. Commun.* 4, 2299 (2013).

また、乳癌細胞において NF-κB によって恒常的に発現誘導されている遺伝子として Tropomodulin 1 (TMOD1) を同定した。TMOD1 は β-Catenin を活性化することで細胞外マトリックスを分解する MMP13 を発現誘導し癌細胞の浸潤能を活性化することを明らかにした (図 3)。Ito-Kureha, T. et al. *Cancer Res.* 75, 62-72 (2015).

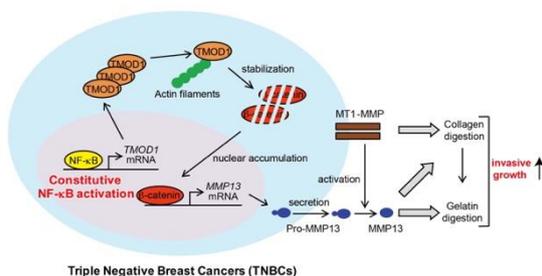


図 3: TMOD1 による乳癌細胞の悪性化モデル

(4) NF-κB の非定型経路で活性化される RelB の時空間的制御を解析するために RelB-Venus を RelB 遺伝子座から発現するノックイン (KI) マウスを作成した。KI マウスは、RelB 欠損マウスで見られるリンパ器官を中心とする異常が観察されないことから RelB-Venus 融合タンパク質は野生型 RelB と

機能的に等価であることが明らかとなった。KI マウスから種々の細胞を調製し、リンホトキシンや Tweak で刺激をすると RelB-Venus の核移行が観察された。即ち NF-κB の非定型経路の可視化に成功し今後 RelB の時空間的解析は可能になった。また、樹状細胞を解析したところ RelB⁺, RelB^{low}, RelB^{high} の 3 集団が存在し RelB^{low} では RelB が細胞質に RelB^{high} では核に移行していた。RelB^{low} はこれまでに報告されていない樹上細胞分化過程の中間段階の細胞集団と考えられる。Seki, T. et al. *J. Biochem.* 158, 485-495 (2015).

(5) 計画班との連携については、1) に記載した p47 の同定の他に、徳永班と新規直鎖状ユビキチン結合ドメインをプローブとした LUBAC 基質候補の探索、高橋班と Akt 以外のキナーゼによる Girdin リン酸化部位の同定など計 17 件の連携を進めた。公募班とは 5 年間で計 13 件の連携を進めた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 34 件)

1. Seki, T., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Miyauchi, M., Akiyama, N., Yamaguchi, N., Gohda, J., Akiyama, T. and Inoue, J. Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in *Relb-Venus* knock-in mice. *J. Biochem.* 158, 485-495 (2015). 査読有 doi: 10.1093/jb/mvv064
2. Shinzawa, M., Konno, H., Qin, J., Akiyama, N., Miyauchi, M., Ohashi, H., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H., Akiyama, T. and Inoue, J. Catalytic subunits of the phosphatase calcineurin interact with NF-κB-inducing kinase (NIK) and attenuate NIK-dependent gene expression. *Sci. Rep.* 5:10758 (2015). 査読有 doi: 10.1038/srep10758
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, 222-229 (2015). 査読有 doi:10.11.1038/nsmb.2970
4. Ito-Kureha, T., Koshikawa, N., Yamamoto, M., Semba, K., Yamaguchi, N., Yamamoto, T., Seiki, M. and Inoue, J. Tropomodulin 1 expression driven by NF-κB enhances breast cancer growth. *Cancer Res.* 75, 62-72 (2015). 査読有 doi: 10.1158/0008-5472
5. Yamaguchi, N., Oyama, M., Kozuka-Hata, H. and Inoue, J. Involvement of A20 in the molecular switch that activates the

- non-canonical NF- κ B pathway. *Sci. Rep.* 3, 2568 (2013). 査読有 doi:10.1038/srep02568
6. Yamamoto, M., Taguchi, Y., Ito-Kureha, T., Semba, K., Yamaguchi, N. and Inoue, J. NF- κ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat. Commun.* 4:2299 (2013). 査読有 doi: 10.1038/ncomms3299
 7. Oshima, D., Inoue, J. and Ichikawa, K. Roles of spatial parameters on the oscillation of nuclear NF- κ B: computer simulations of a 3D spherical cell. *PLoS ONE* 7(10):e46911 (2012). 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0046911
 8. Shibata Y., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Han, X., Tanaka, Y., Gohda, J. and Inoue, J. p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. *Nat. Commun.* 3:1061 (2012). 査読有 doi:10.1038/ncomms2068
 9. Hinohara, K., Kobayashi, S., Kanauchi, H., Simizu, S., Nishioka, K., Tsuji, E., Tada, K., Umezawa, K., Mori, M., Ogawa, T., Inoue, J., Tojo, A., and Gotoh, N. ErbB/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 6584-6589 (2012). 査読有 doi: 10.1073/pnas.1113271109
 10. Taguchi, Y., Kiga, Y., Gohda, J. and Inoue, J. Identification and characterization of anti-osteoclastogenic peptides derived from the cytoplasmic tail of RANK. *J. Bone Miner. Metab.* 30, 543-553 (2012). 査読有 doi: 10.1007/s00774-012-0353-5
 11. Sanada, T., Kim, M., Mimuro, H., Suzuki, M., Ogawa, M., Oyama, A., Ashida, H., Kobayashi, T., Koyama, T., Nagai, S., Shibata, Y., Gohda, J., Inoue, J., Mizushima T. and Sasakawa, C. The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. *Nature* 483, 623-626 (2012). 査読有 doi: 10.1038/nature10894.
 12. Shibata, Y., Tanaka, Y., Gohda, J., and Inoue, J. Activation of the I κ B kinase complex by HTLV-1 Tax requires cytosolic factors involved in Tax-induced polyubiquitination. *J. Biochem.* 150, 679-686 (2011). 査読有 doi: 10.1093/jb/mvr106
 1. 柴田佑里、井上純一郎「Analysis of HTLV-1 Tax-induced IKK activation pathway」KEYSTONE SYMPOSIA 2016/3/13-17. ブリティッシュコロンビア (カナダ)
 2. 関崇生、井上純一郎「非古典的 NF- κ B 経路の振動は標的遺伝子の転写を制御する」第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015/12/1-4 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
 3. 井上純一郎「転写因子 NF- κ B の制御メカニズムとその生理機能」数理医学研究会 第 51 回数理学セミナー 2015/11/25 大阪大学 (大阪府・大阪市)
 4. 柴田佑里、井上純一郎「HTLV-1Tax 誘導性の IKK 複合体活性化におけるポリユビキチン鎖の機能解析」日本 HTLV-1 学会学術集会 2015/8/22-23 東京大学医科学研究所 (東京都・港区)
 5. 井上純一郎「NF- κ B シグナルによる Triple negative 乳がんの悪性化」癌研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム 2015/1/27-28 一橋講堂 (東京都・千代田区)
 6. 井上純一郎「NF- κ B 活性化の時空間的制御機構の解明」第 37 回日本分子生物学会年会 2014/11/25-27 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 7. 井上純一郎「Tropomodulin 1 expression driven by NF- κ B enhances breast cancer growth」The 4th Japan-France Cancer Workshop 2014/11/19-21 関西セミナーハウス (京都府・京都市)
 8. 井上純一郎「NF- κ B, a key player in breast cancer development」1st Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecules 2014/8/28-29 昭和薬科大学 (東京都・町田市)
 9. 井上純一郎「HTLV-1 感染が仕掛ける巧妙な罠: Tax タンパク質」ATL シンポジウム 2014/5/24 高新文化ホール (高知県・高知市)
 10. 井上純一郎「転写因子 NF- κ B の活性制御機構とその破綻によるがんの悪性化」愛媛大学プロテオサイエンスセンター 第 1 回学術シンポジウム 2014/3/1 愛媛大学 (愛媛県・松山市)
 11. 関崇生、井上純一郎「RelB-Venus knock-in mice as a powerful tool of studying dynamic regulation of the non-canonical NF- κ B activation」Keystone Symposium 2014/2/23-28 コロラド (アメリカ)
 12. 柴田佑里、井上純一郎「HTLV-1 Tax による IKK 複合体活性化に必要な新規タンパク質の同定と解析」第 36 回日本分子生物学会年会 2013/12/3-6 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
 13. 関崇生、井上純一郎「核と細胞質の間で振動する転写因子 NF- κ B の活性制御」第

- 86 回日本生化学会大会 2013/9/11-13 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
14. 井上純一郎「翻訳後修飾による NF- κ B 活性化シグナルの制御と疾患発症との関連」第 65 回日本細胞生物学会大会 2013/6/19-21 ういんくあいち (愛知県・名古屋市)
 15. 井上純一郎「ポリユビキチン化を介した転写因子 NF- κ B の活性制御機構と疾患発症への関与」日本生化学会関東支部例会 2013/6/15 山梨大学 (山梨県・甲府市)
 16. 田口祐、井上純一郎「RANK Harbors the Specific Cytoplasmic Domain that Regulates Osteoclastogenic Signaling and Its Subcellular Localization」2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research 2013/5/28-6/1 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
 17. 井上純一郎「Critical roles of NF- κ B activation in breast cancer development」AACR-JCA Joint Conference 2013/2/21-25 マウイ (アメリカ)
 18. 柴田佑里、井上純一郎「p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO」第 35 回 日本分子生物学会年会 2012/12/11-14 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
 19. 井上純一郎「乳がん悪性化における転写因子 NF- κ B の役割」第 71 回 日本癌学会学術総会 2012/9/19-21 ロイトン札幌 (北海道・札幌市)
 20. 井上純一郎「核と細胞質の間で振動する転写因子 NF- κ B の生物学」日本応用数理学会 2012 年度年会 2012/8/28-9/2 稚内全日空ホテル (北海道・稚内市)
 21. 柴田佑里、井上純一郎「Identification and characterization of a novel inhibitory factor in NF- κ B activation pathway」2012 KEYSTONE SYMPOSIA 2012/3/18-23 ブリティッシュコロロンビア (カナダ)
 22. 井上純一郎「Critical roles of NF- κ B activation in breast cancer development」TGF- β Family: Signal Network in Biological Functions 2012/1/23-24 小柴ホール (東京都・文京区)
 23. 井上純一郎「Identification of p47 as a negative regulator of NF- κ B」第 34 回 日本分子生物学会年会 2011/12/13-16 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 24. 呉羽拓、井上純一郎「悪性乳癌における、造腫瘍能促進に関与する新規 NF- κ B 標的遺伝子の解析」第 70 回日本癌学会学術総会 2011/10/3-5 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
 25. 柴田佑里、井上純一郎「Identification of a novel inhibitory factor in NF- κ B activation pathway」TNF2011 13th International TNF

Conference 2011/5/15-18 淡路夢舞台 (兵庫県・淡路市)

26. 井上純一郎「Epigenetic Alteration of the NIK Gene is Involved in Enhanced NIK Expression in Basal-like Breast Cancer」Cincinnati Cancer Symposium Series 2011/5/2-4 シンシナティ (アメリカ)
27. 山本瑞生、井上純一郎「Paracrine role of transcription factor NF- κ B in generating breast cancer tumor initiating cells」KEYSTONE SYMPOSIA "Stem Cells, Cancer and Metastasis" 2011/3/6-11 キーストン (アメリカ)
28. 柴田佑里、井上純一郎「Identification of a novel inhibitory factor in NF- κ B activation」第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生物学会合同大会 2010/12/7-10 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
29. 日野原邦彦、井上純一郎「NF- κ B シグナルによる乳がん幹細胞制御」第 69 回日本癌学会学術総会 2010/8/22-24 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

[図書] (計 1 件)

1. 井上純一郎、武川睦寛 編集、Springer 出版、「Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling」2015

[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 : <http://shushoku-signal.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 純一郎 (INOUE Jun-ichiro)
 東京大学・医科学研究所・教授
 研究者番号 : 7 0 1 7 6 4 2 8

(2) 研究分担者

尾山 大明 (OYAMA Masaaki)
 東京大学・医科学研究所・准教授
 研究者番号 : 3 0 4 2 2 3 9 8

(3) 連携研究者

合田 仁 (GOHDA Jin)
 東京大学・医科学研究所・特任講師
 研究者番号 : 9 0 3 6 1 6 1 7

山口 憲孝 (YAMAGUCHI Noritaka)
 千葉大学・大学院薬学研究院・助教
 研究者番号 : 8 0 3 9 9 4 6 9

田口 祐 (TAGUCHI Yuu)
 東京大学・医科学研究所・助教
 研究者番号 : 2 0 5 4 9 4 7 2

