

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15423

研究課題名(和文)ネクロプトーシス回避機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of negative regulator of necroptosis

研究代表者

大島 茂(OSHIMA, Shigeru)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50376787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ネクロプトーシス刺激後のGFP-LC3分子複合体を解析した。いくつかのLC3分子複合体を形成する新規候補分子を同定することができ、腸管上皮を用いた検討ではHADHAを同定した。パルミチン酸誘導性オートファジーが腸上皮のパルミチン酸誘導性細胞死を回避する方向で機能している可能性が示唆された。また、オートファジーにて基質認識に使用されるユビキチン鎖を解析するため、鎖特異的にポリユビキチン化を動的に可視化する独自技術を開発した(PolyUb-FC)。この技術を用いて、ネクロプトーシスの中心分子であるRIPK3の可視化を試みたところ刺激誘導性に共局在することが判明した。

研究成果の概要(英文)：To identify novel GFP-LC3-interacting proteins in intestinal epithelial cells (IECs), we performed immunoprecipitation with a GFP antibody and then analyzed co-immunoprecipitates by mass spectrometry. HADHA was identified as an LC3-interacting protein. Given that HADHA catalyzes the last three steps of mitochondrial beta-oxidation of long-chain fatty acids, we investigated whether long-chain fatty acids induce autophagy. We found that palmitic acid-induced autophagy supports the survival of IECs. Ubiquitination is frequently a prerequisite for substrate recognition and determines selectivity in autophagy. We developed a polyubiquitin-mediated fluorescence complementation (PolyUb-FC) assay. The PolyUb-FC assay has the advantage that chain-specific polyubiquitination can be directly visualized in living cells without using antibodies. We applied the PolyUb-FC assay to examine RIPK3 polyubiquitination. We demonstrated that RIPK3 colocalized with PolyUb-FC.

研究分野：消化器内科

キーワード：オートファジー ユビキチン ネクロプトーシス

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性維持には、細胞の増殖や分化だけでなく細胞の死が重要な役割を担っている。発生や老化の過程で不要となった細胞や生体にとって有害な細胞は、細胞死により排除される。また、細胞死制御が腫瘍化に重要であるだけでなく、この死細胞が、免疫応答、炎症、修復、再生、線維化といった生体応答の起点となっていることが明らかになりつつある。この生命活動にとって必須な細胞死の一つとして、細胞に内在する精緻な分子機構により能動的に実行されるネクロプトーシスが明らかとなっている。しかし、ネクロプトーシスは Caspase-8 の機能抑制もしくは Caspase-8 分解された場合に RIPK3 分子複合体 (Necrosome) を介して機能することが明らかになっているが、ネクロプトーシス回避の分子機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

細胞の生死は厳密に制御されており、同制御の破綻は腫瘍化のみならず炎症惹起にも直結する。クローン病パネート細胞においてもネクロプトーシスが認められるが、ネクロプトーシス回避機構は未だ不明である。申請者はリンパ球においてオートファジーがネクロプトーシス回避機構になっている可能性を見いだした。本研究ではこの成果に基づいて、ネクロプトーシス誘導シグナルからオートファジーが誘導される分子機構、オートファジーがネクロプトーシス回避に働く分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) オートファジー関連分子の同定

GFP-LC3 発現 MEF もしくは GFP-LC3 マウスから腸管上皮細胞を抽出する。細胞を lysis したのち GFP 抗体にて免疫沈降し SDS-PAGE にて電気泳動、ゲルを CBB 染色した。バンドを切り出し、MALDI-TOF/LC-MS にてタンパク質を同定した。

(2) オートファジーの検定

オートファジーは LC3 の免疫染色、LC3II のウエスタンブロットにて検討した。細胞死検討のため生細胞を MTS 法で検討した。

(3) ユビキチン可視化システム (PolyUb-FC) の樹立

monomeric Kusabira-Green (mKG) の遺伝子の N 末、C 末に Ub を結合させ、4 つの組み合わせを細胞内に遺伝子導入し BiFC による蛍光強度から最適な組み合わせを同定した。その組み合わせにて、ユビキチンのリジンを変異させた K0 を作成した。

4. 研究成果

(1) ネクロプトーシス刺激にて LC3 に誘導性に結合する分子の同定。
ネクロプトーシス誘導シグナルからオート

ファジーが誘導される分子機構、オートファジーがネクロプトーシス回避に働く分子機構を明らかにするため、GFP-LC3 分子複合体を解析した。GFP-LC3 マウスから樹立した MEF を用いてネクロプトーシス刺激によるオートファジー誘導の最適条件を検討した。GFP-LC3 発現 MEF に対してネクロプトーシス刺激を行い、GFP にて免疫沈降し、SDS-PAGE 後 CBB 染色を行った。ネクロプトーシス刺激による誘導性バンドを複数認めた。LC3 に誘導性に結合する分子として、CALD1, TPM1, ML21B などを同定した。

