

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08259

研究課題名(和文) 新規免疫関連因子を足場とした細胞内シグナル制御の新解明

研究課題名(英文) Regulation of cellular signal transduction by novel immunological factor

研究代表者

及川 大輔(Oikawa, Daisuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20455330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：LRBAはBEACH(Beige and Chediak-Higashi)ファミリーに属する約320kDaの巨大タンパク質で、B細胞機能異常を伴う免疫不全症の一つであるCVID(分類不能型免疫不全症)の原因遺伝子としても報告される。本研究では、申請者が独自に見出したLRBAの生理機能として「IFN経路の制御」に着目して解析を進め、ウイルス感染実験によりLRBAによるIFN経路制御について精査し、新規結合因子を同定した。今後、これらの知見をさらにブラッシュアップさせ、研究論文の発表へと繋げていきたい。

研究成果の概要(英文)：LRBA gene codes a 320 kDa, BEACH (Beige and Chediak-Higashi) family protein, and reported as a CVID (common variable immunodeficiency) related gene. Here, we focused on the regulation of IFN pathway by the LRBA, and identified that the LRBA negatively regulates poly I:C or SeV mediated IFN-activation. Also, we identified several LRBA-binding proteins to reveal its regulating mechanism. Further studies would be needed to publish these new insight.

研究分野：細胞生物学

キーワード：LRBA IFN経路

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属研究室では、2006年に「直鎖状ポリユビキチン鎖」という全く新しいタイプのポリユビキチン鎖を見出し(EMBO J 2006)、その分子機構や生理機能について研究を進めてきた。結果、直鎖状ポリユビキチン鎖形成を担う複合体を同定し(LUBAC; linear ubiquitin chain assembly complex: Nat Cell Biol 2003; Mol Cell 2005; Nat Cell Biol 2009)、このポリユビキチン鎖がNF- $\kappa$ B経路を中心とした免疫制御に必須であること、さらには、その遺伝子異常が慢性皮膚炎やB細胞リンパ腫などの疾患原因となることを示してきた(Nature 2011; EMBO J 2012)。

研究代表者は2013年4月に当研究室に赴任し、研究室のメインテーマである直鎖状ポリユビキチン鎖に関する研究に従事してきた。研究開始当初、研究代表者は、このLUBACに結合する新規因子としてLRBAを同定し、その細胞機能について研究を進めた。

### 2. 研究の目的

LRBAはBEACH(Beige and Chediak-Higashi)ファミリーに属する約320kDaの巨大タンパク質で、過去にLPS誘導性や免疫細胞での発現が報告されたことから、新規の免疫因子と想定される。2012年には、LRBAがB細胞機能異常を伴う免疫不全症の一つであるCVID(分類不能型免疫不全症)の原因遺伝子としても報告され、さらにはCTLA4タンパク質を制御しアパタセプト(CTLA4-Ig)に対する治療効果に影響を示すことが明らかにされるなど、現在、大きな注目を集める新規の免疫制御因子である。しかしながら、その本質的な生理機能は全く分かっていない。研究代表者はこれまで、LRBAを新規LUBAC結合因子として同定し、複数の細胞シグナルと関連することを見出してきた。これを受け本研究では、特に疾患発症・進展との密接な関連が想定されるNF- $\kappa$ B経路、細胞死、B細胞分化の3経路に着目し、LRBAとの分子連関・動的制御の分子機構解明を進める。NF- $\kappa$ B経路と細胞死制御に関しては、当研究期間内で各経路におけるLRBAの具体的な作用点(タンパク質因子)を特定し、その制御機序の実体解明を進める。また、B細胞分化に関しては、LRBA-KOマウスの解析を通じてその生理機能を明らかにし、また、その異常に伴うCVIDの発症の分子機構に迫る。

### 3. 研究の方法

#### (i) LRBAによるNF- $\kappa$ B制御の分子機構解析

本項目では、LRBAによるNF- $\kappa$ B制御に関して、新規結合因子の探索や細胞レベルの解析を進める。

LRBAはB細胞を含む免疫細胞において重要な機能を発揮すると想定されるが、一般的に用いる培養細胞では、免疫組織で特異的に発現するタンパク質因子を網羅したスクリーニングの実施は難しい。この問題を克服するため本項目では、コムギ抽出液による*in vitro*合成系とタンパク質アレイを利用したゲノムワイドなスクリーニングを実施する。アッセイ系におけるLRBAタンパク質の合成手法は既に確立済みであり、ライブラリーとして利用するアレイタンパク質についても、共同研究を通じて2万以上の遺伝子を網羅したものを利用予定である。愛媛大学の澤崎教授と連携しスクリーニングを実施することで、候補タンパク質を同定し、LRBAとの相互作用を免疫沈降法など細胞レベルの解析により確認・評価する。

研究初年度は、各因子とLRBAの相互作用を免疫沈降法などで評価するほか、単独あるいはLRBAと同時に過剰発現した場合、あるいはsi-RNA等で発現を抑制した場合のNF- $\kappa$ B経路の動態を、ルシフェラーゼアッセイやNF- $\kappa$ Bターゲット因子のqPCR、NF- $\kappa$ Bシグナル関連因子のリン酸化や分解・切断により評価する。これらの解析の結果、LRBAとの相関が見られるものについて、CRISPR/Cas9法によりKO細胞、及び野生型や変異型を入れ戻した細胞を構築し、次年度へ向けて解析を進め、シグナル経路におけるLRBAの作用点を特定し、具体的な分子機構の解析に着手する。また、組換えタンパク質を用いた*in vitro*解析系を中心に、LRBA制御における各因子の重要ドメインの評価も進める。

#### (ii) LRBAによる細胞死制御の分子機構解析

本項目では、LRBAを介した細胞死制御の分子機構の解析のため、まずは、LRBAと相互作用する細胞死実行因子の探索を免疫沈降法により進める。具体的には、TNF刺激をモデルとしてcomplex IIの構成因子であるFADDやRIP1、Caspase8など、complex IのRIP1やTRADD、cIAPやTRAFsなどとの相互作用について検討する。また、LRBA KO細胞を用いて、complex Iやcomplex II自体の形成動態(Nat Rev Mol Cell Biol. 2013)の他、cFLIPなど細胞死と関連する因子の動態を評価する。これらの解析の結果、LRBAの有無や細胞生存率との相関が見られるものについて、CRISPR/Cas9法によりKO細胞、及び野生型や変異型を入れ戻した細胞を構築し、具体的な分子機構の解析に着手する。LRBAとの同時破壊により、その制御がキャンセルされるかなど、主にLRBAとの相乗的な機能に主眼を置いて解析を進めるほか、TNF以外の刺激(HT1080細胞でのFas刺激による細胞死など)についても、同様の現象が見られるかなどについて検討する。

#### (iii) B細胞成熟過程におけるLRBAの生理機能解析

本項目ではLRBA-KOマウスの解析を通じて、B細胞形成におけるLRBAの生理機能に迫る。既にCRISPR/Cas9法により構築済みの

LRBA ヘテロ欠失マウスからホモ欠失体を確立し、まずは、個体レベルでの評価を進め、血清中グロブリン値の低下など、ヒトで見られた CVID 様病態の再現や、新たな CVID モデルマウスとしての有用性を確認する。また、B 細胞を含む各種免疫細胞の分化・発達段階を評価するとともに、B 細胞や T 細胞、マクロファージの刺激応答性等について評価する。さらに、成熟 B 細胞から Germinal Center B 細胞、あるいは形質細胞やメモリー B 細胞への分化段階に着目 (*Am J Hum Genet.* 2012) し、これらが LRBA の欠損によりどう変化するか、また、その変化がどのようなシグナル経路の異常により生じるのかについて、特に Blimp1 や AKT-Foxo1 経路、autophagy に着目して解析を進める。

#### 4. 研究成果

##### (i) LRBA による NF- $\kappa$ B 制御の分子機構解析

まず始めに、LRBA と NF- $\kappa$ B 経路との関連性について調べたところ、LRBA の過剰発現により NF- $\kappa$ B 経路が僅かに活性化する一方、ノックダウンでは NF- $\kappa$ B 経路が一部抑制されること、さらに、LUBAC との共導入により相乗的に NF- $\kappa$ B 経路を活性化することから、部分的にはあるが、LRBA は NF- $\kappa$ B 経路を正に制御すると考えられた。

