

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670137

研究課題名(和文)新規抗癌剤探索を目指した直鎖状ユビキチン識別プローブの作製と活用

研究課題名(英文)Construction and application of linear ubiquitin-specific molecular probes for anti-cancer drug screening

研究代表者

徳永 文稔(Tokunaga, Fuminori)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：00212069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ Bシグナルは、細菌やウイルス感染に反応して、免疫制御や炎症応答に重要な役割を果たします。私たちは、ユビキチンという分子を直鎖状に連結する酵素(LUBACと命名)を見出し、LUBACがNF- κ Bシグナル活性化に必須であることを同定しました。また、直鎖状ユビキチンに選択的に結合するタンパク質ドメイン(A20 ZF7)を発見しました。今回、これを利用して細胞の直鎖状ユビキチン生成変動や直鎖状ユビキチン鎖に選択的に結合する化合物の探索に応用できることを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：NF- κ B signal plays a critical role on immune and inflammatory responses induced by various stimuli such as bacterial and viral infections. We identified a novel enzyme (named LUBAC) that generates head-to-tail-linked linear polyubiquitin chain, and LUBAC is critical for NF- κ B regulation. Furthermore, we identified a protein domain (A20 ZF7), which exhibits linear ubiquitin-specific binding. We here employed the domain to detect intracellular linear ubiquitin and screening for linear ubiquitin-binding chemicals.

研究分野：医化学一般

キーワード：酵素 タンパク質 細胞・組織 バイオテクノロジー 生体機能利用 シグナル伝達 免疫学

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系は、ユビキチン結合の多様性によって、タンパク質分解、シグナル伝達、DNA 修復、エンドサイトーシスなど多彩な細胞機能発現を可能にしており、その機能不全は癌など各種病態に連関する。我々は、HOIL-1L、HOIP、SHARPIN からなるユビキチンリガーゼ複合体(LUBAC)がユビキチンの N 末端を介する「直鎖状ポリユビキチン鎖」という新規ポリユビキチン鎖を生成することを見いだした(*Nat. Cell Biol.*, 2003; *Mol. Cell*, 2005; *EMBO J.*, 2006)。そして、LUBAC は、炎症や免疫制御に重要な NF- κ B 経路を制御することを同定した(*Nat. Cell Biol.*, 2009; *Nature*, 2011)。さらに最近、LUBAC 活性を抑制する脱ユビキチン化酵素として A20 を同定し、A20 の 7 番目の zinc finger (ZF) を介して直鎖状ユビキチンに結合すること、A20 ZF7 の直鎖状ユビキチンへの結合不全変異は B 細胞リンパ腫発症に関連することを突き止めた(*EMBO J.*, 2012)。直鎖状ユビキチン鎖は NF- κ B シグナル制御に特異的に寄与しており、その生成異常や生成過多は多くの疾患に関連する。そこで本研究では、我々の独創的な知見を活用し、癌や慢性炎症などの病態に対する治療薬スクリーニングに用いることを目指して、細胞内直鎖状ポリユビキチン鎖の生成を高感度に検出・定量するシステムを構築するとともに、NF- κ B シグナル伝達経路の解明に活用することを思い立った。

2. 研究の目的

本研究では、直鎖状ユビキチンへの特異的結合性を利用した新規手法により、直鎖状ユビキチンプローブに免疫沈降用タグを付することによって、刺激に伴って直鎖状ユビキチン化される新たな基質タンパク質を同定する、GFP など蛍光タンパク質を付することによって NF- κ B 活性刺激に伴う受容体直下での直鎖状ユビキチン鎖生成を

イメージングする、細胞内の直鎖ユビキチン鎖生成を定量的に測定可能な系を構築する、B 細胞リンパ腫など直鎖状ユビキチンが関連する疾患に対する創薬スクリーニング系を構築することを到達目標とする。

3. 研究の方法

平成 25 年度には直鎖状ユビキチン化タンパク質の網羅的同定のため、Myc-Tev プロテアーゼ部位-FLAG(MEF)タグを付した A20-ZF7 を 3 分子連結した A20-ZF7x3 を細胞内に発現し、各種刺激後に免疫沈降することによって、特異的に直鎖状ユビキチン化される基質タンパク質を選別し、質量分析機によって同定する。さらに、GFP に A20-ZF7x3 を融合したプラスミドを安定発現する細胞を構築し、NF- κ B 活性化に伴う GFP-A20-ZF7x3 の細胞内局在や細胞表面への移行を全反射蛍光顕微鏡にて測定する。また、A20-ZF7x3 を用いた ELISA 系を構築し、細胞内直鎖状ユビキチン量を定量化する。平成 26 年度にはこれらを発展させ、新規直鎖状ユビキチン化タンパク質の機能解析を行い、NF- κ B 経路の新展開を図るとともに、病理組織における直鎖状ユビキチン測定と薬剤探索の基礎解析を行う。

4. 研究成果

我々は、A20 ZF7 が $K_d = 9 \mu\text{M}$ で直鎖状ユビキチンに高い親和性で結合するが、モノユビキチンや K48-ユビキチンや K63-ユビキチンには結合しないことを明らかにした。そこで、A20 ZF7 を直鎖状ユビキチン結合性分子プローブとして、直鎖状に連結した 2 分子のユビキチン(ジユビキチン)および 4 分子のユビキチン(テトラユビキチン)との結合を特異的にモニターするアッセイ系を構築した。この系を活用することで阻害剤探索が可能になり、化合物ライブラリーを検索することで A20 ZF7 と直鎖状ユビキチンとの結合を阻害する可能性がある化合物の絞り込みを

行っている。また、直鎖状ユビキチン特異的結合ドメインとしてしられる NEMO UBAN ドメイン ($K_d = 1.4-1.6 \mu\text{M}$) や HOIL-1L NZF ドメイン ($K_d = 17 \mu\text{M}$) を分子プローブとして用いることで、これらの化合物の直鎖状ユビキチン特異的結合性の解析を進めている。さらに、細胞内に A20 ZF7 のタンデムリピート体を発現させると、炎症性サイトカインである TNF- α によって誘導される NF- κ B 活性化の抑制を導くことから、直鎖状ユビキチン鎖に A20 ZF7 が結合することで NF- κ B シグナルに阻害的に働くことが明らかになった。これらの成果から、A20 ZF7 は直鎖状ユビキチン鎖特異的分子プローブとして有用であり、細胞内で直鎖状ユビキチンに結合することで NF- κ B シグナルの制御・調節に利用可能であることが明らかになった。

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9件)

1. Kato, M., Shimizu, A., Yokoyama, Y., Kaira, K., Shimomura, Y., Ishida-Yamamoto, A., Kamei, K., Tokunaga, F., and Ishikawa, O.: A novel autosomal recessive mutation of DSG4 causes monilethrix through the ER stress response. *J. Invest. Dermatol.*, 135(5), 1253-1260, (2015), 査読有.
2. 徳永文稔: 直鎖状ユビキチン鎖による炎症制御 **臨床免疫・アレルギー科**, 63(5), 495-501, (2015), 査読無.
3. Sato, Y., Goto, E., Shibata, Y., Kubota, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., Inoue, J., Takekawa, M., Tokunaga, F., and Fukai, S.: Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 22(3), 222-229, (2015), 査読有.
4. 徳永文稔: 8 番目のユビキチン鎖「直鎖状ユビキチン鎖」の機能と疾患への関わり - 炎症、免疫応答に重要な NF- κ B 経路の新しい制御機構- **化学と生物**, 52(11) 716-718, (2014), 査読無.
5. 櫻井宏明、徳永文稔: 次世代シグナル伝達研究 -先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開- **生化学**, 85(6), 403-404, (2013), 査読無.
6. 徳永文稔: 直鎖状ユビキチン化を介した NF- κ B 制御機構と疾患 **生化学**, 85(6), 414-422, (2013), 査読無.
7. Kato, K., Ishii, R., Goto, E., Ishitani, R., Tokunaga, F., and Nureki, O.: Structural and functional analyses of DNA-sensing and immune activation by human cGAS. *PLoS One*, 8, e76983, (2013), 査読有.
8. Fujita, N., Morita, E., Itoh, T., Tanaka, A., Nakaoka, M., Osada, Y., Umemoto, T., Saitoh, T., Nakatogawa, H., Kobayashi, S., Hataguchi, T., Guan, J.L., Iwai, K., Tokunaga, F., Saito, K., Ishibashi, K., Akira, A., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T.: Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J. Cell Biol.* 203, 115-128, (2013), 査読有.
9. Tokunaga, F.: Linear ubiquitination- mediated NF- κ B regulation and its related disorders. *J. Biochem.* 154, 313-323, (2013), 査読有.