(2) GFP-LC3 マウスの腸管上皮を用いて LC3 結合分子を同定。

腸管上皮細胞は食事抗原に日々さらされている。腸管上皮細胞においてネクロプトーシス及びオートファジーの重要性は認められている。ネクロプトーシス回避の分子機構を明らかにするため GFP-LC3 マウスの腸管上皮を用いて LC3 結合分子を検討した。腸管上皮を分離し GFP にて免疫沈降し LC3 結合分子として HADHA を同定した。HADHA は長鎖脂肪酸のミトコンドリア β 酸化を触媒することから、長鎖脂肪酸が腸上皮においてオートファジーを誘導する可能性を検討した。その結果、代表的な長鎖脂肪酸であるパルミチン酸が腸上皮細胞株においてオートファジーを誘導することを見いだした (図 1)。パルミチン酸が腸上皮において細胞死を誘導し、オートファジー阻害剤により細胞死が増強することも明らかにした。このことから、パルミチン酸誘導性オートファジーが腸上皮のパルミチン酸誘導性細胞死を回避する方向で機能している可能性が示唆された。

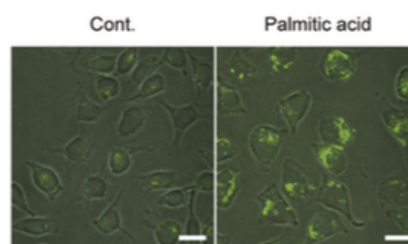


図 1
パルミチン酸によるオートファジー誘導

(3) ユビキチン可視化システム PolyUb-FC の樹立

ネクロプトーシス誘導シグナルからオートファジーが誘導される分子機構やオートファジーがネクロプトーシス回避に働く分子機構を明らかにするため、オートファジーにて重要なユビキチン鎖を解析した。研究代表者は細胞死シグナルにおけるユビキチン解析を行ってきた (Nature 2009, Nat. Immunol. 2015)。ポリユビキチン鎖は結合様式により 8 種類あるが、ネクロプトーシスに際し如何なるユビキチン鎖を誘導しているかは不明で

あった。これまでポリユビキチン鎖について *in vitro* および *in vivo* で可視化解析し得る系が存在せず解析が困難であったことも1つの要因である。鎖特異的抗体は動的解析できず、Ub-GFPとセンサータンパク質は鎖状になる前から蛍光標識されている。そこで、鎖特異的にポリユビキチン化を動的に可視化する技術を蛍光蛋白質再構成法 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) を用いて開発した (PolyUb-FC)。予め2つに分割した蛍光タンパク質 monomeric Kusabira-Green (mKG) の遺伝子に、ユビキチン遺伝子をそれぞれ融合させ、ユビキチンが相互作用すると、分割した mKG の断片が近接により再構成され蛍光能を回復し、相互作用を蛍光シグナルとして検出することができた。この蛍光がユビキチン結合によるものであることを示すため、ユビキチン結合に使用されるリジンを全て変異させた K0 を作成したところ蛍光が消失した。このことから、PolyUb-FC の蛍光はリジンを介したユビキチン結合によると考えられた (図2)。

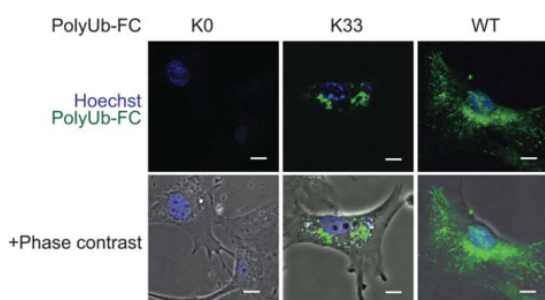


図2、PolyUb-FCによる可視化

(4) PolyUb-FCによる応用

次に鎖特異的な蛍光を検討するため、K63のみ、K48のみ結合できる変異体を作成し可視化することに成功した。さらに PolyUb-FC を用いて、K33鎖結合型の可視化に世界で初めて成功し、オートファジーアダプター分子 p62 との共局在を明らかにした。この技術を用いて、ネクロプトーシスの中心分子である RIPK3 の可視化を試みたところ刺激誘導性に RIPK3 と PolyUb-FC が共局在することが判明した。