また、NF- $\kappa$ B 制御に関与する可能性のある LRBA の新規結合因子として、TRIM31 や RNF126 などを同定した。TRIM31 は、RING-Finger、B-box、Coiled-coil の 3 つのモチーフで特徴付けられる TRIM ファミリーの一員で、ユビキチン鎖を合成する E3 活性を保持し、IFN に応答することなどが報告されている (*Cell Biol Int* 2011)。RNF126 も RING-Finger ドメインを有する E3 であり、K48 ユビキチン鎖を合成することで特定のタンパク質分解に関与することも報告されている (*Mol Cell* 2014)。研究代表者は、この RNF126 が LRBA の他に LUBAC と結合することを見出し、両者の機能を結びつけるキーファクターとして機能する可能性が高い。

##### (ii) LRBA による細胞死制御の分子機構解析

さらに研究代表者は、LRBA と細胞死経路との関連性についても解析を進めた。CRISPR/Cas9 法を用いて HeLa 細胞や 293T 細胞において LRBA を破壊すると、TNF $\alpha$  により誘導される Caspase-3、8、PARP などのアポトーシス関連因子の切断パターンや、細胞生存率にも大きな変化が見出された。よって、LRBA はこのような細胞死の制御にも関わり得ると考えられる。

##### (iii) B 細胞成熟過程における LRBA の生理機能解析

まずは、B 細胞株の一つである BJAB 細胞で解析を進めたところ、LRBA 破壊 (CRISPR/Cas9 法) によって、NF- $\kappa$ B 経路に

大きな変化は見られないものの、B 細胞の最終分化において重要な転写因子 Blimp1 の誘導が減弱することを見出した。

同様に CRISPR/Cas9 法により LRBA-KO マウスも作成し、種々の解析を進めた。結果、これまで報告されているヒトの場合とは異なり、マウスにおいて LRBA 遺伝子を欠損させても、 $\gamma$ -グロブリン値の低下は認められず、また、抗体産生に重要な腎臓の組織化学解析においても特に大きな異常は認められなかった。これらの結果は、本研究の進行中に発表された、Goodnow ら (*Immunol Cell Biol.* 2017) や Jung ら (*Immunol Cell Biol.* 2017) の報告とも一致し、LRBA-KO マウスはヒト免疫疾患モデルとしては利用出来ないことを示している。

##### (iv) LRBA による IFN- $\beta$ 経路の制御

さらに、構築した各種ツールを用いて種々の解析を進めた結果、LRBA が IFN- $\beta$  経路に対して抑制的に機能する可能性を見出した。polyI:C による IFN- $\beta$  経路の活性化が、LRBA-KO 細胞では亢進し、入れ戻し細胞では親細胞と同程度まで抑制されることを、ルシフェラーゼアッセイや qPCR、シグナル解析などにより確認した。また、広島大学の福士雅也先生との共同研究により、LRBA-KO 細胞に RNA ウイルスの一種であるセンダイウイルス (SeV) を感染させ、IFN- $\beta$  経路の応答性を評価したところ、LRBA-KO 細胞において IFN- $\beta$  の分泌が大きく亢進することが新たに見出された。

その分子基盤の解明に向けて、免疫沈降法などにより結合因子の探索を進めた。結果、LRBA が RNA ウイルスセンサーである RIG-I-like receptor (RLR) と結合すること、さらに、それとは異なるドメインを介して脱リン酸化酵素とも結合し、RLR に脱リン酸化酵素をリクルートすることで、シグナル伝達を負に制御する可能性を見出した。さらに、LRBA と非常によく似たドメイン構造を有し、脳特異的に発現している NBEA (Neurobeachin) も、RIG-I-like receptor (RLR) と結合し、IFN- $\beta$  経路に対して抑制的に機能することを見出した。

#### 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 14 件)

1. Hattori M, Ishikawa O, Oikawa D, Amano H, Yasuda M, Kaira K, Ishida-Yamamoto A, Nakano H, Sawamura D, Terawaki S, Wakamatsu K, Tokunaga F, Shimizu A. In-frame Val216-Ser217 deletion of KIT in mild piebaldism causes aberrant secretion and SCF response. *J Dermatol Sci.* in press. (査読有)
2. Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, Wanibuchi

- H. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for DZIP3. *Monoclon Antih Immunodiagn Immunother.* in press. (査読有)
3. Kuriyama Y, Hattori M, Mitsui T, Nakano H, Tokunaga F, Oikawa D, Ishikawa O, Shimizu A. Generalized verrucosis caused by various human papillomavirus in a patient with GATA2 deficiency. *J Dermatol.* 45: e108-109, 2017. (査読有)
  4. Hattori M, Shimizu A, Oikawa D, Kamei K, Kaira K, Ishida- Yamamoto A, Nakano H, Sawamura D, Tokunaga F, Ishikawa O. ER stress in the pathogenesis of pretibial dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol.* 177: e92-93, 2017. (査読有)
  5. Goto E, Tokunaga F. Decreased linear ubiquitination of NEMO and FADD on apoptosis with caspase-mediated cleavage of HOIP. *Biochem Biophys Res Commun.* 485: 152-159, 2017. (査読有)
  6. Yamamotoya T, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Fukushima T, Yamazaki H, Kaneko S, Fujishiro M, Kikuchi T, Kushiya A, Tokunaga F, Asano T, Sakoda H. Reduced SHARPIN and LUBAC Formation May Contribute to CCl<sub>4</sub>- or Acetaminophen-Induced Liver Cirrhosis in Mice. *Int J Mol Sci.* 18: 326, 2017. (査読有)
  7. Shibata Y, Tokunaga F, Goto E, Komatsu G, Gohda J, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi H, Sawasaki T, Inoue S, Oshiumi H, Seya T, Nakano H, Tanaka Y, Iwai K, Inoue JI. HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathog.* 13: e1006162, 2017. (査読有)
  8. Omura H, Oikawa D, Nakane T, Kato M, Ishii R, Ishitani R, Tokunaga F, Nureki O. Structural and Functional Analysis of DDX41: a bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. *Scientific Reports.* 6: 34756, 2016. (査読有)
  9. Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Izumi T, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, Tokunaga F. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Communications.* 7: 12547, 2016. (査読有)
  10. Kumanomidou T, Nishio K, Takagi K, Nakagawa T, Suzuki A, Yamane T, Tokunaga F, Iwai K, Murakami A, Yoshida Y, Tanaka K, Mizushima T. The Structural Differences between a Glycoprotein Specific F-Box Protein Fbs1 and Its Homologous Protein FBG3. *PLoS One.* 10: e0140366, 2015. (査読有)
  11. Matsunaga Y, Nakatsu Y, Fukushima T, Okubo H, Iwashita M, Sakoda H, Fujishiro M, Yamamotoya T, Kushiya A, Takahashi S, Tsuchiya Y, Kamata H, Tokunaga F, Iwai K, Asano T. LUBAC Formation Is Impaired in the Livers of Mice with MCD-Dependent Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mediators Inflamm.* 2015: 125380, 2015. (査読有)
  12. Sato Y, Goto E, Shibata Y, Kubota Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Inoue J, Takekawa M, Tokunaga F, 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)
  13. Iwawaki T, Akai R, Oikawa D, Toyoshima T, Yoshino M, Suzuki M, Takeda N, Ishikawa T, Kataoka Y, Yamamura K. Transgenic mouse model for imaging of interleukin-1 $\beta$ -related inflammation *in vivo*. *Scientific Reports.* 5: 17205, 2015. (査読有)
  14. Kato M, Shimizu A, Yokoyama Y, Kaira K, Shimomura Y, Ishida-Yamamoto A, Kamei K, Tokunaga F, Ishikawa O. An autosomal recessive mutation of DSG4 causes monilethrix through the ER stress response. *J Invest Dermatol.* 135: 1253-1260, 2015. (査読有)
- [学会発表](計15件)
1. Oikawa D, Hanada K, Terawaki S, Sakamoto S, Tokunaga F. Characterization of a novel LUBAC inhibitor, HOIPIN-1 Keystone Symposium; Ubiquitin Signaling. (2018)
  2. 及川大輔 新規 LUBAC 阻害剤、HOIPIN-1 の機能評価と病態抑制効果 第1回ユビキチン研究会(2018)
  3. 及川大輔、葛谷早喜子、花田和希、寺脇正剛、鶴田大輔、坂本信二、徳永文稔 直鎖状ユビキチン鎖生成酵素(LUBAC)に対する新規阻害剤の細胞・生化学機構と疾患治療への応用 ConBio2017 (2017)
  4. 葛谷早喜子、及川大輔、徳永文稔 NDP52 のユビキチン結合性は NF- $\kappa$ B と細胞死制御に關与する ConBio2017 (2017)
  5. 及川大輔、花田和希、寺脇正剛、葛谷早喜子、菅原弘二、鶴田大輔、坂本信二、徳永文稔 直鎖状ユビキチン鎖生成酵素(LUBAC)に対する新規阻害剤による NF- $\kappa$ B 制御と疾患応用を目指した基礎解析 第12回臨床ストレス応答学会 (2017)
  6. 及川大輔、徳永文稔 マイトファジーアダプター(NDP52)のユビキチン結合性は NF- $\kappa$ B と細胞死制御に關与する 第64回日本生化学会 近畿支部例会 (2017)
  7. 葛谷早喜子、及川大輔、徳永文稔 マイトファジー受容体のユビキチン結合性は NF- $\kappa$ B と細胞死制御に關与する バイオインターフェース先端マテリアルの創生 第7回シンポジウム (2017)
  8. 及川大輔、中澤世識、石井亮平、綾木孝、石谷隆一郎、伊東秀文、濡木理、徳永文稔 Optineurin 遺伝子変異に伴う ALS 発症における直鎖状ポリユビキチン鎖の寄与 第494

- 回大阪市医学会 (2016)
9. Mai Hattori, Akira Shimizu, Hiroo Amano, Osamu Ishikawa, Takeki Mitsui, Kyoichi Kaira, Daisuke Oikawa, Fuminori Tokunaga, Hajime Nakano, Daisuke Sawamura. Generalized verrucosis caused by a GATA2 deficiency 日本研究皮膚科学会 (2015)
10. 阿部貴則、及川大輔、高橋宏隆、澤崎達也、徳永文稔 直鎖状コピキチン鎖産生酵素(LUBAC)の新規調節因子の同定と免疫・炎症制御 BMB2015 (2015)
11. 及川大輔、中澤世識、石井亮平、綾木孝、石谷隆一郎、伊東秀文、濡木理、徳永文稔 Optineurin 遺伝子変異に伴う ALS 発症における直鎖状ポリコピキチン鎖の寄与 第 10 回臨床ストレス応答学会 (2015)
12. 服部麻衣、清水晶、石川治、及川大輔、徳永文稔、解良恭一、三井健揮、中野創、澤村大輔 GATA2 遺伝子変異による generalized verrucosis 発症メカニズムの検討 第 66 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 (2015)
13. 服部麻衣、清水晶、加藤円香、天野博雄、山本明美、中野創、澤村大輔、及川大輔、亀井希代子、徳永文稔、石川治 表皮基底層に VII 型コラーゲン沈着が見られた優性栄養障害型表皮水泡症(前脛骨型)の 1 例 第 62 回北関東医学会総会 (2015)
14. 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 による直鎖状ポリコピキチン鎖結合を介した NF- $\kappa$ B とアポトーシス制御 第 67 回日本細胞生物学会 (2015)
15. 赤井良子、及川大輔、豊嶋孝恵、吉野麻由子、岩脇隆夫 IL-1 $\beta$  の分子制御を利用した炎症可視化モデルマウスの開発 第 11 回日本疲労学会 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 3 件)

名称：酸化ストレスインジケーター発現用核酸構築物とその使用  
 発明者：岩脇隆夫、及川大輔  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：2666857  
 取得年月日：2016/08/31  
 国内外の別：国外(EP)

名称：酸化ストレスインジケーター発現用核酸構築物とその使用  
 発明者：岩脇隆夫、及川大輔  
 権利者：同上  
 種類：特許

番号：5988101  
 取得年月日：2016/08/19  
 国内外の別：国内  
 名称：酸化ストレスインジケーター発現用核酸構築物とその使用  
 発明者：岩脇隆夫、及川大輔  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：ZL201280005929.2  
 取得年月日：2016/08/31  
 国内外の別：国外(CN)

〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://osaka-cu-1seika.umin.jp>

6. 研究組織
- (1)研究代表者  
 及川 大輔 (OIKAWA, Daisuke)  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
 研究者番号：20455330
- (2)研究分担者  
 徳永 文稔 (TOKUNAGA, Fuminori)  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：00212069
- (3)連携研究者  
 澤崎 達也 (SAWASAKI, Tatsuya)  
 愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授  
 研究者番号：50314969
- (4)研究協力者