

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460356

研究課題名(和文) A20によるcIAP1制御の分子機構と疾患発症における意義

研究課題名(英文) The mechanisms of A20-mediated control of cIAP1 and its involvement in diseases.

## 研究代表者

山口 憲孝 (Yamaguchi, Noritaka)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80399469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：A20はN末端のOTUドメインとC末端側の7つのzinc finger motif (ZnF)より構成され、OTUドメインを介して脱ユビキチン化酵素として働く一方で、4番目のZnFを介してユビキチン結合酵素としても働く。A20はこれらの酵素活性依存的な機構により転写因子NF- $\kappa$ Bを抑制すると考えられている。本研究では、A20が7番目のZnF (ZnF7)を介して別のユビキチン結合酵素cIAP1の制御を行いNF- $\kappa$ Bの活性化や細胞死抑制を導くことを明らかにした。ZnF7はBリンパ腫において高頻度に変異が認められることから、cIAP1制御の破綻が疾患発症に寄与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitin editing enzyme A20 is composed of an N-terminal OTU domain and 7 C-terminal zinc finger motifs (ZnFs). A20 functions as a de-ubiquitinating enzyme through the OTU domain and as an ubiquitin E3 ligase through the 4th ZnF. A20 suppresses activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B in an enzymatic activity-dependent manner. In this study, A20 was found to directly bind to another ubiquitin E3 ligase cIAP1 through the 7th ZnF (ZnF7) and induce activation of NF- $\kappa$ B and suppression of apoptosis by controlling cIAP1. Because ZnF7 is frequently mutated in B-cell lymphoma, defects in control of cIAP1 by A20 may be involved in progression of this disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：シグナル伝達 ユビキチン

### 1. 研究開始当初の背景

NF- $\kappa$ B は炎症・免疫反応や細胞増殖・分化を制御する重要な転写因子である。通常、NF- $\kappa$ B は抑制タンパク質 I $\kappa$ B と結合して細胞質にて不活化されており、細胞がサイトカイン等の刺激を受けると様々なシグナル伝達因子の活性化を介して I $\kappa$ B のリン酸化とプロテアソーム分解が誘導され NF- $\kappa$ B の核移行と標的遺伝子発現が導かれる。活性化した NF- $\kappa$ B は、炎症反応や細胞増殖・分化に関わる遺伝子群に加えて NF- $\kappa$ B 抑制因子の I $\kappa$ B や A20 も発現誘導するため、正常細胞では NF- $\kappa$ B の活性化は一過性に制御される。しかし、シグナル伝達因子の遺伝子変異等により NF- $\kappa$ B が持続的に活性化されると慢性的な炎症・免疫反応や細胞増殖シグナルを誘導し、がんや自己免疫疾患などの様々な疾患を惹起すると考えられている。

NF- $\kappa$ B の活性化はシグナル伝達因子のユビキチン化によって制御される。炎症性サイトカインの TNF は、受容体に結合すると細胞内のユビキチン結合酵素 cIAP1 を活性化し、アダプタータンパク質 RIP1 の Lys63 型ポリユビキチン化を誘導する。Lys63 型ポリユビキチン鎖は、ユビキチンの Lys63 を介して連なるポリユビキチン鎖であり、プロテアソーム分解を導く Lys48 型ポリユビキチン鎖とは異なりシグナル伝達因子の会合を導く足場として働く。RIP1 の Lys63 型ユビキチン鎖は、I $\kappa$ B のリン酸化とプロテアソーム分解を誘導するタンパク質キナーゼ I $\kappa$ B kinase (IKK) を活性化し、NF- $\kappa$ B の核移行を誘導する。

ユビキチン化修飾酵素 A20 は NF- $\kappa$ B の重要な抑制因子であり、A20 遺伝子変異は NF- $\kappa$ B の持続的活性化を引き起こし B リンパ腫や自己免疫疾患の発症に寄与している。A20 は OTU ドメインと 7 つの zinc finger motif (ZnF) から構成されており、OTU ドメインを介した脱ユビキチン化活性と、4 番目の ZnF (ZnF4) を介したユビキチン結合活性の 2 つの相反する酵素活性を示す。TNF

