

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15210

研究課題名(和文)炎症・免疫シグナルを制御する新規脱ユビキチン化酵素の同定と阻害剤探索

研究課題名(英文) Identification of deubiquitinases, which regulate inflammatory and immune signaling pathways, and screening for their inhibitors

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脱ユビキチン化酵素(DUB)はユビキチン修飾を介した生理機能発現を負に制御するプロテアーゼで、ヒトでは約100種存在する。本研究では我々が同定したLUBACユビキチンリガーゼを介したNF- κ Bシグナル抑制に關与するDUBの機能を解析した。その結果、LUBACはTNF- α 誘導性アポトーシスに伴ってHOIPサブユニットが限定分解を受け、そのN末端側断片にNF- κ B活性を抑制するDUBであるOTULINやCYLD-SPATA2複合体が結合すること、一方、C末端側断片はユビキチンリガーゼ活性を保持し、アポトーシスの過程で基質タンパク質(FADDやNEMO)の直鎖状ユビキチン化が減弱することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The deubiquitinating enzymes (DUBs) are proteases to antagonize ubiquitin modification system, and human genome encodes ~100 DUBs. In this study, we tried to identify DUBs, which regulate LUBAC- and linear ubiquitination-mediated NF- κ B activation pathway. We found that HOIP is predominantly cleaved by caspase upon TNF- α -induced apoptosis. The N-terminal fragment of HOIP binds with DUBs, such as OTULIN and CYLD-SPATA2. In contrast, the C-terminal fragment of HOIP retains NF- κ B activity, and linear ubiquitination of NEMO and FADD decreases upon apoptosis. These results indicate that caspase-mediated cleavage of HOIP divides critical functional regions of HOIP, and that this regulates linear (de)ubiquitination of substrates upon apoptosis.

研究分野：医化学一般

キーワード：酵素 タンパク質 細胞・組織 シグナル伝達 生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

ユビキチンは3種の酵素活性(E1、E2、E3)によって標的タンパク質に付加される翻訳後修飾因子で、多様な連結様式のポリユビキチン鎖を生成することで、タンパク質分解、シグナル伝達、DNA修復、エンドサイトーシスなど多彩な生理機能を調節する。研究代表者は、HOIL-1L、HOIP、SHARPINのサブユニットからなるユビキチンリガーゼ複合体(LUBAC)がユビキチンのN末端を介して新規「直鎖状ユビキチン鎖」を生成し、免疫や炎症応答に中枢的な役割を果たすNF- κ Bシグナル経路を活性化することを見出した(Tokunaga F. *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2009; Tokunaga F. *et al.*, *Nature*, 2011)。さらに、この経路を抑制する脱ユビキチン化酵素(DUB)として、A20とCYLDを同定し、A20はC末端ZF7領域が直鎖状ユビキチンに特異的に結合することでNF- κ B活性化を強く抑制することを示した(Tokunaga F. *et al.*, *EMBO J.*, 2012)。また、CYLDがK63と直鎖状ユビキチン鎖の両方を分解する構造基盤とシグナル伝達への影響を解明した(Sato Y. *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.*, 2015)。

現在、DUBによる脱ユビキチン化はシグナル伝達制御に重要であることが広く認識され、創薬の標的となっている。ヒトには約100種の脱ユビキチン化酵素(DUB)が存在し、ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH)、ubiquitin-specific protease (USP)、ovarian tumour protease (OTU)、Josephins、JAB1/MPN/MOV34 (JAMM/MPN+)に分類されている。UCH、USP、OTU、JosephinsはCysプロテアーゼであるが、JAMM/MPN+ファミリーは亜鉛(金属)プロテアーゼである。我々は独自にヒト全DUBのcDNAをクローニングするなど準備を進めてきた。これまで、直鎖状ユビキチン鎖生成を介するNF- κ B活性化を抑制するDUBとしては、我々も解析したA20、CYLDに加えてKomanderらによって同定されたOTULIN(Keusekotten K *et al.*, *Cell.*, 2013)が存在するが、NF- κ B経路やIFN産生経路を制御するDUBの網羅的な探索は、今後の重要課題である。

