

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390097

研究課題名(和文) ユビキチン系が関与する新規NF- κ B活性化機構と炎症との関連研究課題名(英文) Relationship between inflammation and novel NF- κ B activation pathway which is regulated by ubiquitin system

研究代表者

徳永 文稔 (TOKUNAGA FUMINORI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00212069

研究成果の概要(和文)：

我々は、SHARPIN、HOIL-1L、HOIP からなるユビキチンリガーゼ複合体(LUBAC)が、全く新しい直鎖状ポリユビキチン鎖を形成することを見だし、生理的には炎症や免疫制御に重要なNF- κ Bの制御に関わることを明らかにした。さらに、SHARPINが欠失した *cpdm* マウスでは、LUBACの発現量が低下することでNF- κ B活性が減弱し、慢性皮膚炎を発症することを示した。これらの結果から、直鎖状ポリユビキチン鎖はNF- κ B活性化に必須な新たな翻訳後修飾であることが示された。

研究成果の概要(英文)：

We identified LUBAC ubiquitin ligase, which composed of SHARPIN, HOIL-1L, and HOIP, forms a novel type of linear polyubiquitin chain. LUBAC regulates NF- κ B system, a critical transcription factor for inflammation and immune regulation. Furthermore, we revealed that *cpdm* mice, which lack *Sharpin* by a spontaneous mutation, induce dermatitis by the reduction of LUBAC and NF- κ B activity. These results indicate that linear polyubiquitination is an indispensable post-transcription modification for NF- κ B activation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,000,000 | 2,400,000 | 10,400,000 |
| 2009年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 2010年度 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,300,000 | 4,590,000 | 19,890,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、蛋白質、酵素、細胞・組織、炎症、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

研究開始の当初、ユビキチン結合によるタンパク質の翻訳後修飾は、生理機能変換シグナルとして重要な役割を果たすことが解明

されつつあった。タンパク質のユビキチン化には1分子のユビキチンが結合するモノユビキチン化と多数のユビキチンが数珠状に連結するポリユビキチン化がある。このうち、

モノユビキチン化はエンドサイトーシスなど細胞内局在シグナルとして働くこと、ポリユビキチン化のうち Lys48 を介するタイプはプロテアソーム分解シグナルとなるが、Lys63 を介するポリユビキチン鎖生成は分解シグナルとしては機能せず、DNA 修復や NF- κ B 制御などシグナル伝達に寄与することが示されていた。

研究開始当時、我々はユビキチンの N 末端 α アミノ基を介する直鎖状ポリユビキチン鎖を生成する HOIL-1L/HOIP からなるユビキチンリガーゼ複合体 (LUBAC) を同定していた (EMBO J., 2006)。しかしながら、このリガーゼによって生成される直鎖状ポリユビキチン鎖がどのような生理機能に関与するのかについては、全く不明であった。

2. 研究の目的

我々は、LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖形成が NF- κ B 活性制御に関わることを見いだしつつあったので、本研究ではより詳細に解析し、生理的な役割と病態への関与を明確にすることを目的とした。特に、我々は HOIL-1L に相同性の高い領域をもつ SHARPIN を同定していたので、SHARPIN が HOIL-1L/HOIP と同様に複合体を形成することで直鎖状ポリユビキチン鎖形成や NF- κ B 制御を司ることができるかを重点的に解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) トランスフェクション、イムノブロット、ルシフェラーゼアッセイ

細胞にプラスミドをトランスフェクションする際は、Lipofectamine2000 (Invitrogen) や ExGen500 (Fermentas) を用いた。トランスフェクトした細胞は、プロテアーゼ阻害剤を含む 1% TritonX-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl で溶解して、SDS-PAGE、PVDF 膜に転写後、適切な 1 次抗体と種特異的な二次抗体を用いて反応させ、ECL 法にて検出した。ルシフェラーゼアッセイは、pSP-6xNF- κ B レポーターと各プラスミドを共発現させ、24 時間後に細胞を溶解後、Dual-Luciferase アッセイシステム (Promega) を用いて検出した。

(2) IKK キナーゼアッセイ

細胞を溶解後、NEMO 抗体を用いて古典的 IKK 複合体を免疫沈降させ、5 μ g の GST-I κ B α (aa. 1-54)、0.1 μ Ci [γ - 32 P]-ATP と 37°C で 20 分反応させ、SDS-PAGE 後、基質タンパク質のリン酸化を BAS5000 (Fuji Film) を用いたオートラジオグラフィーによって検出した。

