

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790279

研究課題名(和文)直鎖状ポリユビキチン鎖依存的NF- κ B活性化におけるp97/VCPの役割研究課題名(英文)Roles of p97/VCP in linear ubiquitin mediated NF- κ B activation

研究代表者

中川 朋子(Nakagawa, Tomoko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90623976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：LUBACは3種のサブユニットから構成され、VCPは直鎖状ポリユビキチン鎖生成の活性中心であるHOIPのPUBドメインと結合する。HOIP欠損細胞に野生型HOIPあるいはPUBドメインを変異したHOIPを発現させたところ、変異型HOIP発現細胞の方がTNF- α 依存的なNF- κ B活性化が亢進していた。そこで、質量分析にてPUBドメインに結合するタンパク質を検索し、直鎖状ポリユビキチン鎖特異的な2種の脱ユビキチン化酵素(CYLD、OTULIN)を同定した。驚いたことに、CYLDとOTULINは直接PUBドメインと結合し、NF- κ B活性化を負に制御していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The LUBAC ubiquitin ligase is composed of three subunits, HOIP, HOIL-1L and SHARPIN. LUBAC possesses multiple domains, but the role of the PUB domain that exists in the N-terminal region of HOIP had not been addressed. The PUB domain has been identified as a binding domain of p97/VCP. Since p97/VCP has shown to regulate NF- κ B activation negatively, we examined the role of the PUB domain in LUBAC mediated NF- κ B activation. To our surprise, in cells expressing a HOIP mutant, which cannot bind p97/VCP, both NF- κ B activation and linear polyubiquitination of NEMO mediated by TNF- α were augmented. We then sought proteins bound to the PUB domain of HOIP and found that two deubiquitinases, OTULIN and CYLD, that specifically cleaved linear chains as interacting proteins of HOIP PUB. Both OTULIN and CYLD bind to the PUB domain of HOIP directly and down-regulated LUBAC-mediated NF- κ B activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：PUBドメイン LUBAC 直鎖状ポリユビキチン鎖 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属研究室では HOIL-1L、HOIP、SHARPIN の3種のタンパク質から構成される LUBAC ユビキチンリガーゼによって選択的に生成される直鎖状ポリユビキチン鎖を世界に先駆けて発見し、LUBAC が NF-κB 活性化に関与することを示してきた (Nature Cell Biology, 2009、Nature, 2011)。

NF-κB は TNF-α、IL-1β、Toll 様受容体のリガンド、紫外線などによって活性化される転写促進因子であり、関節リウマチをはじめとする免疫・アレルギー性疾患、ある種のガンで活性亢進が報告されている。それゆえ、種々の刺激依存的な NF-κB 活性化機構についても精力的に研究されてきたが、そのメカニズムはまだ完全には解明されていない。

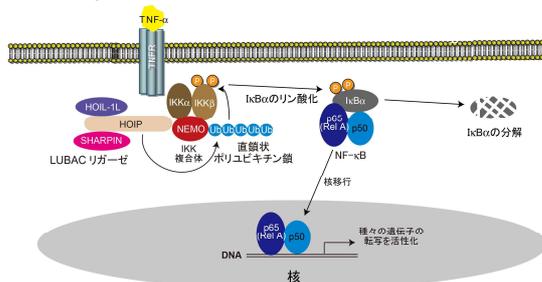


図1 直鎖状ポリユビキチン鎖による NF-κB 活性化機構

図1に LUBAC による NF-κB 活性化機構を示す。NF-κB は Rel ファミリータンパク質の2量体からなる転写因子であり(図では p65/p50)、未刺激状態では阻害タンパク質である IκBα と結合して細胞質に存在する。細胞が TNF-α などで刺激されると、LUBAC は TNF 受容体にリクルートされ、IKK 複合体の活性調節サブユニットである NEMO と結合して直鎖状ポリユビキチンを付加する。その結果、活性化された IKK 複合体が IκBα をリン酸化依存的な分解に導き、IκBα から遊離した NF-κB が核に移行して活性化される。