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6件)

① Nibe Y, Oshima S, Kobayashi M, Maeyashiki C, Matsuzawa Y, Otsubo K, Matsuda H, Aonuma E, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Nakada S, Watanabe M. Novel polyubiquitin imaging system, PolyUb-FC, reveals that K33-linked polyubiquitin is recruited by SQSTM1/p62. *Autophagy* Jan 24:1-12, 2018.

doi: 10.1080/15548627.2017.1407889. 査読あり

② Maeyashiki C, Oshima S, Otsubo K, Kobayashi M, Nibe Y, Matsuzawa Y, Onizawa M, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. HADHA, the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 484: 636-641, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.159. 査読あり

③ Kobayashi M, Oshima S, Maeyashiki C, Nibe Y, Otsubo K, Matsuzawa Y, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development. *Scientific Reports* 6:36780, 2016. doi: 10.1038/srep36780. 査読あり

④ 大島 茂. 自己免疫疾患とユビキチン修飾系 *日本臨床免疫学会会誌*. 40(6) 442-449. 2017 査読なし

⑤ 大島 茂、渡辺 守. 【腸内細菌と臨床】腸内細菌と消化器疾患 (6) 腸内細菌と大腸がん *臨牀消化器内科*. 32 (10): 1353-1357. 2017 査読なし

⑥ 大島 茂、渡辺 守. 【臓器特異的バリアとその破綻による疾患】消化管バリアと疾患 ①: 炎症性腸疾患 *実験医学増刊*. 35 (7): 115-120. 2017 査読なし

〔学会発表〕 (計8件)

① Otsubo K, Maeyashiki C, Aonuma E, Matsuda H, Nibe Y, Kobayashi M, Matsuzawa Y, Watanabe M, and Oshima S. Long-chain fatty acid regulates autophagy and polyubiquitination in intestinal epithelial cells. *Keystone Symposia - Ubiquitin Signaling (A8)* 2018.1.30. Tahoe, CA, USA

② Nibe Y, Matsuda H, Aonuma E, Otsubo K, Maeyashiki C, Kobayashi M, Matsuzawa Y, Nakada S, Watanabe M, and Oshima S. Novel polyubiquitin imaging system, PolyUb-FC, visualized atypical polyubiquitin chain in living cells. *Keystone Symposia - Ubiquitin Signaling (A8)* 2018.1.30. Tahoe, CA, USA

③ Matsuda H, Nibe Y, Aonuma E, Otsubo K, Maeyashiki C, Kobayashi M, Matsuzawa Y, Nakada S, Watanabe M, and Oshima S. K33-linked polyubiquitin is recruited by SQSTM1/p62. *Keystone Symposia - Ubiquitin Signaling (A8)* 2018.1.30. Tahoe, CA, USA

④ Aonuma E, Nibe Y, Matsuda H, Otsubo K, Maeyashiki C, Kobayashi M, Matsuzawa Y, Watanabe M, and Oshima S. Necroptosis stimulation regulates SQSTM1/p62-LC3

complex formation and polyubiquitination.
Keystone Symposia - Ubiquitin Signaling
(A8) 2018.1.29. Tahoe, CA, USA

⑤Nibe Y, Oshima S, Aonuma E, Matsuda H, Otsubo K, Maeyashiki C, Kobayashia M, Matsuzawa Y, Nakada S, Watanabe M. Novel polyubiquitin imaging reveals that atypical polyubiquitin contribute to autophagy. GI research Academy 2017 2017.06.09 経団連会館 (東京都千代田区)

⑥ Otsubo K, Oshima S, Maeyashiki C, Aonuma E, Matsuda H, Kobayashi M, Nibe Y, Matsuzawa Y, Watanabe M. HADHA, the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells. The 8th International Symposium on Autophagy 2017.05.29 Nara (Japan)

⑦Nibe Y, Oshima S, Aonuma E, Matsuda H, Otsubo K, Maeyashiki C, Kobayashi M, Matsuzawa Y, Nakada S, Watanabe M. Novel polyubiquitin imaging reveals that atypical polyubiquitin contribute to autophagy via p62. The 8th International Symposium on Autophagy 2017.05.29 Nara (Japan)

⑧Kobayashi M, Oshima S, Maeyashiki C, Nibe Y, Otsubo K, Watanabe M. The Ubiquitin Hybrid Gene UBA52 Regulates Cell Cycle and Ubiquitination of Ribosome in Colon Cancer. DDW2017 2017.05.09 Chicago(USA)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 茂 (OSHIMA, Shigeru)