刺激においては、A20 は、まず OTU ドメインにて RIP1 の Lys63 型ポリユビキチン鎖の分解を促進し、続いて ZnF4 にて RIP1 の Lys48 型ポリユビキチン化とプロテアソーム分解を誘導し、NF- $\kappa$ B を抑制すると考えられている。実際に、A20 遺伝子を欠損した A20 ノックアウトマウスは NF- $\kappa$ B 持続的活性化を引き起こし自己免疫疾患の病態を呈する。また、ヒトにおいても SLE などの自己免疫疾患と A20 遺伝子変異の関連が報告されている。ヒト B リンパ腫においても、高頻度に A20 遺伝子変異が見つかったが、興味深いことに、B リンパ腫において認められる A20 変異の共通点は OTU ドメインや ZnF4 と異なる C 末端の欠損であったことから、申請者は A20 の C 末端には未知の重要な機能があると予想した。そこで、申

請者らはプロテオーム解析により A20 結合因子の探索を行い、A20 が cIAP1 と結合することを見いだした。A20 における cIAP1 との結合に必要な領域を探索したところ、A20 の C 末端欠損や C 末端に存在する 7 番目の ZnF (ZnF7) の変異により cIAP1 との結合が抑制されたことから、A20 は C 末端の ZnF7 を介して cIAP1 と結合することがわかった。A20 の C 末端部と cIAP1 全長それぞれの大腸菌リコンビナントタンパク質同士にも結合が認められ、両者が直接結合することもわかった。内在 A20 を免疫沈降すると内在 cIAP1 が共沈したことから、細胞内にて確かに A20 が cIAP1 と結合することもわかった。A20 欠損マウス繊維芽細胞では TNF 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化が増加しており、野生型 A20 の導入によりこの増加は抑制された。脱ユビキチン化活性を欠損した OTU 変異型、E3 リガーゼ活性を欠損した ZnF4 変異型、cIAP1 結合能を欠損した ZnF7 変異型それぞれを A20 欠損細胞に導入したところ、OTU 変異型と ZnF4 変異型では NF- $\kappa$ B 活性化の増加は抑制されたが ZnF7 変異型では抑制されなかった。このことから、A20 による NF- $\kappa$ B の抑制には、ユビキチン修飾の酵素活性よりも ZnF7 を介した cIAP1 との結合が重要であることが示された。

### 2. 研究の目的

本研究では、ユビキチン化修飾酵素として考えられている A20 が C 末端の ZnF7 を介して cIAP1 を制御する機能をもつことに着目し、A20 による cIAP1 制御の分子機構や生理的役割について解析することを目的とした。cIAP1 は、RIP1 の Lys63 型ポリユビキチン化誘導を介して NF- $\kappa$ B を活性化するだけでなく、NF- $\kappa$ B 活性化因子 NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) の Lys48 型ポリユビキチン化とプロテアソーム分解を導いて NF- $\kappa$ B を抑制する機能やアポトーシスを抑制する機能をもつことから、cIAP1 のこれらの機能と A20 の関わりについて解析を行なった。

### 3. 研究の方法

293T 細胞を用いて A20 野生型と ZnF7 変異体それぞれの安定発現株を作製した。これらの細胞株を用いて、NIK の安定性や NIK 依存的な NF- $\kappa$ B の活性化、およびアポトーシス抵抗性を解析した。次に、A20 欠損マウス繊維芽細胞に A20 野生型と ZnF7 変異体それぞれを戻した安定発現株を用いて、同様の解析を行なった。

### 4. 研究成果

まず、A20 野生型と ZnF7 変異体それぞれを安定発現する 293T 細胞を用いて NIK の安定性を解析すると、野生型発現細胞では NIK 安定性が上昇している一方で、ZnF7 変異体発現

細胞では 293T 親株と変化がなかった。NIK 依存的な NF- $\kappa$ B 活性化についても調べてみると、A20 野生型発現株では上昇していることがわかった。A20 遺伝子を戻した欠損線維芽細胞においても、同様に A20 野生型発現によって NIK の安定性と NIK 依存的 NF- $\kappa$ B 活性化が上昇していることがわかった。これらのことから、A20 は ZnF7 を介した cIAP1 の制御によって NIK を安定化し NF- $\kappa$ B を活性化する機能を持つことが示された。A20 の結合によって cIAP1 の機能が抑制されていることが予想されたため、cIAP1 と NIK の結合を解析すると、A20 の存在によって cIAP1 と NIK の結合が解離することがわかった。以上の結果より、A20 は cIAP1 に結合して cIAP1 と NIK の結合を阻害し NIK の安定化と NF- $\kappa$ B 活性化を誘導することが明らかとなった (Scientific Reports 2013)。

