

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16146

研究課題名（和文）LUBACを介した生体防御応答を制御する新規ユビキチン化酵素の解析

研究課題名（英文）Studies on a novel E3 ligase regulating LUBAC and host defense response

研究代表者

清水 康平（Shimizu, Kouhei）

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70727073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では疾患因子として知られるLUBACの制御機構を明らかにすることを目的に、新規LUBAC相互作用因子を同定し、生体防御応答における機能解析を実施した。その結果、当該ユビキチン化酵素は炎症刺激に反応してLUBACに結合し、NF- κ B活性化や炎症誘導性細胞死を抑制することにより、生体内において抗炎症因子として機能する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LUBACは直鎖状ユビキチン鎖を特異的に生成するユビキチン化酵素複合体であり、炎症や免疫のほか、細胞死の制御において極めて重要なNF- κ Bシグナルを活性化させる。LUBACの制御不全は炎症性疾患、免疫不全症、癌など多くの疾患発症に関与することから、LUBACの制御機構解明は関連疾患の有効な治療戦略を確立していく上で重要な課題である。本研究ではLUBACの活性を制御する新たな分子機序を見出しており、LUBACを標的とした新規創薬シーズの展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：To uncover the regulatory mechanism of LUBAC, I identified novel LUBAC associated proteins and investigated their functions in the host defense response. Consequently, I found that a certain E3 ligase binds to LUBAC in response to inflammatory mediators, then inhibits NF- κ B signaling and inflammatory cell death, suggesting the role of the E3 ligase as an anti-inflammatory factor.

研究分野：病態医化学

キーワード：LUBAC 炎症 細胞死 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾は、ヒトにおいて約 600 種存在するユビキチンリガーゼ (E3) が標的タンパク質 (基質) にユビキチン (Ub) を付加する翻訳後修飾で、多くの場合は Ub 内に存在する 7 つのリジン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) のいずれかを介して Ub が数珠状に結合し、その連結様式によって特有の構造を呈する種々のポリ Ub 鎖が形成される。各 Ub 鎖に特定の Ub 結合タンパク質がリクルートされることで、プロテアソームによるタンパク質分解をはじめ、DNA 修復や選択的オートファジーなど多彩な細胞機能の発現が可能となっている。我々のグループは、E3 複合体 “LUBAC” が Ub の N 末端メチオニン (M1) を介して連結した「直鎖状 Ub 鎖」と呼ばれる特殊な Ub 鎖を生成することを発見し、この Ub 鎖生成が NF- κ B シグナル活性化に極めて重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (図 1)。

NF- κ B は炎症・免疫・抗アポトーシス応答の中核を担う転写因子であり、LUBAC の制御不全が炎症性疾患、免疫不全症、癌など NF- κ B に関連する多くの疾患発症に関与することから、LUBAC は創薬標的としても有望で、臨床的に重要な疾患因子として認識されてきた。従って、どのような分子機序で LUBAC 活性が制御され、また一方で制御不全に陥るのかを明らかにすることは、幅広い NF- κ B 関連疾患に対し有効な治療戦略を確立していく上で重要な課題である。

近年、複数のグループにより、単一連結型のみならず分岐鎖や混合鎖などヘテロな連結様式を有する新たな複合型 Ub 鎖修飾パターンが発見され、複数の E3 が協調的に Ub 鎖形成に関与し、細胞機能制御を担っているという証拠が増えつつある (Ohtake F., J. Biochem. 2022;171, 361)。実際に我々も直鎖状 Ub 鎖と K63 鎖の混合鎖が NF- κ B 活性化に関わることを示した (Shibata Y. et al., PLoS Pathog. 2017;13, e1006162)。しかし、種々の複合型 Ub 鎖が如何にして形成され、どのような生理機能を発揮するのか依然として不明な点が多い。

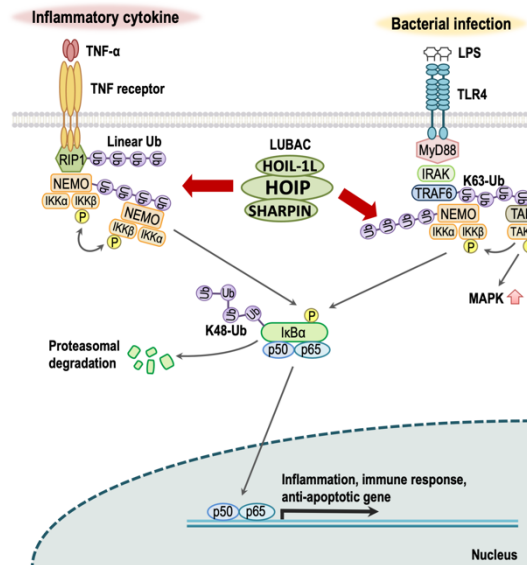


図 1. LUBACによるNF- κ Bシグナル制御

2. 研究の目的

そこで私は、LUBAC が他の E3 と協調し、直鎖状 Ub 鎖を含む複合型 Ub 鎖を形成することで NF- κ B 制御や細胞機能の発現に寄与する可能性を想定し、これまでに複数の新規 LUBAC 結合性 E3 群を同定してきた。本研究では特に LAP1 (LUBAC associated protein 1) と命名した E3 が LUBAC との相互作用を介して生体防御応答をどのように制御するか、また、炎症性疾患を中心に疾患の発症や病態形成メカニズムとの関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LAP1 による LUBAC 制御の分子メカニズムの解明