2. 研究の目的

我々は、ヒト脱ユビキチン化酵素cDNA全種を独自に調整しており、本研究ではこれらの中から炎症・免疫シグナル制御に深く関連する新規DUBを同定し、その阻害剤を探索することを目的とする。特に、ヒト全DUBからNF- κ B経路とインターフェロン(IFN)産生経路の制御に関わるものの同定を目指し、LUBACによる直鎖状ユビキチン鎖生成を介したNF- κ B抑制に関与するDUBを網羅的に探索する。さらに、同定されたDUBに対する阻害性化合物を探索し、生化学・細胞生物学的に解析する。これらの研究から、炎症・免疫シグナルに關与する新規因子を同定し、その阻害剤同定から新たな研究試薬及び将来的な創薬シーズを見出すことを到達目標とする。

学・細胞生物学的に解析する。これらの研究から、炎症・免疫シグナルに關与する新規因子を同定し、その阻害剤同定から新たな研究試薬及び将来的な創薬シーズを見出すことを到達目標とする。

3. 研究の方法

我々が独自に調整したヒト全DUB cDNAを用いて、NF- κ B、MAPキナーゼ、IFN産生経路など炎症・免疫シグナルを制御するDUBをルシフェラーゼ法にて探索する。制御活性化が認められたDUBは、ユビキチン鎖分解特性やドメイン機能を解析し、シグナル伝達制御の分子基盤を解明する。さらに、DUB活性を抑制する化合物をアルファスクリーン法にて探索し、化合物展開することで、より選択的で阻害効果が高く、細胞毒性の低い化合物を選択する。

4. 研究成果

(1) optineurin(OPTN)の直鎖状ユビキチン結合性とその不全による筋萎縮性側索硬化症

OPTNは、NF- κ B活性化経路において重要な酵素であるI κ Bキナーゼの制御因子(NEMO)に高い相同性を示すタンパク質で、NF- κ B活性やインターフェロン産生経路を抑制すること、オートファジー(細胞内の自食作用)を制御すること、細胞内膜輸送に関わることなどが報告されている。さらに、OPTN遺伝子の変異は、原発開放隅角緑内障(POAG)や筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患を引き起こすことが報告されている。しかし、OPTNがなぜ二つの異なる疾患を発症するのか、そのメカニズムについては不明である。そこで、我々はこれまでに見出されたPOAGを発症する変異体(6種)とALSを発症する変異体(5種)を作製し、包括的にNF- κ B活性制御や直鎖状ユビキチン鎖結合との連関を解析した(図1A)。

その結果、POAG型OPTN変異体は野生型同様、強くNF- κ B活性を抑制するが、ALS型変異体の多くはNF- κ B活性抑制能を喪失していることを突き止めた(図1B)。これらは、UBANドメインの欠損やアミノ酸置換に起因しており、OPTNのNF- κ B阻害活性にUBANドメインが重要であり、その機能破綻がALS発症に関連することが示唆された。そこで、UBANドメインと直鎖状ユビキチン鎖との結合を明らかにするため、共結晶構造解析を行った。その結果、オプチニューリンのUBANドメインは二量体を形成し、その両側に直鎖状ユビキチンが結合していることを見出した(図1C)。さらに、ALS患者で変異がみられたE478は直鎖状ユビキチン結合に重要なアミノ酸であることが示された。

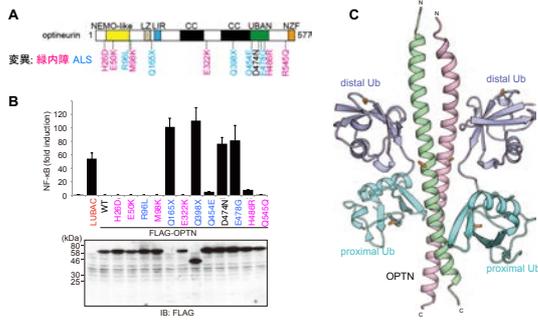


図1 OPTNによるNF-κB阻害と直鎖状ユビキチン鎖結合 (A)OPTNのドメイン構造と疾患を引き起こす変異。(B)LUBACによるNF-κB活性化に対するOPTNの影響。(C)OPTN-UBANドメインと直鎖状ユビキチンとの共結晶構造。

この結果は、**OPTNの直鎖状ユビキチン結合能の喪失がALS発症を引き起こす**可能性を示唆する。実際に、OPTN遺伝子変異(Q398XやE478G変異)を伴うALS患者由来の運動ニューロンの病理染色を行ったところ、これらの患者由来標本では直鎖状ユビキチンや活性型NF-κB因子(リン酸化p65)が細胞質凝集体に染色されることが見出され(図2)、細胞死の指標である活性型カスパーゼ3の染色も亢進していた。

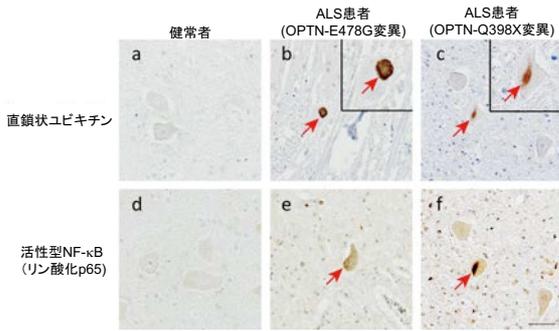


図2 ALS患者で見られる直鎖状ユビキチン鎖陽性の凝集体 (a-c)直鎖状ユビキチン鎖のシグナル (d-f)活性型NF-κBのシグナル

これらの結果から、OPTNは生理的にはNF-κB活性やアポトーシスを抑制し、細胞の生死に関わる重要なシグナル伝達経路を制御することが示された(図3左)。一方、ALSを引き起こすOPTN変異では、直鎖状ユビキチン鎖に結合できないためNF-κB活性が恒常的に亢進すると考えられる。このため、患者の運動ニューロンでは、直鎖状ユビキチンや活性型NF-κB因子(P-p65)がサイトゾル凝集体に蓄積し、細胞死(アポト

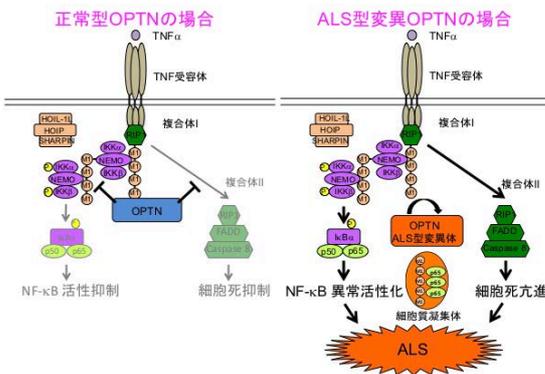


図3 OPTNによる細胞死シグナル制御とALSへの関与 (左)正常型OPTNによるシグナル制御(右)ALS型変異によるOPTNの機能破綻と、NF-κB活性・細胞死の亢進、直鎖状ユビキチン鎖陽性細胞質凝集体の形成

ーシス反応)も亢進すると示唆された(図3右)。本研究から**OPTNの機能不全によって神経炎症の持続的亢進と神経細胞死の促進が起こり、これがALS発症に関わる**可能性が示された。本研究からタンパク質分解ではなく、炎症惹起に関わる「直鎖状ユビキチン鎖」がサイトゾル凝集体に局在し、神経細胞死に関わるという全く新しい知見を得た。本研究は、ALS発症の新たな細胞機構を示したものといえ、Nature Communications誌(文献10)に掲載され、読売新聞でも紹介された。

(2)LUBACのアポトーシスにおける分子切断と機能制御

LUBACは、炎症性サイトカイン(TNF-α)によって引き起こされる外因性アポトーシスの過程で、HOIPがカスパーゼによって限定分解を受け、これに伴ってN末端部の脱ユビキチン化酵素(DUB)結合部位を含む活性抑制的領域とC末端部ユビキチンリガーゼ領域に分割されることを見出した。N末端領域では、NF-κB活性を抑制するDUBであるOTULINやCYLD-SPATA2複合体に結合し、基質であるNEMOやFADDの脱ユビキチン化を亢進することを見出した。一方、C末端領域はユビキチンリガーゼ活性を保持し、FADDがLUBACの新規基質であり、アポトーシスの過程でこれら基質タンパク質の直鎖状ユビキチン化が減弱することを見出した(図4)。本研究は、Biochem Biophys Res Commun誌に発表した(文献6)。

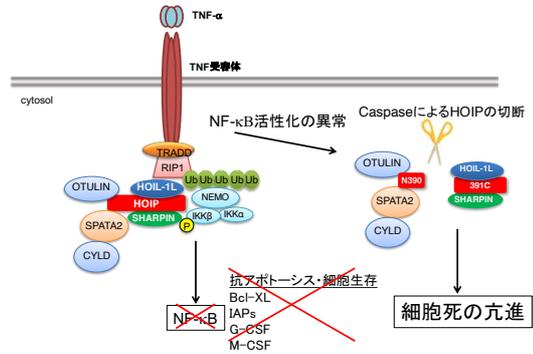


図4 TNF受容体を介したNF-κBシグナルとアポトーシスにおけるLUBACの関与

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

- Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, Wanibuchi H. Generation of rat monoclonal antibodies specific for DZIP3. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*、査読有、印刷中
- Hattori M, Oikawa D, Amano H, Yasuda M, Kaira K, Ishida-Yamamoto A, Nakano H, Sawamura D, Terawaki S, Wakamatsu K, Tokunaga F, Ishikawa O, Shimizu A. Mechanistic insight into the repigmentation of piebaldism: functional characterization

- of a mutant KIT in melanocyte regeneration.、*J. Dermatol.*、査読有、印刷中
- ③ Hattori M, Ishikawa O, Oikawa D, Amano H, Yasuda M, Kaira K, Ishida-Yamamoto A, Nakano H, Sawamura D, Terawaki SI, 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.*、査読有、印刷中
- ④ Kuriyama Y, Hattori M, Mitsui T, Nakano H, Oikawa D, Tokunaga F, Ishikawa O, Shimizu A.、Generalized verrucosis caused by various human papillomaviruses in a patient with GATA2 deficiency.、*J. Dermatol.*、査読有、印刷中
DOI: 10.1111/1346-8138.14149
- ⑤ Hattori M, Shimizu A, Oikawa D, Kamei K, Kaira K, Ishida-Yamamoto A, Nakano H, Sawamura D, Tokunaga F, Ishikawa O.、Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of pretibial dystrophic epidermolysis bullosa.、*Br. J. Dermatol.*、査読有、177 巻、2017、e92-e93
DOI: 10.1111/bjd.15342
- ⑥ Goto E and Tokunaga F.、Decreased linear ubiquitination of NEMO and FADD on apoptosis with caspase-mediated cleavage of HOIP.、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有、485 巻、2017、152-159.
DOI:10.1016/j.bbrc.2017.02.040.
- ⑦ Yamamotoya T, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Fukushima T, Yamazaki H, Kaneko S, Fujishiro M, Kikuchi T, Kushiya A, Tokunaga F, Asano T, and Sakoda H.、Reduced SHARPIN and LUBAC formation may contribute to CCl₄- or acetaminophen-induced liver cirrhosis in mice.、*Int. J. Mol. Sci.*、査読有、18巻、2017、E326.
DOI: 10.3390/ijms18020326.
- ⑧ 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, and Inoue J.、HTLV-1 Tax induces formation of the active macromolecular IKK complex by generating Lys63- and Met1-linked hybrid polyubiquitin chains.、*PLoS Pathog.*、査読有、13 巻、2017、e100162
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006162.
- ⑨ Omura H, Oikawa D, Nakane T, Kato M, Ishii R, Ishitani R, Tokunaga F, and Nureki O. Structural and functional analysis of DDX41: a bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. *Sci. Rep.*、査読有、6 巻、2016、34756
DOI: 10.1038/srep34756.
- ⑩ Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Takeyoshi I, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, and Tokunaga F. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Commun.*、査読有、7 巻、2016、12547
DOI: 10.1038/ncomms12547.
- ⑪ Saitoh Y, Hamano A, Mochida K, Kakeya A, Uno M, Tsuruyama E, Ichikawa H, Tokunaga F, Utsunomiya A, Watanabe T, and Yamaoka S.、A20 targets caspase-8 and FADD to protect HTLV-I-infected cells.、*Leukemia*、査読有、30 巻、2016、716-727
DOI: 10.1038/leu.2015.267
- ⑫ 徳永文稔、直鎖状ユビキチン鎖生成を介した炎症・免疫シグナル制御と疾患、*大阪市医学会雑誌* (The Journal of Osaka City Medical Association)、査読無、65巻、2016、7-12

[学会発表](計 18 件)

- ① Oikawa D, Hanada K, Terawaki S, Sakamoto S, Tokunaga F.、Characterization of a novel LUBAC inhibitor, HOIPIN-1、Keystone Symposia-ubiquitin signaling、2018 年
- ② 桑田翔平、山中総士、岡田健吾、後藤栄治、徳永文稔、高橋宏隆、澤崎達也、85 種類のヒト脱ユビキチン化酵素 (DUB) の完全超組換えタンパク質を用いたポリユビキチン鎖特異性決定と DUB 阻害評価系の構築、ConBio2017、2017 年
- ③ 長尾和哉、中島達朗、高橋宏隆、徳永文稔、澤崎達也、コムギ無細胞人プレインアレイを基盤とした新規直鎖状ユビキチン結合タンパク質の探索と機能解析、ConBio2017、2017 年
- ④ 後藤栄治、阿部貴則、徳永文稔、NF- κ B 活性制御に関わる新規 OTU 型脱ユビキチン化酵素の同定、ConBio2017、2017 年
- ⑤ 後藤栄治、徳永文稔、Jurkat ヒト T 細胞株における LUBAC の機能解析、ConBio2017、2017 年
- ⑥ 阿部貴則、後藤栄治、及川大輔、高橋宏隆、堀居拓郎、寺脇正剛、畑田出穂、澤崎達也、徳永文稔、LUBAC 活性を制御する新規 RING 型ユビキチンリガーゼの機能解析、ConBio2017、2017 年
- ⑦ 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 年
- ⑧ 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- κ B と

細胞死制御に関与する、ConBio2017、2017年

- ⑨ 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- κ 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年
- ⑩ 後藤栄治、徳永文稔、NF- κ B制御に関わる新規脱ユビキチン化酵素の探索、第22回病態プロテアーゼ学会学術集会、2017年
- ⑪ 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- κ Bと細胞死制御に関与する、第64回日本生化学会近畿支部例会、2017年
- ⑫ 高橋宏隆、桑田翔平、後藤栄治、徳永文稔、澤崎達也、コムギ無細胞タンパク質アレイ解析によって見出されたNEMO結合性新規DUBのNF- κ B制御機構の解析、第39回日本分子生物学会年会、2016年
- ⑬ 桑田翔平、岡田健吾、高橋宏隆、後藤栄治、徳永文稔、澤崎達也、コムギ無細胞系を基盤としたヒトの脱ユビキチン化酵素(DUB)プロテインアレイを用いたポリユビキチン基質特異性解析、第39回日本分子生物学会年会、2016年
- ⑭ 中島達朗、高橋宏隆、徳永文稔、澤崎達也、コムギ無細胞ヒト20,000種プロテインアレイを基盤とした直鎖状ポリユビキチン鎖結合タンパク質の探索、第39回日本分子生物学会年会、2016年
- ⑮ 徳永文稔、Optineurinの直鎖状ユビキチン鎖結合性と筋萎縮性側索硬化症、第39回日本分子生物学会年会、2016年
- ⑯ 徳永文稔、炎症・免疫シグナルのユビキチン鎖による制御と疾患、第54回数理医学研究会、2016年
- ⑰ 徳永文稔、筋萎縮性側索硬化症(ALS)における直鎖状ユビキチン鎖の寄与、第89回日本生化学会大会、2016年
- ⑱ 徳永文稔、直鎖状ユビキチン鎖による炎症・免疫シグナル制御とその破綻による疾患、第67回日本電気泳動学会総会、2016年

〔図書〕(計1件)

- ① Tokunaga F、Springer、Ubiquitination-mediated NF- κ B regulation in inflammatory response. In: *Protein modifications in pathogenic dysregulation of signaling* (Inoue J and Takekawa M, eds.) Tokyo、2015、pp. 177-196

〔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://osaka-cu-1seika.umin.jp/>

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departments/bunshi-pathobiochemistry.shtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し