次に、cIAP1 によるアポトーシス抑制への影響を解析した。A20 を発現させた 293T 細胞や A20 欠損細胞を用いて、TNF によるアポトーシス誘導実験を行なったところ、A20 野生型発現ではアポトーシスが抑制されたが、ZnF7 変異体では抑制されなかった。cIAP1 の自己分解を誘導する cIAP1 阻害薬存在下では、A20 発現によるアポトーシス抑制能が認められなかった。これらのことから、A20 による ZnF7 を介した cIAP1 の制御がアポトーシス抑制に必要であることが示された (FEBS Letters 2015)。現在、アポトーシス抑制に関わる cIAP1 のターゲットについて解析を行なっている。

本研究により、A20 による ZnF7 を介した cIAP1 の制御が、NIK の安定化による NF- $\kappa$ B 活性化やアポトーシス抑制に関わっていることが初めて明らかとなった。A20 の欠損によって NF- $\kappa$ B が持続的に活性化し癌や自己免疫疾患を誘導することは既に知られているが、本成果により、A20 の機能が強すぎても NF- $\kappa$ B 活性化やアポトーシス抑制によって癌や炎症が引き起こされる可能性があることがわかった。実際に、一部の脳腫瘍では A20 の高発現が癌細胞の増殖・生存を促進していることも報告されており、これらの細胞における cIAP1 の機能について解析する必要がある。また、今後はマウスモデルを用いて個体レベルで A20 による cIAP1 制御の重要性を解析していきたい。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件) 全て査読有り

1) Noritaka Yamaguchi, Ryuzaburo Yuki, Sho Kubota, Kazumasa Aoyama, Takahisa Kuga, Yuuki Hashimoto, Takeshi Tomonaga, and Naoto Yamaguchi.

c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of JunB is required for Adriamycin-induced expression of p21.

**Biochemical Journal** 471: 67-77 (2015)

2) Noritaka Yamaguchi and Naoto Yamaguchi. The seventh zinc finger motif of A20 is required for the suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. **FEBS Letters** 589: 1369-1375 (2015)

3) Kazumasa Aoyama<sup>1</sup>, Noritaka Yamaguchi<sup>1</sup>, Ryuzaburo Yuki<sup>1</sup>, Mariko Morii, Sho Kubota, Kensuke Hirata, Kohei Abe, Takuya Honda, Takahisa Kuga, Yuuki Hashimoto, Takeshi Tomonaga, and Naoto Yamaguchi. (<sup>1</sup>co-first author)

c-Abl induces stabilization of histone deacetylase 1 (HDAC1) in a kinase activity-dependent manner.

**Cell Biology International** 39: 446-456 (2015)

4) Takao Seki, Mami Yamamoto, Yuu Taguchi, Mai Miyauchi, Nobuko Akiyama, Noritaka Yamaguchi, Jin Gohda, Taishin Akiyama, and Jun-ichiro Inoue.

Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in Relb-Venus knock-in mice.

**Journal of Biochemistry** 158: 485-495 (2015)

5) Mai Okamoto, Yuji Nakayama, Ayane Kakihana, Ryuzaburo Yuki, Noritaka Yamaguchi, and Naoto Yamaguchi.

Fyn Accelerates M Phase Progression by Promoting the Assembly of Mitotic Spindle Microtubules. **Journal of Cellular Biochemistry** 117: 894-903 (2015)

6) Ryuzaburo Yuki, Kazumasa Aoyama, Sho Kubota, Noritaka Yamaguchi, Sho-ichi Kubota, Hitomi Hasegawa, Mariko Morii, Xiayu Huang, Kang Liu, Roy Williams, Michiko Fukuda, and Naoto Yamaguchi.

Overexpression of Zinc-finger protein 777 (ZNF777) inhibits proliferation at low cell density through down-regulation of FAM129A.

**Journal of Cellular Biochemistry** 116: 954-968 (2015)

7) Sho Kubota, Mariko Morii, Ryuzaburo Yuki, Noritaka Yamaguchi, Hiromi Yamaguchi, Kazumasa Aoyama, Takahisa Kuga, Takeshi Tomonaga, and Naoto Yamaguchi.

Role for tyrosine phosphorylation of A-kinase anchoring protein 8 (AKAP8) in its dissociation from chromatin and the nuclear matrix.

**Journal of Biological Chemistry** 290: 10891-10904 (2015)

8) Hitomi Hasegawa, Ken-ichi Ishibashi, Sho-ichi Kubota, Chihiro Yamaguchi, Ryuzaburo Yuki, Haruna Nakajo, Richard Eckner, Noritaka

Yamaguchi, Kazunari K. Yokoyama, and Naoto Yamaguchi.

Cdk1-mediated phosphorylation of human ATF7 at Thr-51 and Thr-53 promotes cell-cycle progression into M phase.

**PLoS One** 9: e116048 (2014)

9) Taku Ito-Kureha, Naohiko Koshikawa, Mizuki Yamamoto, Kentaro Semba, Noritaka Yamaguchi, Tadashi Yamamoto, Motoharu Seiki, and Jun-ichiro Inoue.

Tropomodulin 1 Expression Driven by NF- $\kappa$ B Enhances Breast Cancer Growth.

**Cancer Research** 75: 62-72 (2014)

10) Takao Morinaga, Kohei Abe, Yuji Nakayama, Noritaka Yamaguchi, and Naoto Yamaguchi.

Activation of Lyn tyrosine kinases through decreased membrane distributino upon cell detachment.

**Journal of Biological Chemistry** 289: 26327-26343 (2014)

11) Sho-ichi Kubota, Yasunori Fukumoto, Ken-ichi Ishibashi, Shuhei Soeda, Ryuzaboro Yuki, Yuji Nakayama, Kazumasa Aoyama, Noritaka Yamaguchi, and Naoto Yamaguchi

Activation of the prereplication complex is blocked by mimosine through reactive oxygen species-activated ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein without DNA damage.

**Journal of Biological Chemistry** 289: 5730-5746 (2014)

12) Noritaka Yamaguchi, Masaaki Oyama, Kozuka-Hata Hiroko, and Jun-ichiro Inoue.

Involvement of A20 in the molecular switch that activates the non-canonical NF- $\kappa$ B.

**Scientific Reports** 3: 2568 (2013)

13) Mizuki Yamamoto, Yuu Taguchi, Taku Ito, Kentaro Semba, Noritaka Yamaguchi, and Jun-ichiro Inoue.

NF- $\kappa$ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype.

**Nature Communications** 4: 2299 (2013)

14) Kazumasa Aoyama, Ryuzaburo Yuki, Yasuyoshi Horiike, Sho Kubota, Kenichi Ishibashi, Mariko Morii, Noritaka Yamaguchi, Takahisa Kuga, Takeshi Tomonaga, and Naoto Yamaguchi.

Formation of long and winding nuclear F-actin bundles by nuclear c-Abl tyrosine kinase.

**Experimental Cell Research** 319: 3251-3268 (2013)

[学会発表](計16件)

1) Involvement of tyrosine phosphorylation of the pioneer transcription factor FoxA1 in the estrogen signaling.

The 2016 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Nuclear Receptors (Snowbird, Utah, U.S.A., 2016.1.13)

Yamaguchi, N.-t., Shibazaki, M., Yamada, C., Anzai, R., and Yamaguchi, N.

2) Search for a tyrosine-phosphorylated protein involved in Src-mediated antiapoptosis.

The 2016 Gordon Research Seminar on DNA Damage, Mutation and Cancer (Ventura, California, U.S.A., 2016.3.11)

Morii, M., Kubota, S., Honda, T., Aoyama, K., Yuki, R., Kometani, S., Yamaguchi, N.-t., and Yamaguchi, N.

3) c-Ablを介したTGF-betaシグナル制御のメカニズム解析.

第136回日本薬学会年会(横浜, 2016.3.27)

帯刀 隆, 幸 龍三郎, 岩澤脩斗, 鈴木 亘, 山口憲孝, 山口直人.

4) c-AblはFOXA1のチロシンリン酸化を介してエストロゲンシグナルを増強する.

第136回日本薬学会年会(横浜, 2016.3.27)

柴崎美里, 山口憲孝, 久保田 翔, 青山和正, 中條暖奈, 山口弘美, 山口直人.

5) v-Srcによるチロシンリン酸化を介した細胞周期進行異常と細胞周期抑制因子の増加.

BMB2015(第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会)(神戸, 2015.12.2)

本田拓也, 中山祐治, 添田修平, 阿部紘平, 森井真理子, 山口千尋, 鈴木 亘, 久保田 翔, 青山和正, 山口憲孝, 山口直人.

6) UV照射によるアポトーシス誘導におけるSrcシグナリングの役割.

BMB2015(第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会)(神戸, 2015.12.2)

森井真理子, 久保田 翔, 本田拓也, 青山和正, 幸 龍三郎, 米谷詩織, 山口憲孝, 山口直人.

7) チロシンリン酸化依存的な微小管結合分子の局在変化.

第14回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2015(千葉, 2015.9.12)

米谷詩織, 森井真理子, 武田祐美, 青山和正, 大牟田 舞, 山口憲孝, 山口直人.

8) ErbB4による核内チロシンリン酸化シグナルを介したヒストンメチル化制御.

第14回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2015(千葉, 2015.9.12)

中條暖奈, 石橋賢一, 青山和正, 久保田 翔, 長谷川仁美, 柴崎美里, 山口弘美, 山口憲孝.

山口直人.

9) ユビキチン化修飾酵素A20はユビキチン結合酵素cIAP1を介してNF-kappaBと細胞死を制御する.  
第135回日本薬学会年会 (神戸, 2015.3.27)  
山口憲孝, 山口直人.

10) c-Ablの新規核内基質の同定とDNA損傷応答への関与.  
第37回 日本分子生物学会年会 (横浜, 2014.11.26)  
山口憲孝, 久保田 翔, 幸 龍三郎, 青山和正, 山口直人.

11) MDCK 細胞浮遊化における Lyn の局在変化.  
第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (徳島, 2014.11.26)  
盛永敬郎, 柳瀬さゆり, 阿部紘平, 山口憲孝, 山口直人.

12) ゴルジ体の集積と分散におけるSrcの役割.  
第87回日本生化学会大会 (京都, 2014.10.16)  
大牟田 舞, 阿部紘平, 柳瀬さゆり, 米谷詩織, 佐藤里香, 山口憲孝, 山口直人.

13) ヒストン修飾に関わる核内c-Ablの新規チロシンリン酸化基質の同定.  
第134回日本薬学会年会 (熊本, 2014.3.28)  
山口弘美, 久保田 翔, 青山和正, 柴崎美里, 中條暖奈, 山口憲孝, 山口直人.

14) Zinc-finger タンパク質 lastin によるFAM129Aを介した細胞増殖抑制: 細胞密度に依存した制御.  
第134回日本薬学会年会 (熊本, 2014. 3.28)  
幸 龍三郎, 青山和正, 久保田 翔, 阿部紘平, 長谷川仁美, 井出雄大, 九鬼和雅, 富岡貴久, 山口憲孝, 福田道子, 山口直人.

15) The ubiquitin-editing enzyme A20 regulates NF-κB and cell death pathways through regulation of the ubiquitin E3 ligase cIAP1.  
The 2014 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, The Chemistry and Biology of Cell Death (Santa Fe, New Mexico, U.S.A., 2014.2.10)  
Yamaguchi, N.-t., Aoyama, K., Fujiwara, N., Yuki, R., Kubota, S., and Yamaguchi, N.

16) A20の7番目のZinc fingerモチーフはTNFによるアポトーシスの抑制に必要である.  
第36回日本分子生物学会年会 (神戸, 2013.12.4)  
山口憲孝, 柴崎美里, 藤原 希, 本田拓也, 幸龍三郎, 青山和正, 山口直人.

〔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  
山口 憲孝 (YAMAGUCHI Noritaka)  
千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 80399469