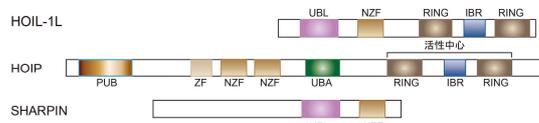


図2 LUBAC を構成する3つのサブユニットの構造

図2に LUBAC リガーゼの模式図を示す。LUBAC の3つのサブユニットのうち、HOIP が直鎖状ポリユビキチン鎖生成の活性中心である。HOIP のN末端に存在する PUB ドメインは VCP/p97 と結合するドメインであり、申請者は HOIP が PUB ドメインを介して VCP と結合することを確認している。VCP は細胞内タンパク質の約1%を占めるホモ6量体を形成する AAA タイ

プの ATPase であり、複合体のあるサブユニットを部分的にアンフォールドして、複合体から遊離する segregase 活性を有していると考えられている。VCP は1. ミスフォールドした膜タンパク質が ER から細胞質に逆行性に輸送されてユビキチン依存的に分解される ER 関連分解や (Cell 2001)、2. Mitosis の完了時に Aurora B キナーゼをクロマチンからはずす (Nature 2007) 等の多彩な作用を発揮するが、協調して働く結合分子の種類によって作用が異なることが示唆されている。また、VCP はユビキチン鎖を認識して作用することが多いので、「ユビキチンシャペロン」とも呼ばれている。

IKK 複合体は IKKα、IKKβ、NEMO からなり、IKKβ がリン酸化されることで活性化されて IκBα をリン酸化する。LUBAC は NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することで IKK の活性化を導くので、申請者は VCP が LUBAC と結合して活性のある TNF 受容体複合体などにリクルートされることで、IKK 複合体に何らかの作用を及ぼすことにより IKK の活性化に関与する可能性を考え、本年報告された VCP 阻害剤 (PNAS 2011) で細胞を処理したところ、IKK の活性化が阻害された。

2. 研究の目的

本研究では、LUBAC による VCP の TNF 受容体複合体など活性の場合へのリクルートが、IKK 複合体の活性化において果たす役割を明らかにする。具体的には、

1. VCP による IKK 活性化の分子機構
2. HOIP の PUB ドメインを介した LUBAC と VCP との結合が IKK 活性化に果たす役割
3. LUBAC による NEMO の直鎖状ポリユビキチン化と VCP が相乗的に IKK を活性化に導く可能性

の解析を進める。加えて、1998年に報告されたが、いまだコンセンサスが得られていない、VCP が IκBα の分解に関与する可能性についての検索も計画している。

3. 研究の方法

HOIP に存在するドメインのうち、RING-IBR-RING ドメインは直鎖状ポリユビキチン鎖生成の活性中心、UBA ドメインは HOIL-1L、SHARPIN との結合領域、ZF、NZF ドメインは基質である NEMO との結合領域であり、直鎖状ポリユビキチン鎖による NF-κB 活性化における役割が解明されている。しかし、PUB ドメインは p97/VCP と結合することは予備的実験で確認しているが、NF-κB 活性化における役割は明確に

はなっていない。

そこで本研究では、試験管内IKK活性化反応や申請者らが樹立しているHOIP欠損細胞へのVCP結合能、あるいはユビキチンリガーゼ活性を欠失したHOIP変異体などの導入実験などを用いて、VCPのIKK活性化における役割とHOIPのPUBドメインを介したLUBACとVCPの結合のIKK活性化における役割を解析し、LUBACによるNEMOの直鎖状ポリユビキチン化とVCPが相乗的にIKKを活性化に導く可能性を以下の2点から検索する。

1. LUBACによるVCPのリクルートのNF- κ B活性化への関与の検索

PUBドメインとVCPの結合に必至なアミノ酸は既知であるので、そのアミノ酸変異させたHOIP変異体あるいは野生型HOIPを導入したHOIP欠損細胞を作製する。

まず、PUBドメイン変異HOIPがVCPと結合しないことを確認する。その後、両細胞を種々の濃度のTNF- α で刺激し、VCP結合能を消失したHOIP変異体導入細胞と野生型HOIP導入細胞のNF- κ B活性化の程度をIkB α のリン酸化能、分解を指標に検索し、VCPのリクルートがNF- κ B活性化を増強するか、抑制するかを検索する。

2. LUBACによるVCPのリクルートのNEMOの直鎖状ポリユビキチン化に与える影響の検索

さらに、VCP結合能を消失したHOIP変異体あるいは野生型HOIPを導入したHOIP欠損細胞をTNF- α で刺激後のNEMOの直鎖状ポリユビキチン化を検出し、VCPのLUBACの直鎖状ポリユビキチン鎖生成能に与える影響を検索する。

4. 研究成果

1. HOIPのPUBドメインはVCPではなく、直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に切断する脱ユビキチン化酵素(DUB)であるOTULIN、CYLDと選択的に結合する。

項目1で記載したように、予備的検討でHOIPのPUBドメイン(図2)を介してVCP/p97と結合することを確認しており、VCP/p97はNF- κ B活性化を負に制御することが報告されていた。すでに報告されているPNGaseのPUBドメインのX線立体構造解析の結果から、VCPとの結合に必須なアミノ酸は知られていたため、それらのアミノ酸をアラニンに変異したHOIP変異体(HOIP Y84A/Y93A)を作製した。予想通りHOIP Y84A/Y93AはVCPと結合できなかったため、HOIP Y84A/Y93Aを導入してNF- κ Bを検索したところ、研究代表者らの予想に

反してHOIP Y84A/Y93AはNF- κ B活性化を亢進した。さらに、HOIP Y84A/Y93Aを導入した細胞では細胞内の直鎖状ポリユビキチン鎖の量が著増していた。そこで、

- a. HOIP Y84A/Y93Aを含有するLUBACは直鎖状ポリユビキチン鎖生成活性が上昇する。
- b. HOIPがPUBドメインで脱ユビキチン化酵素と結合する。

上記の2つの可能性を区別するためにHOIP、HOIP Y84A/Y93A導入細胞からそれらを免疫沈降したところ、野生型HOIPを含有する免疫沈降物にのみ、直鎖状ポリユビキチン鎖を切断する活性が見出された。そこで、PUBドメインに選択的に結合するタンパク質を質量分析で同定したところ、直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に切断する2つの脱ユビキチン化酵素、OTULINとCYLDがPUBドメインを介して結合することを見出した。(CYLDはK63鎖も切断する。) 内在性のHOIPは細胞の刺激の有無に拘わらず、内在性のOTULIN、CYLDの両方と結合していた。また、OTULIN、CYLDは1つのLUBAC複合体中にも結合していた。

2. HOIPとOTULIN、CYLDとの結合は刺激依存的なNF- κ Bの活性化に微細な調整に関与している。

HOIPとCYLD、OTULINの結合の生理学的意義についても検索を進めた。

野生型HOIPあるいはHOIP Y84A/Y93AをSHARPIN、HOIL-1Lと一緒に細胞に発現し、HOIPあるいはHOIP Y84A/Y93Aを含有するLUBAC複合体を免疫沈降し、その直鎖状ポリユビキチン鎖生成活性を検討したところ、HOIP Y84A/Y93A含有LUBACの方がより多くの直鎖状ポリユビキチン鎖を生成した。siRNAを用いてOTULIN、CYLDの発現を抑制した細胞から免疫沈降した野生型HOIPを含有するLUBAC複合体はHOIP Y84A/Y93A含有LUBACとほぼ同程度の直鎖状ポリユビキチン鎖を生成したので、HOIPに結合しているOTULIN、CYLDはLUBACが生成する直鎖状ポリユビキチン鎖を切断することで直鎖状ポリユビキチン鎖の長さ、数を調節していると考えられた。次にNF- κ B活性化への影響を検索したところ、HOIP Y84A/Y93Aは野生型HOIPに比べ、NF- κ Bをより強く活性化させた。また、OTULIN、CYLDの共発現によってHOIPによるNF- κ B活性化は顕著に抑制されたが、HOIP Y84A/Y93AによるNF- κ B活

性化は顕著には抑制されなかった。
これらの結果から、この直鎖状ユビキチン鎖特異的リガーゼと脱ユビキチン化酵素の結合は刺激依存的な NF- κ B 活性化の強度を適切なレベルに保つ役割を果たしていると考えられた。

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1件)

Takiuchi, T., Nakagawa, T., Tamiya, H., Fujita, H., Sasaki, Y., Saeki, Y., Takeda, H., Sawasaki, T., Buchberger, A., Kimura, T., and Iwai, K. Suppression of LUBAC-mediated linear ubiquitination by a specific interaction between LUBAC and the deubiquitinases CYLD and OTULIN. **Genes Cells**. 19:254-272, 2014.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 朋子 (NAKAGAWA Tomoko)

京都大学・大学院医学研究科・特定研究員

研究者番号：90623976