4. 研究成果

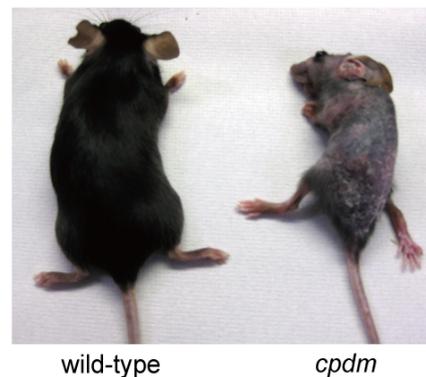
(1) LUBAC による古典的 NF- κ B 制御の発見

我々は、LUBAC の生理的役割を検索した結果、HOIL-1L/HOIP や SHARPIN/HOIP の二者の共発現または SHRAPIN/HOIL-1L/HOIP の三者を細胞に共発現することによって、NF- κ B 活性が特異的に増大することをルシフェラーゼアッセイによって同定した。さらに、siRNA を用いて LUBAC 因子をノックダウンすると定常的な NF- κ B 活性及び炎症性サイトカインである TNF- α によって惹起される NF- κ B 活性化も減弱することを見だし、LUBAC が生理的な NF- κ B 活性制御に関与することが明らかになった。

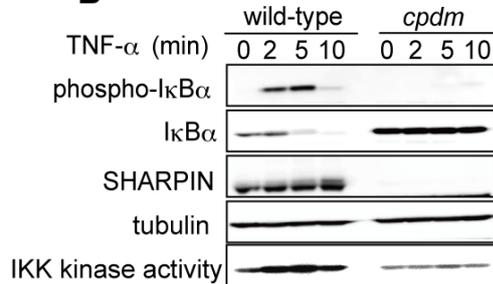
LUBAC による NF- κ B 活性化機構をより詳細に解析した結果、LUBAC は二者ではなく生理的には SHRAPIN/HOIL-1L/HOIP の三者複合体として古典的 NF- κ B 経路を特異的に制御しており、非古典的 NF- κ B 経路への影響は見られなかった。さらに、LUBAC は TNF- α 刺激にตอบสนองして IKK の制御サブユニットである NEMO と迅速 (2 分以内) に結合し、NEMO のコイルドコイル 2 (CC2) -ロイジンジッパー (LZ) 領域の特定の Lys 残基に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することを同定した。

図 1 SHARPIN 欠失 *cpdm* マウスの NF- κ B 活性不全。
A. 遺伝的に SHARPIN が欠失した *cpdm* マウスは皮

A



B



膚炎を発症する。B. 野生型および *cpdm* マウスから構築した胎児繊維芽細胞における TNF- α 刺激に伴う I κ B α のリン酸化および分解、IKK 活性化を解析した。

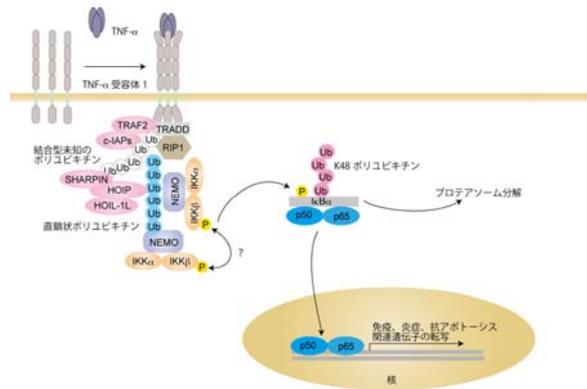
(2) LUBAC 構成因子欠失マウスの表現系

さらに我々は、LUBAC の生理的役割を明らかにする目的で、まず HOIL-1L ノックアウト (KO) マウスを作製して細胞レベルで解析した。その結果、HOIL-1L の欠損によって HOIP や SHARPIN のタンパク量は完全には消失しないが著減しており、これらのタンパク質が複合体を形成できない場合は不安定になると考えられた。また、HOIL-1L-KO 細胞では TNF- α 依存的な I κ B α のリン酸化や分解の遅延のみならず、IKK 活性化や p65 核移行の減弱が観察され、NF- κ B 標的遺伝子の発現も低下した。このように、HOIL-1L の欠失によって古典的 NF- κ B 活性化が不全になるので、LUBAC は NF- κ B 経路の生理的な制御因子として機能していることが明らかになったのである。

また興味深いことに、我々の解析中に *cpdm* (chronic proliferative dermatitis) マウスと呼ばれる皮膚炎を自然発症する突然変異マウスの原因が SHARPIN 遺伝子の異常によって引き起こされることが報告された。*cpdm* マウスは、慢性皮膚炎だけでなくパリエル板欠損など二次リンパ器官形成不全を呈し、NEMO の変異で引き起こされる無汗腺性外胚葉異形成性免疫不全症候群 (EDA-ID; ectodermal dysplasia, anhidrotic, with immune deficiency) の病態に類似した表現型を示す (図 1 A)。そこで我々は、SHARPIN が欠損している *cpdm* マウス由来細胞を用いて NF- κ B 活性化への影響を解析した。その結果、*cpdm* 由来細胞では SHARPIN が欠失することで LUBAC の他のコンポーネントである HOIL-1L や HOIP の細胞内量も著減することや TNF- α 刺激に伴う古典的 NF- κ B 活性化が減弱することが示された (図 1 B)。さらに、*cpdm* 細胞で HOIL-1L をノックダウンし、残存する LUBAC 量をできる限り減少させると TNF- α 刺激に伴う NF- κ B 活性化は著しく抑制されることから、少なくとも TNF- α によって誘起される古典的 NF- κ B 活性化経路では LUBAC が主要な役割を担うと示唆された (図 2)。一方、非古典的 NF- κ B 活性化経路は SHARPIN 欠損によっても減弱することはなかった。

このように SHARPIN の欠失では皮膚炎など明らかな表現型が見いだされるが、HOIL-1L KO マウスでは顕著な表現型は現れない。その差異をもたらす分子メカニズムは不明である。SHARPIN と HOIL-1L はともに UBL と NZF ドメインを有し、HOIP に結合するサブユニットであるが、各因子が欠失することでわずかに残存する二者サブユニットからなる複合体 (HOIL-1L/HOIP または SHARPIN/HOIP) に機能的な差異がある可能性が挙げられる。実際に、SHARPIN 欠失細胞では TNF- α 刺激に伴う I κ B α のリン酸化や分解が HOIL-1L KO 細胞より減弱することやアポトーシスが早く惹起されることを見いだしているが、詳細な分子機構は今後解析すべき重要な課題である。

図 2 SHARPIN-HOIL-1L-HOIP からなる LUBAC による古典的 NF- κ B 活性化経路のスキーム。



る古典的 NF- κ B 活性化経路のスキーム。

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 12 件)

- ① Tokunaga F., Nakagawa T., Nakahara M., Saeki Y., Taniguchi M., S Sakata S.-i., Tanaka K., Nakano H., and Iwai K.: SHARPIN is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin assembly complex. **Nature**, 471: 633-636, (2011) 査読有
- ② Ikeda F., Deribe Y.L, Skånland S.S., Stieglitz B., Grabbe C., van Wijk S., Franz-Wachtel M., Goswami P., Nagy V., Terzic J., Tokunaga F., Androulidaki A., Nakagawa T., Pasparakis M., Iwai K., Sundberg J.P., Schaefer L., Macek B., Rittinger K., and Dikic, I.: SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. **Nature**, 471: 637-641, (2011) 査読有
- ③ Inn, K.S., Gack, M.U., Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.Y., Iwai, K., and Jung, J.U.: Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. **Mol Cell**, 41: 354-365, (2011), 査読有
- ④ 徳永文稔, 岩井一宏: ユビキチン修飾系によるNF- κ Bグナル伝達制御: 新規直鎖状ポリユビキチン鎖形成を介するNF- κ B制御機構の発見. **細胞工学**, 29: 1224-1230 (2010), 査読無

