

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08880

研究課題名(和文) B1細胞発生におけるLUBACの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of functions of LUBAC in B1 cell development

研究代表者

佐々木 義輝 (Sasaki, Yoshiteru)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：80323004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：直鎖状ポリユビキチン鎖は、LUBACによって選択的に生成され、NF- $\kappa$ Bの活性化、プログラム細胞死を抑制する機能を持つ。本研究課題では、直鎖状ポリユビキチン鎖がB1細胞発生において担う役割について解析を行った。B1細胞はB1aとB1b細胞に分けられるが、LUBACはその両方の発生に必須である。B細胞特異的にLUBACを欠損させたマウスにおいて、ネクロプトーシスに必須の分子RIP3を欠損させるとB1a細胞の発生は回復されないがB1b細胞の発生が回復することを発見した。以上の結果からB1a細胞とB1b細胞の発生においてLUBACが担う役割の違いがあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義としては、これまで不明な点が多かったB1a細胞とB1b細胞の発生機構の違いを明らかにした点が挙げられる。

研究成果の概要(英文)：Linear polyubiquitin chains are generated specifically by the ubiquitin ligase complex LUBAC. LUBAC is composed of one catalytic subunit, H01P and two accessory subunits, H01L-1L and SHARPIN. Linear polyubiquitin chains are known to play important roles in activation of NF- $\kappa$ B and inhibition of programmed cell death including apoptosis and necroptosis by TNF stimulation. In this study I analyzed the role of LUBAC in B1 cell development. B1 cells are subdivided into B1a (CD5+) and B1b (CD5-) cells according to CD5 expression. LUBAC is required for the development of both B1a and B1b cells. In this study I found that deletion of RIP3, a critical regulator of necroptosis rescued the development of B1b cells but not B1a cells. This data shows that LUBAC controls B1a and B1b cell development in a different manner.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 シグナル伝達 発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系はタンパク質の翻訳後修飾系の一つである。ユビキチンは E1 (活性化酵素) E2 (結合酵素) E3 (ユビキチンリガーゼ) の3種の酵素の働きによって、E3 が認識する標的タンパク質に、ポリユビキチン鎖が付加される。ポリユビキチン鎖はユビキチンの7個のリジン残基のいずれかを介して形成され、結合様式の違いによって異なる機能を発揮する。新規ユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC (linear ubiquitin assembly complex) は、ユビキチンの N 末端と C 末端を結合させることで直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に生成する。LUBAC は活性中心を担う HOIP と2つのアクセサリー分子 HOIL-1L、SHARPIN から構成される複合体であり、TNF 刺激依存的な古典的 NF- $\kappa$ B 経路の活性化、プログラム細胞死の抑制に関与することが明らかとなっていた。

研究代表者は、これまでに B 細胞特異的に HOIP の活性中心を欠損するマウスを作製し解析することで、LUBAC が T 細胞依存性抗原および II 型 T 細胞非依存性抗原に対する抗体反応の両方に必要である事、TNFR スーパーファミリーに属する受容体 CD40 や TACI の下流において古典的 NF- $\kappa$ B 経路のみならず、ERK の活性化にも重要な役割を果たす事、TLR4 の下流の2つのシグナル伝達分子 MyD88 と TRIF の内、TRIF の下流で活性化される Caspase-8 及び Caspase-3 の活性化を抑制することによって、LPS 刺激による B 細胞の活性化、増殖、そしてそれに引き続いて起こる抗体産生細胞への分化を制御している事、成熟 B 細胞の一つ B1 細胞の発生に必須である事を報告している。

## 2. 研究の目的

上述の様に LUBAC は B1 細胞の発生に必須であるが、LUBAC のどの機能が B1 細胞の発生に関与しているかは不明であった。本研究課題では、LUBAC のどの機能を相補することで LUBAC 欠損 B1 細胞の発生を回復可能か試すことで、(1) B1 細胞発生における LUBAC の機能である NF- $\kappa$ B 活性化と細胞死抑制それぞれの役割の解明し、B1 細胞における LUBAC 活性化受容体のスクリーニングによって、(2) LUBAC の上流で機能し B1 細胞発生に関与する受容体を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

LUBAC には NF- $\kappa$ B 活性化と細胞死抑制という大きな2つの機能がある。そこで LUBAC 欠損 B 細胞において NF- $\kappa$ B 経路の活性化もしくは細胞死の抑制によって LUBAC を欠損する B1 細胞の発生が回復出来るかどうか検討する事で B1 細胞発生における LUBAC の機能を解析した。

## 4. 研究成果

LUBAC には古典的 NF- $\kappa$ B 経路の活性化とプログラム細胞死の抑制という機能が知られている。プログラム細胞死の中で LUBAC はアポトーシスおよびネクロトーシスを抑制する機能があることが報告されている。まず初めに B1 細胞発生における LUBAC によるネクロトーシス抑制が担う役割の解析を行なった。ネクロトーシスは RIP3 を欠損させる事で抑制可能であるが、HOIP と RIP3 の遺伝子座は染色体上で 200 kbp 程度しか離れていないため通常の交配では HOIP と RIP3 両方を欠損するマウスを取得することが困難であると考

えられたため、HOIP のコンディショナルノックアウトアレルを持つ染色体に CRISPR/Cas9 の系を用いて RIP3 遺伝子に変異を導入する事で HOIP/RIP3 両分子を欠損可能なマウスを製作した。このマウスにおいて B 細胞特異的に LUBAC を欠損させたところ、B1a 細胞の発生は回復しないが、B1b 細胞の発生が回復することを発見した。この結果から LUBAC がネクロトーシスを抑制することで B1b 細胞の発生を制御している事、B1a 細胞、B1b 細胞の発生において異なる機能を持つことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki, K., Himeno, A., Nakagawa, T., Sasaki, Y., Kiyonari, H. and Iwai, K.	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 3878
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Muller David J., Wirhth Stefan, Fuchs Alexander R., Marklin Melanie, Heitmann Jonas S., Sturm Marc, Haap Michael, Kirschniak Andreas, Sasaki Yoshiteru, Kanz Lothar, Kopp Hans-Georg, Muller Martin R.	4. 巻 105
2. 論文標題 Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 531 ~ 538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JLB.2AB0218-076RR	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 Sasaki Yoshiteru, Iwai Kazuhiro	4. 巻 200
2. 論文標題 Crucial Role of Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex-Mediated Inhibition of Programmed Cell Death in TLR4-Mediated B Cell Responses and B1b Cell Development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3438-3449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1701526	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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