① LAP1 の E3 活性や機能ドメインが LUBAC 依存的な NF- κ B 活性化に与える影響を検証するため LAP1 の機能欠失型変異体を作製し、NF- κ B レポーターアッセイや定量 PCR 法を実施する。

② LUBAC は HOIL-1L/HOIP/SHARPIN の 3 つのサブユニットで構成され、安定な複合体を形成することで最大限の酵素活性を発揮する。ここに、LAP1 が介在すると LUBAC の安定性に影響を及ぼすか、ウエスタンブロット法やゲルろ過クロマトグラフィーを用いたタンパク質複合体の解析から検証する。

(2) LAP1 の生体防御応答における機能解析

LAP1 は炎症・免疫・細胞死などの生体防御応答における機能は未知であるが、LUBAC と相互作用することから、NF- κ B 経路を中心に生体防御応答の制御に関与することが期待される。そこで、CRISPR/Cas9 系で LAP1 欠損細胞及び LAP1 欠損マウスを作製し、炎症や細胞死における LAP1 の機能を解析する。

4. 研究成果

(1) LAP1 による LUBAC 制御の分子メカニズムの解明

① まず、E3 酵素活性を有する野生型 LAP1 が TNF- α あるいは LUBAC を介した NF- κ B の活性化に対してどのような影響を及ぼすかレポーターアッセイにて検証した。その結果、LAP1 の過剰発現に伴い NF- κ B の活性化が顕著に抑制されることが明らかとなった。一方、E3 活性欠失変異体は NF- κ B 抑制能が有意に減弱し、追加で機能ドメインに変異を導入した機能欠失変異体ではほぼ完全に同抑制能が損なわれるという結果が得られた。さらに、LAP1 を過剰発現させた HEK293 細胞では TNF- α 刺激により誘導される NF- κ B シグナリングや NF- κ B 標的遺伝子の発現が顕著に減弱することが確認された。また、LAP1 の TNFR1 シグナル経路における生理的役割を支持する重要な結果として、内在性の LAP1 と LUBAC の相互作用が TNF- α 刺激下で誘導されることを見出した。以上の結果から、LAP1 は TNF- α や LUBAC 依存的な NF- κ B 活性化の抑制に寄与していることが明らかとなった。

② LAP1 が LUBAC と相互作用し、LUBAC のプロテアソーム分解を誘導する可能性を考慮し、LAP1 過剰発現に伴う LUBAC の発現量変化や LAP1 欠損細胞における LUBAC 構成因子のタンパク質半減期をウェスタンブロット法にて解析した。しかし、現在までに LAP1 の E3 活性依存的な LUBAC の分解誘導を支持する決定的な証拠は得られていない。次に、LAP1 が相互作用することで LUBAC の複合体としての統合性に影響を及ぼしているか検証するため、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて複合体の分子量を解析した。その結果、LAP1 の過剰発現に伴う LUBAC 複合体(約 600kDa)の分子量に顕著な変化は認められなかった。これらの結果から、LAP1 は LUBAC 複合体の安定性には関与しない方法で NF- κ B 経路を制御している可能性が示唆された。今後、本制御の分子機構の可能性として、LAP1 が LUBAC と協調し、複合型 Ub 鎖の形成に関与するか検証を進める(図 2)。

(2) LAP1 の生体防御応答における機能解析

LAP1 の生体防御応答における生理機能を解析するため、CRISPR/Cas9 系により複数の細胞種において LAP1 欠損細胞を樹立した。また、同様に CRISPR/Cas9 系で LAP1 欠損マウスを作製し、LAP1 欠損マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を樹立した。TNF- α 刺激に伴う NF- κ B シグナリングや NF- κ B 標的遺伝子の発現はいずれの LAP1 欠損細胞においても亢進が認められ、LAP1 の NF- κ B 経路を負に制御する機能が再確認された。

生体防御機構としてアポトーシスによる細胞死は病原体の拡散防止と排除を担っているが、ある種の病原体はアポトーシスを妨害することで自身の生存を確保しようとする。この場合、アポトーシスのイニシエーターである Caspase-8 によってそれまで不活性化されていたネクロプトーシスの実行因子が活性化可能となり、炎症を伴う細胞死が代替的に誘導されて病原体排除に至る。このように、アポトーシスとネクロプトーシスの経路は連絡しており、細胞状況に依拠する巧妙なスイッチング機構が存在する。一方、本機構の破綻は不要で過剰なネクロプトーシスをもたらし、炎症性疾患の病態形成に深く関与することが知られている。従って、両細胞死経路の統合的な解析は生体防御応答の理解に必要不可欠である。そこで次に、LAP1 欠損 MEF を用いて細胞死制御における LAP1 の役割を検証した。その結果、LAP1 欠損 MEF は TNF 受容体 (TNFR1) を介して誘導される外因性アポトーシスに対して耐性を示すことが明らかとなった。一方、LAP1 欠損 MEF はネクロプトーシスに対して高感受性を示すことが判明した。以上の結果から、LAP1 はアポトーシスに対しては促進的で、ネクロプトーシスに対しては抑制的に機能する抗炎症性因子としての可能性が示唆された。本制御機構における LUBAC の意義を明らかにすることが今後の課題である(図 2)。また、LAP1 欠損マウスの生体防御応答に関する解析を進めたところ、LPS 誘導性の敗血症に対して強い脆弱性を示すことが明らかとなった。今後、ネクロプトーシス高感受性の分子機構を含め、病態との連関を精査する予定である。

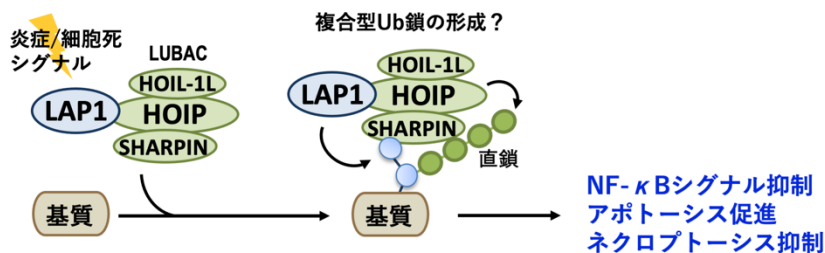


図 2. LAP1 の生体防御応答における機能と LUBAC の関与

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimizu Kouhei, Gi Min, Suzuki Shugo, North Brian J., Watahiki Asami, Fukumoto Satoshi, Asara John M., Tokunaga Fuminori, Wei Wenyi, Inuzuka Hiroyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109988 ~ 109988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109988	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 該当する

1. 著者名 Iwasaki Naruhito, Terawaki Seigo, Shimizu Kouhei, Oikawa Daisuke, Sakamoto Hirokazu, Sunami Kishiko, Tokunaga Fuminori	4. 巻 70
2. 論文標題 Th2 cell-derived histamine is involved in nasal Th2 infiltration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 539 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00011-021-01458-x	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 -

1. 著者名 Iwasaki Naruhito, Terawaki Seigo, Shimizu Kouhei, Oikawa Daisuke, Sakamoto Hirokazu, Sunami Kishiko, Tokunaga Fuminori	4. 巻 16
2. 論文標題 Th2 cells and macrophages cooperatively induce allergic inflammation through histamine signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248158	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳永 文稔, 寺脇正剛, 及川 大輔, 清水 康平
2. 発表標題 Cellular functions regulated by complex-type ubiquitination including linear polyubiquitin chain
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 康平, Tran Thi Thuy Linh, 及川 大輔, 小迫 英尊, 高橋 宏隆, 澤崎 達也, 徳永 文稔
2. 発表標題 A novel LUBAC-associated protein regulates NF- B activation, apoptosis and necroptosis pathways
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 康平, 魏 民, 鈴木 周五, 徳永 文稔, 犬塚 博之, Wenyi Wei
2. 発表標題 p300-mediated acetylation promotes MCL1 stabilization and tumorigenesis
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 及川 大輔, 魏 民, 小迫 英尊, 清水 康平, 塩田 正之, 高橋 宏隆, 澤崎 達也, 徳永 文稔
2. 発表標題 Identification of OTUD1 deubiquitinase as a regulator for innate immune responses, cell death, and inflammatory bowel disease
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tran Thi Thuy Linh, 清水 康平, 及川 大輔, 高橋 宏隆, 澤崎 達也, 徳永 文稔
2. 発表標題 A novel LUBAC-associated protein plays important roles in inflammatory response through regulation of programmed cell death
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kouhei Shimizu, Hiroyuki Inuzuka
2. 発表標題 Acetylation-dependent mechanism of MCL1 stabilization in cancers
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪市立大学大学院医学研究科分子病態学 http://osaka-cu-1seika.umin.jp/index.html

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