- ⑤徳永文稔: ユビキチン-プロテアソーム系の多彩な生理機能と疾患への関与. *BIO Clinica* 25: 1092-1097 (2010), 査読無
- ⑥Kumanomidou T., Nakagawa T., Mizushima T., Suzuki A., Tokunaga F., Iwai K., Yoshida Y., Tanaka K., and Yamane T.: Crystallization and preliminary X-ray characterization of the Skp1-Fbg3 complex. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 66: 95-98, (2010), 査読有
- ⑦ Iwai K., and Tokunaga F.: Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B activation. *EMBO Rep.* 10, 706-713, (2009), 査読有
- ⑧岩井一宏、坂田真一、中川朋子、徳永文稔: アレルギーやガンに関わるNF- κ Bの新しい活性化機構の発見: 新規ユビキチン修飾、直鎖状ポリユビキチン化によるNF- κ B活性化. *化学と生物* 47: 602-604 (2009), 査読無
- ⑨徳永文稔、岩井一宏: NEMOの直鎖状ポリユビキチン化修飾によるNF- κ B活性化. *蛋白質核酸酵素* 54: 635-642 (2009), 査読無
- ⑩Tokunaga F., Sakata S.-i., Saeki Y., Satomi Y., Kirisako T., Kamei K., Nakagawa T., Kato M., Murata S., Yamaoka S., Yamamoto M., Akira S., Takao T., Tanaka K., Iwai K.: Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nature Cell Biol.* 11: 123-132, (2009), 査読有
- ⑪Miyachi Y., Kato M., Tokunaga F., Iwai K.: The COP9/signalosome increases the efficiency of von Hippel-Lindau protein ubiquitin ligase-mediated hypoxia-inducible factor- α ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 283: 16622-16631, (2008), 査読有
- ⑫Morito D., Hirao K., Oda Y., Hosokawa N., Tokunaga F., Cyr D.M., Tanaka K., Iwai K., and Nagata K.: gp78 cooperates with RMA1 in ER-associated degradation of CFTRDF508. *Mol. Biol. Cell* 19: 1328-1336, (2008), 査読有
- [学会発表] (計 10件)
- ① 徳永文稔: 新規直鎖状ポリユビキチン鎖形成を介したNF- κ Bシグナル制御(シンポジウム)、新学術領域研究「修飾シグナル病」第1回公開シンポジウム、(2011年1月29日、東京)
- ② Fuminori Tokunaga: Linear polyubiquitination: A new regulator of NF- κ B activation (Invited Lecture). Pacificchem (2010年12月8日、Honolulu, U.S.A.)
- ③徳永文稔、岩井一宏: 新規直鎖状ポリユビキチン化によるNF- κ B活性化制御と疾患(ワークショップ). *BMB2010*、(2010年12月8日、神戸)
- ④徳永文稔、岩井一宏: 直鎖状ポリユビキチン鎖生成ユビキチンリガーゼ(LUBAC)の新規サブユニットの同定、第2回シグナルネットワーク研究会、(2010年5月14日、大阪)
- ⑤徳永文稔、中川朋子、坂田真一、岩井一宏: 直鎖状ポリユビキチン化: NF- κ B活性化を導く新たなポリユビキチン鎖(ワークショップ). 第32回日本分子生物学会、(2009年12月10日、横浜)
- ⑥徳永文稔: 新規直鎖状ポリユビキチン鎖生成を介するNF- κ B経路の活性化(シンポジウム). 第19回WSフォーラム-タンパク質・ペプチド研究の現状と展望-、(2009年11月27日、福岡)
- ⑦徳永文稔、亀井希代子、岩井一宏: NEMOの2分子以上の直鎖状ポリユビキチン化はNF- κ B活性化を導く. 第82回日本生化学会大会、(2009年10月23日、神戸)
- ⑧Fuminori Tokunaga: Linear ubiquitination: a novel type of polyubiquitin chain for NF- κ B activation (Invited Lecture). 第7回血液血管オルビス、(2009年8月23日、東京)
- ⑨徳永文稔、岩井一宏: 直鎖状ポリユビキチン化: NF- κ B活性化に必須な新たなユビキチン修飾系(シンポジウム). 第1回シグナルネットワーク研究会、(2009年5月29日、東京)
- ⑩徳永文稔、坂田真一、佐伯泰、亀井希代子、中川朋子、山岡昇司、山本雅裕、審良静男、高尾敏文、田中啓二、岩井一宏: LUBACユビキチンリガーゼによるNEMOの直鎖状ポリユビキチン化修飾とNF- κ B活性化の分子機構、*BMB2008* (2008年12月11日、神戸)

〔図書〕(計1件)

- ①徳永文稔: アグリソーム他6項目, キーワード: 蛋白質の一生, 遠藤斗志也, 小椋光, 永田和宏, 森和俊, 田口英樹, 吉田賢右(編)共立出版, (2008)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cellbio.med.osaka-u.ac.jp/>

報道発表:2009年2月にNature Cell Biology誌に発表した研究成果は、毎日新聞、日本経済新聞、産経新聞(いずれも2009年1月12日朝刊)、読売新聞(2009年1月19日朝刊)、朝日新聞(2009年1月19日夕刊)に紹介された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 文稔 (TOKUNAGA FUMINORI)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00212069

(2) 研究分担者

岩井 一宏 (IWAI KAZUHIRO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号: 60252459