

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860188

研究課題名(和文) NF- κ B活性化における直鎖状ポリユビキチン鎖合成系、分解系の相互作用の解析研究課題名(英文) Analysis of interaction with synthesis and degradation 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に生成するLUBACのサブユニットの1つであるHOIPは、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であるOTULIN、CYLDと結合することで、NF- κ Bの機能を負に制御する可能性を見出した。そこで、直鎖状ポリユビキチン鎖生成系と分解系の協調的な制御機構の役割の解明を進めた。結果、特異的にT細胞、B細胞でOTULINをノックアウトさせたマウスの解析を行ったが、顕著なリンパ球の機能異は見られなかった。しかし、北海道大学と共同でOTULIN変異家系の解析に着手し、OTULINの機能低下は感染によって惹起された炎症を終息できない可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：I have shown that OTULIN and CYLD, which are deubiquitinating enzymes (DUBs) cleaving linear ubiquitin chains specifically, down-regulate NF- κ B activation by binding to HOIP, a subunit of LUBAC. Based on my original findings, I dissected the physiological roles of coordinated synthesis and cleavage of linear ubiquitination by co-existing its ligase and DUBs in this research proposal. Using OTULIN conditional knockout mice, I have dissected the roles of coordinated synthesis and cleavage of linear ubiquitination in B and T lymphocytes. To my disappointment, I could not find any abnormality in OTULIN null T or B cells. However, in collaboration with the research group in Hokkaido University, I start dissecting the molecular mechanisms underlying hyper-inflammatory symptoms found in a patient having mutations in OTULIN genes and found that inflammation provoked by pathogens could not be terminated because of the attenuated DUB activity of OTULIN.

研究分野：分子生物学

キーワード：シグナル伝達 NF- κ B ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

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る。感染などで惹起される炎症応答の中核を担うのみならず、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が亢進**することが報告されているので、種々の刺激依存的な NF-κB 活性化機構については世界中で精力的に研究されてきた。しかしながら、その活性化メカニズムはまだ完全には解明されていないのが現状である。

ユビキチン鎖はユビキチンに 7 個存在するリシン側鎖を介して形成されると考えられてきたが、研究代表者の所属研究室で発見された直鎖状ユビキチン鎖はユビキチンの N 末端のメチオニンの α-アミノ基を介して形成される。研究代表者は直鎖状ユビキチン鎖を選択的に生成する LUBAC ユビキチンリガーゼの研究に従事し、LUBAC が生成する直鎖状ユビキチン鎖が 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 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 (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 で刺激されると、LUBAC は cIAP リガーゼなどが形成するユビキチン鎖 (リシン 63 を介する K63 鎖) 依存的に 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 を直鎖状ユビキチン化して IKK 複合体を活性化する。その結果、IκBα がリン酸化依存的に分解され、IκBα から遊離した NF-κB が核に移行して活性化される (図 1)。

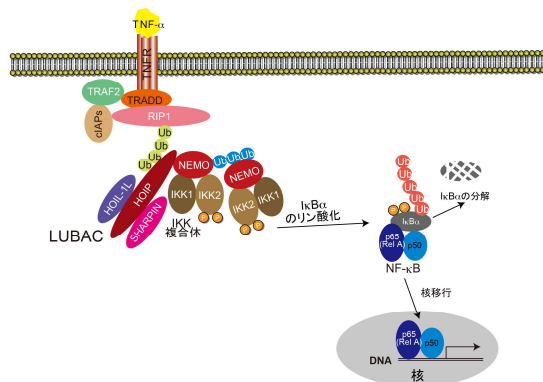


図 1 . NF-κB 活性化機構

ユビキチン修飾系は可逆的な翻訳後修飾系であり、ユビキチンをタンパク質に結合させる酵素群と切断する酵素群の両方が存在する。研究代表者が研究を推進してきた LUBAC はユビキチン鎖を結合させる酵素群の 1 つである。図 2 に LUBAC を構成する 3 種のサブユニット、HOIP、HOIL-1L、SHARPIN の構造を示す。

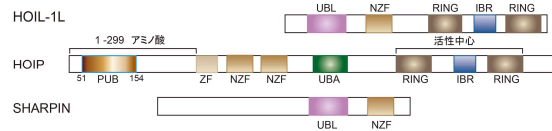


図 2 . LUBAC サブユニットとそのドメイン構造

研究代表者は LUBAC ユビキチンリガーゼに存在する種々のドメインの機能を解析する過程で、PUB ドメインを含む HOIP の N 末端領域を介して脱ユビキチン化酵素である OTULIN と CYLD が LUBAC と恒常的に結合することを見出した。OTULIN は直鎖状ユビキチン鎖のみを選択的に切断するが、CYLD は直鎖状ユビキチン鎖と K63 鎖の 2 種のユビキチン鎖を選択的に切断する。LUBAC は活性化された湯様態にリクルートされて、IKK 複合体の構成分子である NEMO を認識して直鎖状ユビキチン鎖を結合させることで NF-κB 活性化に寄与する。それゆえ、HOIP の N 末端領域を介して LUBAC と結合している CYLD、OUTLIN が NEMO に結合した直鎖状ポリユビキチン鎖を切断することによって、あるいは、CYLD が活性化受容体の複合体中の cIAP リガーゼなどによって形成され、LUBAC の活性化受容体へのリクルートに関与する K63 鎖を切断して、LUBAC の活性化された受容体からの離脱を促進することで、NF-κB 活性化の活性化を抑制する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、HOIP の N 末端領域を介した 2 種の脱ユビキチン化酵素、CYLD、OUTLIN の刺激依存的な NF-κB 活性化、LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖形成への関与を以下の 3 点から明らかにすることを目指した。

- A. HOIP の N 末端領域の NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、NF- κ B 活性化への関与、TNF 受容体への LUBAC リガーゼのリクルートに対する影響
- B. CYLD-HOIP、OUTLIN-HOIP の共結晶解析
- C. OTULIN の生理的機能の役割

3. 研究の方法

- A. HOIP を欠損している細胞に OTULIN、CYLD を結合できない HOIP 変異体(HOIP N84A/Y93A)を導入し、NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、NF- κ B 活性化への関与、TNF 受容体への LUBAC リガーゼのリクルートを、野生型の HOIP を導入した細胞と比較検討を加えた。
- B. CYLD、OTULIN の HOIP の N 末端領域と結合する領域、HOIP の N 末端領域(図 2 に示した 1-299 アミノ酸の領域)の大腸菌発現系を構築し、その発現系を用いてタンパク質を生成し、共同研究者の研究室で結晶化を進める。
- C. OTULIN の全身のノックアウトマウスは胎生致死である(Nature 2013)。LUBAC は免疫系の細胞、とりわけリンパ球で高発現しているので、T 細胞、B 細胞特異的に OTULIN を欠損するマウスを作製し、その表現系を解析した。

4. 研究成果

- A. OTULIN と CYLD と結合できない HOIP(HOIP N84A/Y93A)を発現している細胞では、野生型 HOIP を発現している細胞と比較して、NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、NF- κ B 活性化、TNF 受容体への LUBAC リガーゼのリクルートが亢進していた。それゆえ、OTULIN、CYLD は種々の刺激依存的な NF- κ B 活性化を適切なレベルの調節する機能を有している

と考えられた。

また、野生型 HOIP を発現している細胞で siRNA を用いて OTULIN、CYLD の両者の発現を抑制させたところ、HOIP N84A/Y93A を発現させた細胞と同じく、NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、NF- κ B 活性化、TNF 受容体への LUBAC リガーゼのリクルートが亢進していた。

しかし、OTULIN、CYLD のいずれか 1 つだけを siRNA を用いて発現を抑制させた場合には NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、NF- κ B 活性化、TNF 受容体への LUBAC リガーゼのリクルートは亢進しなかった。それゆえ、OTULIN、CYLD の 2 つの脱ユビキチン化酵素が LUBAC と結合していることで、NF- κ B の活性化を調節していることが明確となった。

- B. OTULIN と HOIP の共結晶解析に着手したが、着手直後にイギリス及びドイツのグループから報告された(Molecular Cell 2014)。そこで、OTULIN と HOIP の共結晶解析は中止し、CYLD と HOIP の共結晶解析のみを進めた。同結晶構造解析は現在進行中である。
- C. OTULIN コンディショナル KO マウスを研究早期に導入でき、機能解析が可能な状況になったので、CD4-Cre マウスと交配して T 細胞特異的に、Mb1-Cre マウスと交配して B 細胞特異的に OTULIN を欠損するマウスを作製し、その表現系を解析した。

しかしながら残念なことに、どちらのマウスも顕著な症状は示さなかった。

本研究の推進中に北海道大学で OTULIN 変異患者さんが見出されたので、北海道大学と共同して解析に着手した。その結果、その患者さん由来の変異 OTULIN は直鎖状ユビキチン鎖切断活性が減弱していることを示

し、OTLUIN の機能が低下するために一旦精製された直鎖状コピキチン鎖が切断されにくくなると考えられた。感染などにより直鎖状コピキチン鎖が精製され NF- κ B が活性化されることが知られている。それゆえ、OTLUIN の変異により、感染などで惹起された炎症反応を適切に終息できないために患者さんの症状を呈する可能性が想定された。

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)

Asano, T., Koike, M., Sakata, S.-I., Takeda, Y., Nakagawa, T., Hatano, T., Ohashi, S., Funayama, M., Yoshimi, K., Asanuma, M., Toyokuni, S., Mochizuki, H., Uchiyama, Y., Hattori, N., and Iwai, K. Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration. **Neurosci. Lett.** 588:29-35, 2015.

[学会発表] (計 0 件)

[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
<http://mcp.med.kyoto-u.ac.jp/>

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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし