

ポリユビキチン鎖を標的とした NF- κ B の新たな調節機構

柴田 佑里, 井上 純一郎

ユビキチン修飾は、タンパク質分解、DNA 修復、メンブレントラフィック、シグナル伝達など、様々な生命現象に関わる翻訳後修飾として知られている。転写因子 NF- κ B 活性化経路では、シグナル伝達におけるポリユビキチン鎖の機能解析が進んでおり、NF- κ B 活性化時にポリユビキチン化される分子とそのポリユビキチン鎖の役割、ポリユビキチン化タンパク質の制御機構に関する研究が盛んに行われている。NF- κ B 活性化には IKK 複合体調節サブユニット NEMO のポリユビキチン化が重要であるが、近年、我々は p47 (NSFL1C) がポリユビキチン化 NEMO の量を制御し、IKK 複合体活性化を抑制することを明らかにした。p47 は、既知の NF- κ B 抑制分子 CYLD や A20 とは異なる様式で IKK 複合体活性化を抑制するのだが、本稿ではその抑制機構について紹介する。

1. はじめに

nuclear factor- κ B (NF- κ B) は、炎症性サイトカイン、ケモカイン、抗アポトーシス分子、増殖因子などの発現を制御する転写因子で、炎症反応、免疫応答、細胞分化や増殖といった様々な生命現象に関与している¹⁾。その一方で、制御不全による恒常的な NF- κ B 活性化は炎症性疾患やがんの原因となるため、NF- κ B の活性化は一過性となるように厳密に制御される必要がある^{2,3)}。

タンパク質の翻訳後修飾は、細胞内シグナル伝達において重要な機能を果たしている。NF- κ B 活性化経路では主に二つの翻訳後修飾、リン酸化とユビキチン化がシグナル伝達に必要である⁴⁾。本稿では、NF- κ B 活性化経路におけるポリユビキチン鎖の機能を、これまでの知見を中心に概説するとともに、近年我々が報告したポリユビキチン鎖を標的とする NF- κ B の新たな制御機構について紹介する。

2. NF- κ B について

NF- κ B は五つのファミリー分子 p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2) で構成されている (図 1A)¹⁾。NF- κ B ファミリー分子は、N 末端側の Rel ホモロジドメイン (RHD) を介してホモあるいはヘテロ二量体を形成し、DNA に結合する。転写活性化ドメインは p65, RelB, c-Rel のみに存在し、p50 や p52 には存在しない。そのため、転写活性化能を示す NF- κ B には少なくとも一つの p65, RelB, c-Rel が含まれている必要がある。また、p50 や p52 は前駆体 p105, p100 として産生された後、限定分解を受けて成熟する (図 1A)。

不活性化時、NF- κ B の RHD には、アンキリンリピートを介して inhibitor of NF- κ B (I κ B) ファミリーや NF- κ B 前駆体 (p100, p105) が結合している。その結果、RHD 内の核移行シグナルが遮蔽されて、NF- κ B は細胞質内に繫留される。NF- κ B の活性化は、I κ B ファミリーの分解または NF- κ B 前駆体の限定分解が引き金となって誘導されるが、その活性化経路は古典的経路 (canonical pathway) と非古典的経路 (non-canonical pathway) の二つに大別することができる (図 1B)。古典的経路の活性化は、キナーゼ活性をもつ I κ B kinase (IKK) α と IKK β , 調節サブユニット NF- κ B essential modulator (NEMO) から構成される IKK 複合体によって厳密に制御されている¹⁾。腫瘍壊死因子 α

東京大学医科学研究所分子発癌分野 (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

A novel NF- κ B regulatory mechanism targeting a polyubiquitin chain

Yuri Shibata and Jun-ichiro Inoue (Division of Cellular and Molecular Biology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

(TNF- α) やインターロイキン 1 (IL-1) などのサイトカイン, リポポリ多糖 (LPS) などの細菌由来分子, ウイルス由来の RNA や DNA によって IKK 複合体は活性化し, I κ B α のリン酸化, プロテアソームによる分解を誘導する. その結果, 主に p65, p50 で構成される NF- κ B の核移行シグナルが露出して核内に移行し, 標的遺伝子の転写を促進する. 一方, 非古典的経路の活性化は IKK α のホモ二量体によって制御されている. receptor activator of NF- κ B (RANK) リガンド, CD40 リガンド, B cell-activating factor (BAFF), リンホトキシン β (LT- β) 刺激後, NF- κ B-inducing

kinase (NIK) によって IKK α ホモ二量体が活性化する. IKK α は p100 のリン酸化を誘導し, このリン酸化を指標として p100 が p52 へと限定分解されると, 主に RelB, p52 で構成される NF- κ B が活性化する⁵⁾. 古典的経路は刺激後数分で活性化が誘導され, 炎症性サイトカイン, ケモカインなどの発現を促進する. 一方, 非古典的経路の活性化は古典的経路と比べて遅く, 活性化に数時間を要する. 非古典的経路はケモカインやリンパ系器官の形成に必要な遺伝子の発現を制御している.

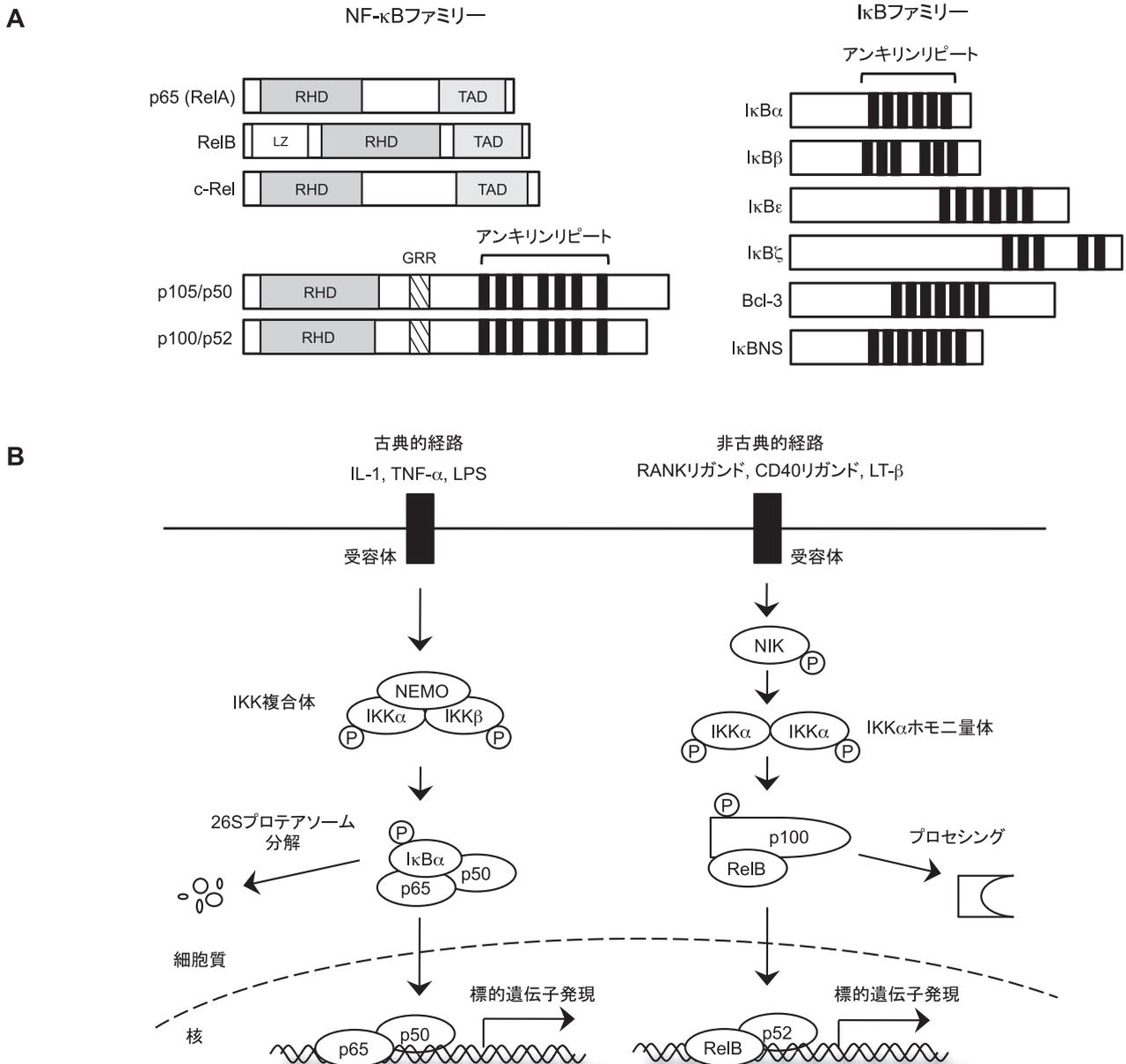


図1 NF- κ BファミリーとNF- κ B活性化経路

(A) NF- κ BファミリーとI κ Bファミリーの模式図. RHD: Relホモロジドメイン, TAD: 転写活性化ドメイン, LZ: ロイシンジッパー, GRR: グリシンリッチ領域. p105, p100はC末端からGRR付近まで限定分解されて, p50, p52に成熟する.
(B) NF- κ B活性化経路の模式図.

3. ユビキチン修飾系について

ユビキチン修飾系は、ユビキチン活性化酵素 (E1), ユビキチン結合酵素 (E2), ユビキチンリガーゼ (E3) の連続的な酵素反応によって、ユビキチンが基質分子に付加される反応である (図 2)。この反応は、ATP 依存的に活性化されたユビキチンが、E1 活性部位のシステインとチオエステル結合を形成することで開始する。その後、E1 に結合したユビキチンは E2 活性部位のシステインに転移する。そして、最終的に E3 が E2 と基質分子に結合して、基質分子のリシン残基側鎖の ε-アミノ基とユビキチンの C 末端間にイソペプチド結合を形成する⁶⁾。基質のリシン残基に 1 分子のユビキチンが結合する場合はモノユビキチン化と呼ばれ、モノユビキチン化はメンブレントラフィックやヒストン制御に関与する⁷⁾。一方、多数のユビキチンが

鎖状に連なったポリユビキチン鎖が修飾される場合は、ポリユビキチン化と呼ばれる。ポリユビキチン鎖は、ユビキチンのリシン残基を介して、ユビキチン同士が繰り返し結合することで形成される。ユビキチンには 7 個のリシン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) が存在する。質量分析計を用いた解析により、生体内では 7 個それぞれのリシン残基を介したポリユビキチン鎖の存在が示されているが⁸⁾、これらポリユビキチン鎖のうち K48 結合型、K63 結合型ポリユビキチン鎖の機能解析が進んでいる。

K48 結合型ポリユビキチン鎖はプロテアソームによるタンパク質分解の標識として機能し、K48 結合型ポリユビキチン化タンパク質はプロテアソームに認識されて分解される⁹⁾。一方で、K63 結合型ポリユビキチン鎖は分解の標識にはならず、シグナル伝達や DNA 修復に関与する¹⁰⁾。他の型のポリユビキチン鎖に関しては、K11 結合型ポリユビ

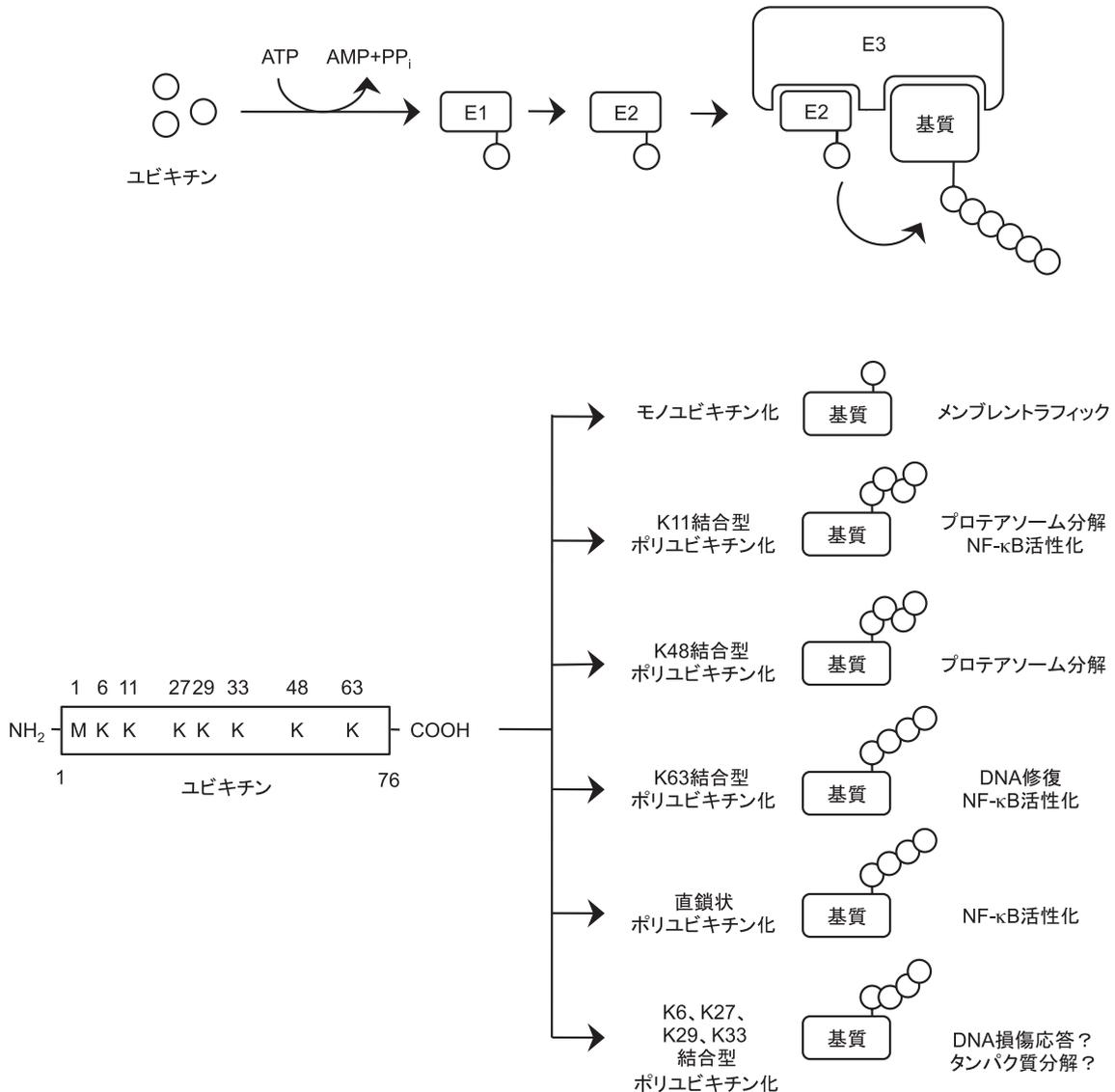


図 2 ユビキチン修飾系

キチン鎖はプロテアソームによるタンパク質分解とNF- κ B活性化に関与することが報告されているが¹¹⁾、K6結合型、K27結合型、K29結合型、K33結合型ポリユビキチン鎖の機能は依然として明確になっていない。また、近年、リシン残基側鎖のアミノ基に加えて、ユビキチンN末端メチオニン (Met1) の α -アミノ基を介したポリユビキチン鎖が報告され、これは直鎖状ポリユビキチン鎖と呼ばれている¹²⁾。直鎖状ポリユビキチン鎖はK63結合型、K11結合型と同様にNF- κ B活性化に関与する(詳細は徳永の稿を参照)¹³⁾。現在までに、ポリユビキチン鎖の立体構造解析が積極的に行われており、各ポリユビキチン鎖は異なる立体構造をとることが明らかとなっている¹⁴⁾。立体構造の違いによって、各ポリユビキチン鎖は異なるタンパク質に認識され、異なる経路で機能すると考えられている。どのリシン残基を介してポリユビキチン鎖が形成されるかによってポリユビキチン鎖の機能が全く異なり、ユビキチンは多彩な役割を果たすことができる。

4. NF- κ B活性化経路におけるポリユビキチン鎖の役割

次に、NF- κ B活性化経路においてポリユビキチン鎖がどのように機能しているのか、IL-1受容体(IL-1 receptor: IL-1R)/Toll様受容体(Toll-like receptor: TLR)とI型TNF受容体(TNF receptor 1: TNFR1)の二つのシグナル伝達経路について説明したい。リガンドが受容体に結合すると、IL-1RとTLRの細胞内領域に存在するToll-IL-1R

(TIR)ドメインにmyeloid differentiation primary gene 88(MyD88)が結合する(図3)。その後、MyD88にIL-1 receptor-associated kinase (IRAK) 1, IRAK4が結合した後、この複合体にTNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)がリクルートされる⁴⁾。TRAF6はユビキチンリガーゼとして機能し、E2のUbc13/Uev1AとともにK63結合型ポリユビキチン鎖を形成する¹⁵⁾。これまでに、TRAF6はTRAF6自身¹⁶⁾、transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1)¹⁷⁾、NEMOのK63結合型ポリユビキチン化を誘導することが報告されている¹⁸⁾。TAK1のアプター分子TAK1-binding (TAB) 2/3やNEMOのユビキチン結合ドメインを介して、ポリユビキチン鎖を足場にシグナル複合体が形成される結果、TAK1の活性化、IKK複合体の活性化が誘導される⁴⁾。リン酸化IkB α のポリユビキチン化はSCF^{β-TrCP}ユビキチンリガーゼが触媒する。この場合、IkB α はK48結合型ポリユビキチン化を受け、その後プロテアソームで分解される¹⁾。

一方、TNFR1にリガンドのTNF- α が結合すると、受容体下流にTNFR1-associated death domain protein (TRADD), TRAF2/5, cellular inhibitor of apoptosis protein (c-IAP) 1/2, receptor-interacting protein kinase 1 (RIP1)がリクルートされる⁴⁾。c-IAP1/2はユビキチンリガーゼとして機能し、RIP1のK11およびK63結合型ポリユビキチン化を誘導する^{11,19)}。すると、IL-1R/TLR経路同様に、ポリユビキチン鎖を足場としてシグナル複合体が形成され、TAK1, IKK複合体が活性化する。

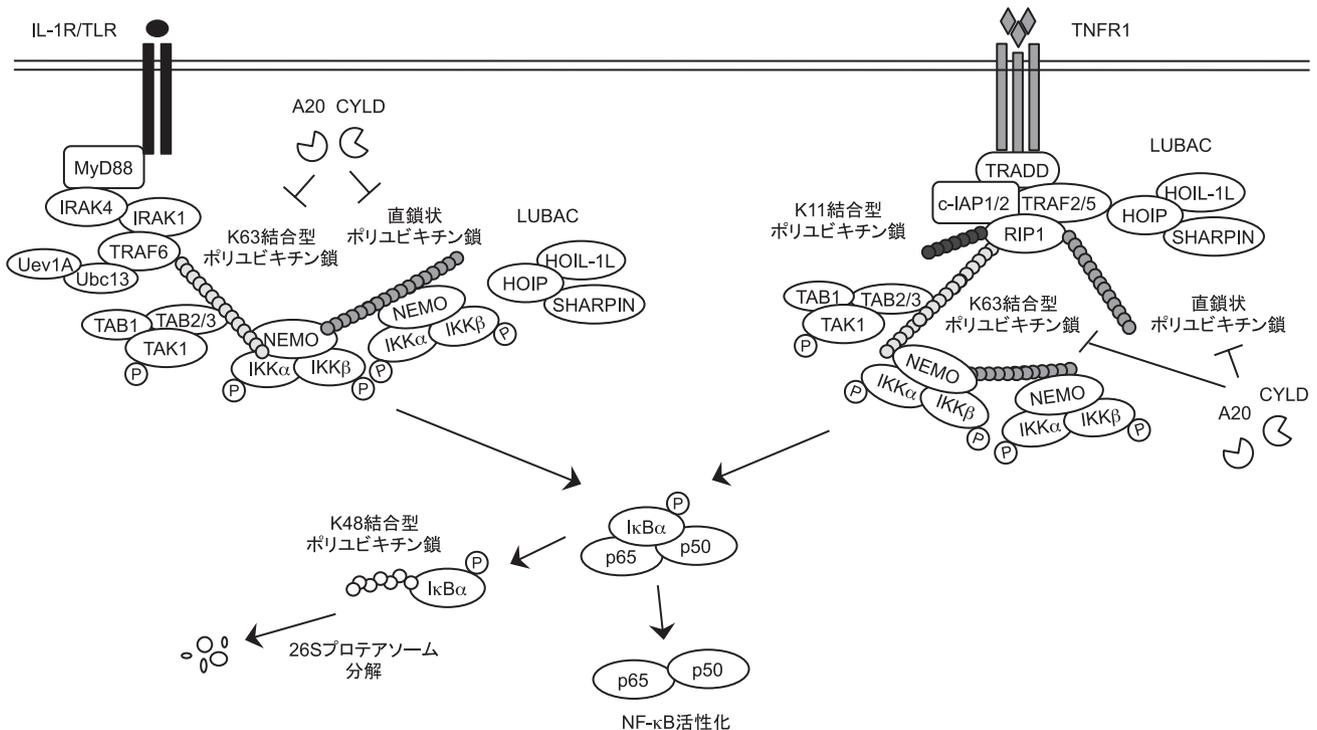


図3 IL-1R/TLRシグナル伝達経路とTNFR1シグナル伝達経路

さらに、IL-1R/TLR や TNFR1 シグナル伝達経路では、IKK 複合体活性化における NEMO の直鎖状ポリユビキチン化の重要性が明らかとなっている。直鎖状ポリユビキチン鎖はユビキチンリガーゼ linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) により形成される。LUBAC は、TRADD, TRAF2, c-IAP1/2 依存的に TNFR1 にリクルートされ、NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、IKK 複合体活性化を誘導する¹³⁾。上述のように、NF- κ B 活性化経路では非分解性のポリユビキチン鎖がアダプターとして機能し、シグナル伝達複合体形成に寄与している。

NF- κ B 活性化を抑制するためには、ポリユビキチン化タンパク質を制御する必要があるのだが、その制御はどのような機構で行われているのか。これまでに、脱ユビキチン化酵素 A20 や CYLD が NF- κ B 活性化を抑制する分子として報告されている。CYLD は K63 結合型および直鎖状ポリユビキチン鎖を特異的に切断することで、IKK 複合体活性化を負に制御する^{10,20)}。A20 も CYLD 同様に、IKK 複合体の抑制には脱ユビキチン化活性が必要であると考えられてきたが、近年、A20 は脱ユビキチン化活性非依存的に IKK 複合体活性化を抑制することが報告された^{21,22)}。したがって、NF- κ B 活性化経路におけるポリユビキチン化タンパク質の制御は、現在考えられているモデルよりも複雑である可能性が高い。

5. 新規 IKK 複合体結合タンパク質の同定

IKK 複合体は 700~900 kDa の大きな複合体を形成するが、刺激依存的に IKK 複合体に結合する分子の全容は明らかとなっていない。そこで、IKK 複合体活性化制御に関わる新たな分子を探索するために、活性化した IKK 複合体に含まれる分子を質量分析により解析した。その結果、新規 IKK 複合体結合タンパク質として p47 (NSFL1C) を同定した²³⁾。

p47 は 370 個のアミノ酸からなる約 40 kDa のタンパク質で、もともと ATP アーゼ p97 (VCP) の補助因子として同定された²⁴⁾。p47 は三つのドメインから構成されており、N 末端に ubiquitin-associated (UBA) ドメイン、中央に shp1, eyc and p47 (SEP) ドメイン、C 末端に ubiquitin regulatory X (UBX) ドメインを有している²⁵⁾。p47 はユビキチン結合ドメインである UBA ドメインを介してユビキチンと結合する。SEP ドメインは p47 ショウジョウバエホモログの eyc, p47 出芽酵母ホモログ shp1, p47 に保存されている配列で、他のタンパク質に類似する配列は存在しない。SEP ドメインは p47 の多量体化に関与すること、UBX ドメインは p97 との結合に必要であることが示されている²⁶⁾。また、これまでの解析から、p47 は p97 と協調してゴルジ体の膜形成に関与することが示されていたが²⁴⁾、NF- κ B 活性化経路への関与は明らかとならなかった。IKK 複合体の活性化には非分解性のポリユビキチン鎖が重要であることから、ユビキチン結合ドメインを有する p47 は IKK 複合体活性化の制御に関与しているのではないかと考えて、このタンパク質に注目した。

まず、p47 が IKK α , IKK β , NEMO のうち、どの IKK 複合体構成因子に結合するか検討した。HEK293T 細胞に Flag タグ付加 p47 と HA タグ付加 IKK α , IKK β または NEMO を強制発現させた後、抗 HA 抗体を用いた共免疫沈降実験を行った。その結果、p47 は IKK α , IKK β とは結合せず、NEMO に結合することが明らかとなった (図 4 A)。さらに、抗 NEMO 抗体を用いた共免疫沈降実験により、内在性の p47 と IKK 複合体が刺激依存的に結合することを確認した (図 4B)。以上の結果から、p47 はサイトカイン刺激依存的に NEMO を介して IKK 複合体に結合することが示唆された。

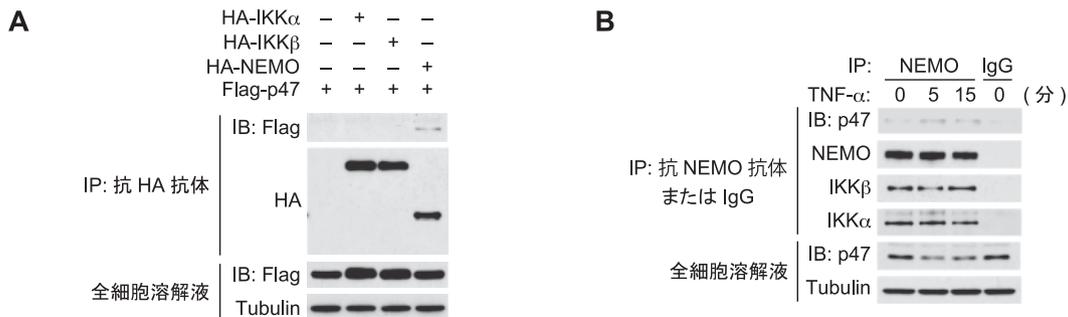


図 4 p47 は NEMO を介して IKK 複合体に結合する

(A) p47 と各 IKK 複合体構成因子の結合。HEK293T 細胞に Flag タグ付加 p47 と HA タグ付加 IKK α , IKK β , NEMO を強制発現させた後、抗 HA 抗体を用いて共免疫沈降を行った。その後、抗 Flag 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより各 IKK 複合体構成因子に結合している p47 を検出した。

(B) 内在性 p47 と IKK 複合体の結合。HeLa 細胞を TNF- α (10 ng/ml) で表記の時間処理した後、抗 NEMO 抗体を用いて共免疫沈降を行った。その後、抗 p47 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより IKK 複合体に結合している p47 を検出した。

6. p47のNF- κ B活性化経路における機能

p47がIKK複合体活性化制御に関与するか検討するために、siRNAを用いて内在性p47の発現を抑制し、サイトカイン刺激後のI κ B α のリン酸化、分解をウェスタンブロットティングにより確認した。その結果、p47の発現を抑制すると、TNF- α 刺激により誘導されるI κ B α のリン酸化が増大し、それに伴いI κ B α の分解が亢進していた(図5A)。興味深いことに、CYLDやA20が欠損したマウス胎仔繊維芽細胞(MEF)においても、p47ノックダウンによるIKK複合体活性化の亢進が観察された(図5B)。この結果から、p47はCYLD、A20とは異なる経路でIKK複合体活性化を抑制することが考えられる。次に、p47の発現を抑制した際のNF- κ B活性化を評価するために、NF- κ B標的遺伝子(*IL8*, *TNFA*)の転写産物量をリアルタイムPCRにより測定した。内在性p47の発現を抑制した場合、TNF- α 刺激によって誘導される*IL8*, *TNFA*の産生量が増加した(図5C)。以上の結果から、p47はIKK複合体を標的としてNF- κ B活性化を負に制御することが示された。

7. p47によるIKK複合体活性化抑制機構

p47がIKK複合体活性化を抑制するメカニズムを解析するために、p47のどの機能ドメインがNF- κ B活性化の抑制に必要であるか検討を行った。図6Aに示すように、p47の各ドメインを欠損させた変異体(p47- Δ UBX, p47-

Δ UBA, p47- Δ UBA/SEP)を作製し、野生型p47(p47-WT)とp47変異体のNF- κ B抑制能をNF- κ Bレポーターアッセイにより確認した。p47- Δ UBXはp47-WTと同程度にNF- κ B活性化を抑制したのに対して、UBAドメインを欠損させたp47- Δ UBA, p47- Δ UBA/SEPはNF- κ B抑制能が顕著に低下した(図6B)。この結果から、p47のユビキチン結合能がNF- κ B活性化の抑制に必要であることが示された。p47のp97結合能はNF- κ Bの抑制には必要ないのだが、p97がNF- κ B活性化制御に関与しないことは、siRNAを用いて内在性p97の発現を抑制した実験により確認している²³⁾。

上述の結果と、p47が結合するNEMOはサイトカイン刺激依存的にポリユビキチン化されることから、p47はUBAドメインを介してポリユビキチン化NEMOに結合するのではないかと仮説を立てた。組換えUBE1(E1), Ubc13/Uev1A(E2), TRAF6(E3), NEMO(基質)を用いて、*in vitro*においてNEMOのポリユビキチン化を誘導した後、ポリユビキチン化NEMOとp47が結合するか確認した。p47はポリユビキチン化されていないNEMOには結合せず、ポリユビキチン化依存的にNEMOに結合した(図6C)。さらに、p47- Δ UBAやUBAドメインに三つの点変異を加えたp47変異体(p47-V15A/L34A/Y42A)はポリユビキチン化NEMOに結合できなくなることから、p47はUBAドメインを介してポリユビキチン化NEMOに結合することが示唆された。さらに、p47が結合するポリ

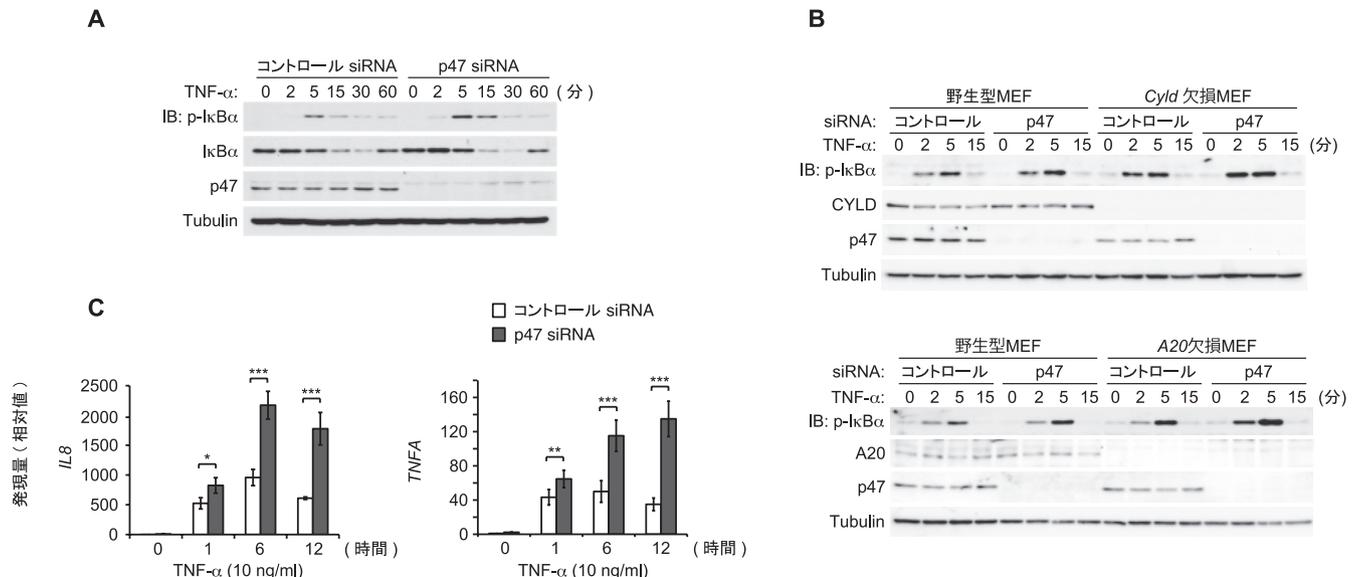


図5 p47はIKK複合体、NF- κ B活性化を負に制御する

(A) siRNAを用いて内在性p47の発現を抑制したHeLa細胞をTNF- α (1.0 ng/ml)で表記の時間処理した。その後、抗リン酸化I κ B α 抗体と抗I κ B α 抗体を用いたウェスタンブロットティングにより、I κ B α のリン酸化と分解を検出した。

(B) 野生型またはCyld欠損MEFにsiRNAを導入して、内在性のp47の発現を抑制した。TNF- α (3.0 ng/ml)で表記の時間処理した後、抗リン酸化I κ B α 抗体と抗I κ B α 抗体を用いたウェスタンブロットティングにより、I κ B α のリン酸化と分解を検出した。

(C) siRNAを用いて内在性p47の発現を抑制したHeLa細胞をTNF- α (10 ng/ml)で表記の時間処理した。その後、リアルタイムPCRを行って、NF- κ B標的遺伝子の転写産物量を測定した。*** P <0.01, ** P <0.02, * P <0.05。

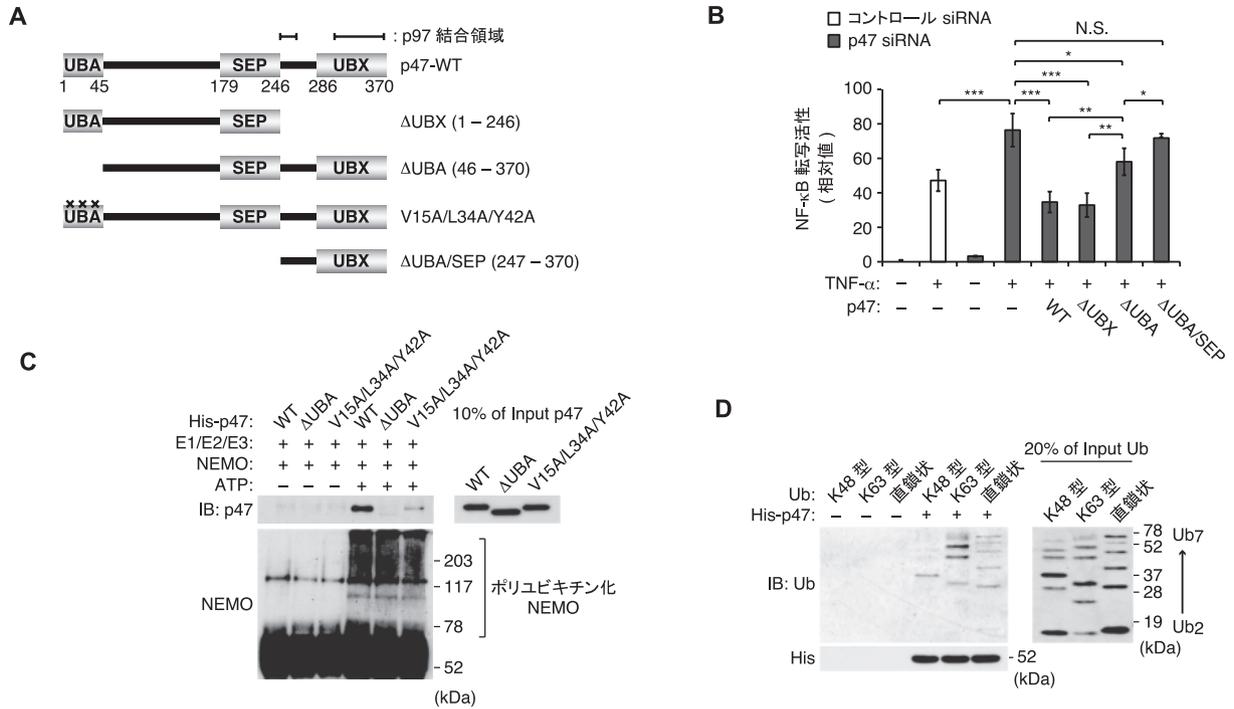


図6 p47のユビキチン結合能がIKK複合体の抑制に必要である

(A) p47変異体の模式図。
 (B) siRNAを用いて内在性p47の発現を抑制したHEK293T細胞に野生型p47または各p47変異体、NF-κBレポーターを導入した。その後、細胞をTNF-α (1.0 ng/ml) で処理し、ルシフェラーゼアッセイによりNF-κB転写活性を測定した。NS: not significant. *** $P < 0.01$, ** $P < 0.02$, * $P < 0.05$ 。
 (C) 組換えUBE1 (E1), Ubc13/Uev1A (E2), TRAF6 (E3), NEMO (基質)を用いて、*in vitro*においてNEMOのポリユビキチン化を誘導した。抗NEMO抗体を用いた免疫沈降によりポリユビキチン化NEMOを回収し、ポリユビキチン化NEMOに組換え野生型p47またはp47変異体が結合するかどうか結合実験を行った。
 (D) 組換えp47と各型のポリユビキチン鎖(Ub₂~Ub₇)を混合して、*in vitro*において結合実験を行った。その後、Ni-NTAアガロースを用いてp47を回収し、p47に結合しているポリユビキチン鎖をウェスタンブロッティングにより検出した。

ユビキチン鎖の型に特異性があるかどうか検討するために、*in vitro*において組換えp47とK48結合型、K63結合型、直鎖状ポリユビキチン鎖(ジユビキチンからヘプタユビキチン: Ub₂~Ub₇)が結合するか確認した。p47はK48結合型テトラユビキチンに結合するものの、NEMOが修飾を受ける型のK63結合型、直鎖状ポリユビキチン鎖に優先的に結合することが明らかとなった(図6D)。

これまでの結果から、p47はポリユビキチン化したNEMOの発現量を制御することによりIKK複合体活性化を抑制することが推察された。そこで、p47が各IKK複合体構成因子の発現量に影響を与えるかどうか検討するために、HEK293T細胞にp47と各IKK複合体構成因子を強制発現し、その発現量を確認した。p47はIKKα、IKKβの発現量に影響を与えなかったが、p47強制発現によりポリユビキチン化NEMOの量が減少した(図7A)。このとき、プロテアソーム阻害剤MG132処理ではNEMOの発現量は回復しなかったが、リソソーム阻害剤E64DとペプスタチンAで処理すると、p47によって減少したNEMOの発

現量が回復した²³⁾。この結果から、p47はリソソーム依存的な経路を介してNEMOの分解を誘導することが示唆された。また、内在性p47の発現を抑制すると、TNF-α刺激により誘導されるポリユビキチン化NEMOが蓄積し(図7B)、E64DとペプスタチンA処理でも同様の結果が得られた(図7C)。さらに、NEMOとリソソームマーカータンパク質lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1)の局在を共焦点蛍光顕微鏡により確認し、TNF-α刺激依存的にNEMOがリソソームに局在することも明らかにしている²³⁾。以上の結果より、p47はポリユビキチン化NEMOのリソソーム分解を誘導して、IKK複合体活性化を負に制御することが明らかになった(図7D)。

また、多くのがん細胞では、NF-κB制御機構の破綻が原因となって、恒常的にNF-κBが活性化している。そこで、そのようながん細胞においてp47の発現量がどのようになっているか検討を行った。その結果、NF-κBが恒常的に活性化している成人T細胞白血病細胞において、p47の発現が低下していることを見いだした²³⁾。この結果か

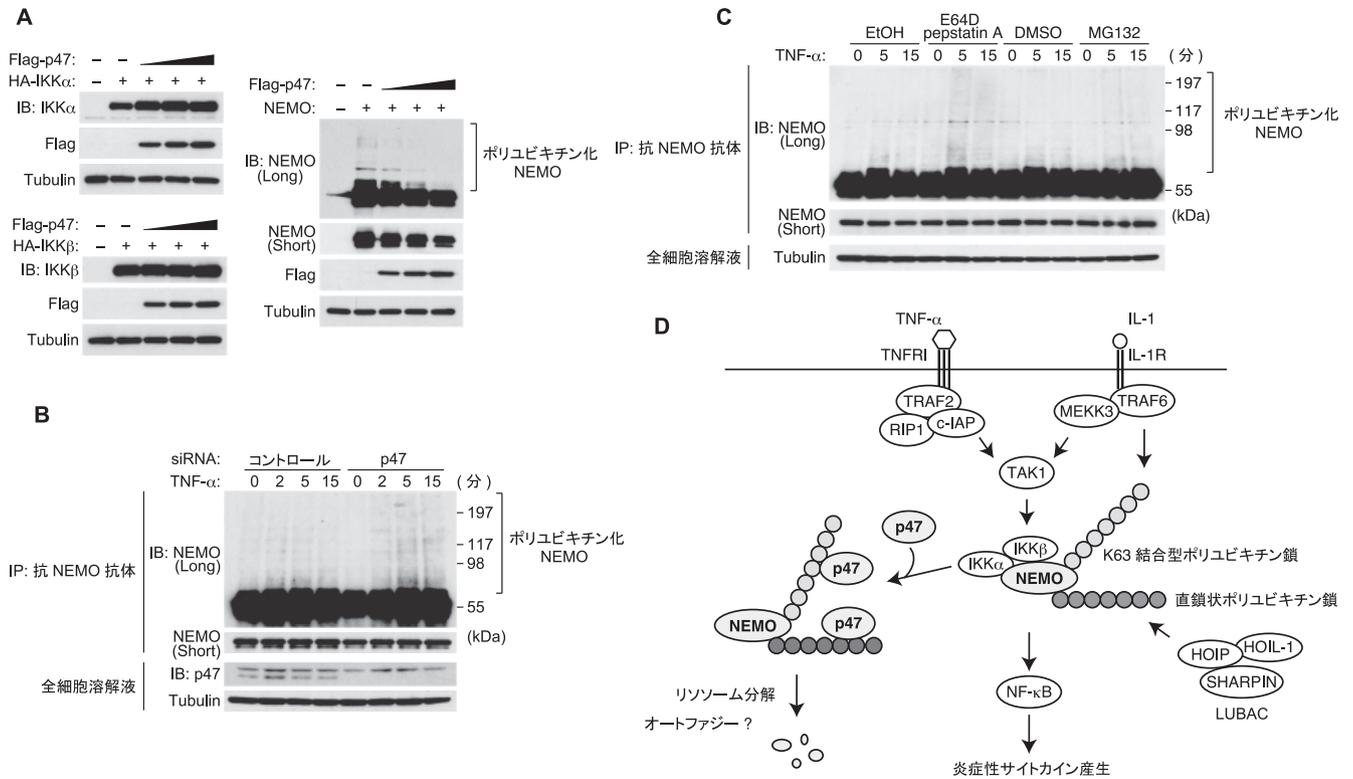


図7 p47はポリユビキチン化NEMOのリソソーム分解を誘導する

- (A) HEK293T細胞にFlagタグ付加p47 (0.1, 0.3, 1.0 μg)と各IKK複合体構成因子 (0.1 μg)を発現させた後、ウェスタンブロットティングにより各IKK複合体構成因子の発現量を検出した。
- (B) siRNAを用いて内在性p47の発現を抑制したHeLa細胞をTNF- α (10 ng/ml)で表記の時間処理した。その後、抗NEMO抗体を用いて免疫沈降を行い、ポリユビキチン化NEMOをウェスタンブロットティングにより検出した。
- (C) HeLa細胞をリソソーム阻害剤E64D (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) / ペプスタチンA (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) またはプロテアソーム阻害剤MG132 (10 μM)で処理した後、細胞をTNF- α (10 ng/ml)で表記の時間処理した。抗NEMO抗体を用いて免疫沈降を行い、ポリユビキチン化NEMOをウェスタンブロットティングにより検出した。
- (D) p47によるIKK複合体抑制機構の模式図。

ら、p47の発現低下が恒常的なNF- κB 活性化、細胞悪性化につながる可能性が示唆された。

8. 今後の展望

これまでK63結合型ポリユビキチン化タンパク質の制御は脱ユビキチン化酵素が担っていると考えられてきた。しかし、本研究の結果から、脱ユビキチン化酵素によるポリユビキチン鎖の切断に加え、ユビキチン化タンパク質の分解もK63結合型ポリユビキチン化タンパク質の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究以外でも、K63結合型ポリユビキチン鎖がリソソームを介したタンパク質分解に関与している可能性が示唆されている。63番目以外のリシンをアルギニンに置換し、K63結合型ポリユビキチン鎖のみが形成されるユビキチンを細胞に導入すると、ポリユビキチン化タンパク質がリソソームに蓄積することが示されている²⁷⁾。また、リソソームを介したタンパク質分解経路としてオートファジーがよく知られているが、近年、基質が選択的にオートファゴソームに封入され

る選択的オートファジーが注目されている²⁸⁾。これまで、オートファジーは非選択的に細胞質成分を分解すると考えられてきたが、ポリユビキチン化タンパク質が選択的にオートファゴソームに封入され、分解されることが明らかとなってきている。実際に、T-cell receptor (TCR) 下流のNF- κB 活性化経路において、K63結合型ポリユビキチン化Bcl-10が選択的オートファジーにより分解されることが示されている²⁹⁾。今後も、ポリユビキチン化タンパク質の制御に関して興味深い展開が期待される。

また、p47に関しては*in vivo*における機能の解析が今後の課題である。p47欠損マウスを作製し、炎症応答や発がんにおけるp47の役割を調べたいと考えている。

文 献

- Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2012) *Genes Dev.*, 26, 203-234.
- Pasparakis, M. (2009) *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 778-788.
- Perkins, N.D. (2012) *Nat. Rev. Cancer*, 12, 121-132.

- 4) Liu, S. & Chen, Z.J. (2011) *Cell Res.*, **21**, 6–21.
- 5) Sun, S.C. (2010) *Sci. Signal.*, **3**, pe18.
- 6) Pickart, C.M. (2001) *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 503–533.
- 7) Haglund, K., Di Fiore, P.P., & Dikic, I. (2003) *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 598–603.
- 8) Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., & Peng, J. (2009) *Cell*, **137**, 133–145.
- 9) Komander, D. & Rape, M. (2012) *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 203–229.
- 10) Chen, Z.J. & Sun, L.J. (2009) *Mol. Cell*, **33**, 275–286.
- 11) Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., & Vucic, D. (2010) *EMBO J.*, **29**, 4198–4209.
- 12) Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., & Iwai, K. (2006) *EMBO J.*, **25**, 4877–4887.
- 13) Tokunaga, F. & Iwai, K. (2012) *Microbes Infect.*, **14**, 563–572.
- 14) Kulathu, Y. & Komander, D. (2012) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 508–523.
- 15) Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., & Chen, Z.J. (2000) *Cell*, **103**, 351–361.
- 16) Lamothe, B., Besse, A., Campos, A.D., Webster, W.K., Wu, H., & Darnay, B.G. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 4102–4112.
- 17) Yamazaki, K., Gohda, J., Kanayama, A., Miyamoto, Y., Sakurai, H., Yamamoto, M., Akira, S., Hayashi, H., Su, B., & Inoue, J. (2009) *Sci. Signal.*, **2**, ra66.
- 18) Sebban-Benin, H., Pescatore, A., Fusco, F., Pascuale, V., Gautheron, J., Yamaoka, S., Moncla, A., Ursini, M.V., & Courtois, G. (2007) *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 2805–2815.
- 19) Bertrand, M.J., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., & Barker, P.A. (2008) *Mol. Cell*, **30**, 689–700.
- 20) Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J.D., Odenwaelder, P., Wilkinson, K. D., & Barford, D. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 466–473.
- 21) Skaug, B., Chen, J., Du, F., He, J., Ma, A., & Chen, Z.J. (2011) *Mol. Cell*, **44**, 559–571.
- 22) Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., & Nureki, O. (2012) *EMBO J.*, **31**, 3856–3870.
- 23) Shibata, Y., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Han, X., Tanaka, Y., Gohda, J., & Inoue, J. (2012) *Nat. Commun.*, **3**, 1061.
- 24) Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T.P., Pappin, D., Freemont, P., & Warren, G. (1997) *Nature*, **388**, 75–78.
- 25) Yuan, X., Simpson, P., McKeown, C., Kondo, H., Uchiyama, K., Wallis, R., Dreveny, I., Keetch, C., Zhang, X., Robinson, C., Freemont, P., & Matthews, S. (2004) *EMBO J.*, **23**, 1463–1473.
- 26) Kaneko, Y., Tamura, K., Totsukawa, G., & Kondo, H. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 3873–3877.
- 27) Tan, J.M., Wong, E.S., Kirkpatrick, D.S., Pletnikova, O., Ko, H.S., Tay, S.P., Ho, M.W., Troncoso, J., Gygi, S.P., Lee, M.K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., & Lim, K.L. (2008) *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 431–439.
- 28) Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K., & Simonsen, A. (2012) *Int. J. Cell Biol.*, **2012**, 219625.
- 29) Paul, S., Kashyap, A.K., Jia, W., He, Y.W., & Schaefer, B.C. (2012) *Immunity*, **36**, 947–958.