[学会発表](計16件)

1. Tokunaga, F.: Linear ubiquitination- mediated NF- κ B regulation, **2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling**, Jan. 23, 2015, Tokyo
2. Nakazawa, S., Ishii, R., Oikawa, D., Ishii, R., Nureki, O., and Tokunaga, F.: Linear ubiquitin-binding of optineurin regulates NF- κ B signaling, **2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling**, Jan. 23, 2015, Tokyo
3. 及川大輔、石井亮平、中澤世識、石谷隆一郎、濡木理、徳永文稔: Optineurin の直鎖状ユビキチン結合を介した NF- κ B 制御と疾患との関連、**第 37 回日本分子生物学会**、2014 年 11 月 26 日、横浜
4. 後藤栄治、徳永文稔: CRISPR/Cas9 法を用いた LUBAC 欠損細胞の作製と NF- κ B 活性化制御への影響、**第 37 回日本分子生物学会**、

2014年11月26日、横浜

5. Nakazawa, S., Oikawa, D., Ishii, R., Hatada, I., Nureki, O., and Tokunaga, F.: Optineurin regulates NF- κ B *via* linear ubiquitin-binding, **International Symposium on Homeostasis through Development, Life, and Diseases**, Nov. 7, 2014, Maebashi
6. 及川大輔、石井亮平、中澤世識、石谷隆一郎、濡木理、徳永文稔: Optineurin の NF- κ B シグナル制御の細胞機構と疾患、**第9回臨床ストレス応答学会**、2014年11月1日、岡山
7. 野口拓也、熊澤琢也、徳永文稔: 癌抑制遺伝子 STK11 による細胞死制御機構、**第87回日本生化学会大会**、2014年10月17日、京都
8. 徳永文稔: 直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B シグナル制御の分子基盤、**第87回日本生化学会大会**、2014年10月16日、京都
9. 及川大輔、中澤世識、徳永文稔: 新規 LUBAC シグナル複合体構成因子の探索と細胞機能解析、**第66回日本細胞生物学会**、2014年6月13日、奈良
10. 徳永文稔: 直鎖状ポリユビキチン修飾を介した NF- κ B 制御の B 細胞リンパ腫発症における役割、**日本薬学会第 134 年会シンポジウム: 翻訳後修飾に着目したシグナル伝達研究と創薬の最前線**、2014年3月30日、熊本
11. 徳永文稔: 直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B シグナル制御と疾患、**東京工業大学バイオサイエンスシンポジウム招待講演**、2014年2月18日、横浜
12. 徳永文稔: ユビキチン修飾による細胞機能制御と疾患、**第60回北関東医学会総会特別講演**、2013年9月26日、前橋
13. Tokunaga, F.: Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation mechanism and its related disorders、**プロテイン・アイランド・松山(PIM)国際シンポジウム 2013 招待講演**、2013年9月18日、松山
14. 徳永文稔: 直鎖状ポリユビキチン化を介した NF- κ B 制御と疾患、**第86回日本生化学会シンポジウム 次世代シグナル伝達研究への展開**、2013年9月12日、横浜
15. 徳永文稔、西増弘志、石谷隆一郎、濡木理: 直鎖状ユビキチン化を介する NF- κ B

制御に関わる脱ユビキチン化酵素と疾患、**病態プロテアーゼ学会**、2013年8月16日、大阪

16. Tokunaga, F.: Down-regulation mechanism for LUBAC-induced NF- κ B pathway, **The 35th Naito Conference: The ubiquitin-proteasome system: From basic mechanisms to pathophysiological roles**, Jul. 11, 2013, Sapporo

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学生体調節研究所分子細胞制御分野

(<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molc/b/>)

群馬大学生体調節研究所

(<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 文稔 (TOKUNAGA FUMINORI)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号: 00212069

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし