特集: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---

直鎖状ユビキチン化を介した NF-KB 制御機構と疾患

徳 永 文 稔

NF- κ B (nuclear factor- κ B) 経路は,免疫制御や炎症応答に中心的なシグナル伝達経路で,リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾がその時空間特異的なシグナル制御に深く関与する.筆者らはユビキチンの N 末端を介する新規「直鎖状ポリユビキチン鎖」を生成するユビキチンリガーゼ(LUBAC)を発見し,LUBAC が NF- κ B 制御に必須であることを明らかにした.さらに,LUBAC を介する NF- κ B 活性化を抑制する脱ユビキチン化酵素として A20 を同定し,A20 は直鎖状ユビキチンに結合することで NF- κ B 活性を調節していること,その制御不全が悪性リンパ腫惹起に連関することを見いだした.本稿では,拡大する直鎖状ポリユビキチン鎖生成による NF- κ B 制御の生理的意義とその破綻による疾患との関連について紹介する.

1. はじめに

NF-кB は,炎症応答や免疫制御において中枢的な役割を果たす転写因子で,がん遺伝子産物である Rel に相同性をもつ五つのタンパク質,すなわち p65(RelA),RelB,c-Rel,NF-кB1(p50/p105),NF-кB2(p52/p100)の ホモまたはヘテロ二量体として構成される 1,2)。NF-кB は通常,阻害タンパク質(IkB:inhibitor of кB)に結合してサイトゾルに係留されているが,NF-кB 活性化刺激に誘導されIkB が分解されると核内へ移行し,標的遺伝子の制御エレメントへ結合して転写を亢進する。NF-кB 活性化経路には,腫瘍壊死因子 α (TNF- α) やインターロイキン 1 β (IL-1 β) などの炎症性サイトカインやリポ多糖(LPS)などの病原体関連分子パターンによって迅速に(数分で)活性化される古典的経路(canonical pathway)と,リンホトキシン β や β 細胞活性化因子 (BAFF)などによって比較的ゆっ

くり(数時間で)活性化する非古典的経路(non-canonical pathway)がある。いずれの経路においても NF-κB 活性化は、①受容体によるリガンド刺激の感知、②IκB キナーゼ(IKK)の活性化、③NF-κB の阻害タンパク質からの解放と核移行、④標的遺伝子の転写亢進というステップからなる^{1,2)}。この過程においてリン酸化やユビキチン化など可逆的な翻訳後修飾は、時空間特異的な NF-κB 活性調節に極めて重要な意義をもつ。

本稿では、筆者が大阪市立大学及び大阪大学にて在籍していた岩井一宏教授研究室(現:京都大学)にて見いだされた新規「直鎖状ユビキチン鎖」を生成するユビキチンリガーゼ複合体(LUBAC)による NF-кB 活性化と抑制のメカニズム及び疾患との関連を中心に解説する.

2. 多様なユビキチン化修飾による NF-κB 経路の制御

ユビキチンは真核生物に高度に保存された 76 残基 (8.6 kDa) からなる小球状タンパク質で、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) という 3 種の酵素活性によって標的タンパク質の Lys 残基側鎖 ϵ -NH₂ 基に結合される翻訳後修飾因子である (詳細は柴田らの稿を参照) $^{3.4}$. また、標的タンパク質に結合されたユビキチンは、生理機能を発揮したのち、脱ユビキチン化酵素によって切り離され再利用される。ヒトでは 2 種の E1、約 50 種の E2、約 600 種の E3、約 100 種

群馬大学生体調節研究所分子細胞制御分野(〒371-8512 群馬県前橋市昭和町 3-39-15)

Linear ubiquitination-mediated NF- κB regulation and its related diseases

Fuminori Tokunaga (Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3–39–15 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371–8512, Japan)

の脱ユビキチン化酵素が存在し^{5,6)}, E3 が標的タンパク質 の時空間特異的識別という最も重要な役割を担っている. E3 は、E2 から分子内の Cys 残基にユビキチンをチオエス テル結合で受け渡されたのち基質タンパク質を認識してユ ビキチン化する HECT (homologous to E6AP carboxyl terminus) 型 E3 と, ユビキチンをチャージした E2 と基質タン パク質の両方に結合し、ユビキチン転移を触媒する RING (really interesting new gene) 型E3に大別される⁵⁾. RING フィンガードメインは、保存性の高い Cys や His 残基に よって Zn イオンを配位した特徴的な構造を示す. 興味深 いことに最近、HECT 型と RING 型の両方の触媒様式を併 せ持つ RING/HECT ハイブリッド型の反応機構も見いだ された⁷⁾. これは RING1-IBR (in-between RING)-RING2 構 造をもつ human homolog of Drosophila ariadne (HHARI) や パーキンソン病に関わる parkin などの E3 に見られるもの で、RING1 領域で E2-ユビキチンに結合して、RING2 内 の Cys にいったんチオエステル結合を介してユビキチン を転移させたのち、基質タンパク質へユビキチンを付加す るという反応機構である.

ユビキチン化はリン酸化,メチル化,水酸化など低分子 化学基とは異なり、タンパク質性の翻訳後修飾因子である ため、多様なユビキチン連結によって多彩な生理機能発現 を可能にしている8. 例えば、標的タンパク質にユビキチ ンが1分子結合するモノユビキチン化や1分子のユビキチ ンが数か所に結合するマルチモノユビキチン化は、エンド サイトーシスなどメンブレントラフィックを制御する. 一 方, ユビキチン内の七つの Lys(K) 残基(K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) のいずれかに連鎖的にユビキチン が連結し、ポリユビキチン鎖を形成した場合、K48 ポリユ ビキチン鎖はプロテアソーム分解を引き起こすこと, K63 ポリユビキチン鎖はシグナル伝達や DNA 修復などの役割 を担うことが明らかにされている(詳細は柴田らの稿を参 照)8. ポリユビキチン鎖はそれぞれ異なる立体構造を形成 するため, 各ユビキチン鎖に対応して特異的に結合するタ ンパク質群が存在し、異なる生理機能デコードを可能にし ている. このような連結様式の多様性によって、複雑性を 可能にしていることがユビキチン修飾の特徴といえる.

LUBAC による直鎖状ユビキチン化を介した NF-κB 活性化の機構

1) LUBAC を構成するサブユニット

このように、ユビキチンは分子内の七つの Lys 残基を介した分岐鎖状ポリユビキチン鎖を生成することが知られていたが、我々はユビキチンの N 末端 Met の α -NH₂基を介するペプチド結合性の直鎖状ポリユビキチン鎖を生成する E3 酵素(LUBAC)が NF- κ B 制御に必須であることを見いだした 9,10 . LUBAC(linear ubiquitin chain assembly com-

plex) は, HOIL-1L, HOIP, SHARPIN の三つのサブユニットから構成される約 600 kDa の複合体型 E3 である. まず, これらのサブユニットについて紹介する.

HOIL-1Lは、鉄制御因子IRP2のE3として同定した HOIL-1 (heme-oxidized IRP2 ligase-1) のスプライシングア イソフォームで¹¹⁾,プロテインキナーゼC結合タンパク質 (RBCK1), B型肝炎ウイルス X タンパク質結合因子, エ ストロゲン受容体制御因子としても報告されている9,100. HOIL-1L はユビキチン様 (UBL) ドメイン, Npl4型 Zn フィ ンガー (NZF) ドメイン, RING-IBR-RING ドメインから 構成される 58 kDa のタンパク質だが(図 1A),LUBAC 複 合体中の HOIL-1L は、イムノブロットにおいてダブレッ トバンドを呈することから、何らかの翻訳後修飾が施され ている可能性が高い. 最近, HOIL-1Lの UBL は HOIPの ユビキチン結合(UBA)ドメインと特徴的な結合するこ とで複合体形成に関与することが結晶構造解析から明らか にされた (詳細は西増らの稿を参照)^{12,13)}. また HOIL-1L の NZF 領域は、直鎖状ユビキチンに特異的に結合し $(K_d =$ 17 μM), NZF の C 末端領域にある α-ヘリックス領域 (NZF tail) は近位ユビキチンの結合親和性を亢進させてい ることが示されている¹⁴⁾. HOIL-1L は RING 領域をもつこ とから E3 活性が示唆されるが、その機能についてはより 詳細な解析が必要である.

HOIP (HOIL-1L interacting protein, RNF31 とも呼ばれ る) は、123 kDa のタンパク質で、直鎖状ユビキチン鎖を 産生するLUBACの活性中心を担うサブユニットであ る¹²⁾. HOIP は N 末端から PUB ドメイン, 一つの ZF と二 つの NZF ドメイン, UBA ドメイン, RING-IBR-RING ド メインから構成される (図1A). PUBドメインはAAA ATPase の p97 (VCP) の C 末端領域と結合するドメイン としてペプチド N-グリカナーゼ (PNGase) や Ubxd1 に見 いだされた構造ドメインであるが¹⁵, HOIPの p97 結合や その生理機能はいまだ不明である. HOIP の ZF-NZF 領域 は基質である NEMO (NF-κB essential modulator, IKKγと も呼ばれる)を認識する領域であり、UBAはHOIL-1Lや SHARPIN の UBL 領域と複合体形成に関与する^{16,17)}. HOIP の RING フィンガー領域は、E2-25K, UbcH5, UbcH7 な どの E2 を用いてユビキチンの N 末端を介する直鎖状ユビ キチンを生成する. これらの E2 は K48 ポリユビキチン鎖 産生も可能な E2 であるので、直鎖状ユビキチン形成の特 異性は E3 である LUBAC が規定している¹²⁾.

LUBAC のサブユニットである SHARPIN は、シナプス 後肥厚における Shank1 結合因子として報告された 40 kDa タンパク質である 18 . 興味深いことに、SHARPIN の C 末端領域に存在する UBL、NZFドメインは HOIL-1L の N 末端領域と高い相同性を示す(図 1A). SHARPIN はユビキタスに発現するため、神経系以外での生理機能は不明で

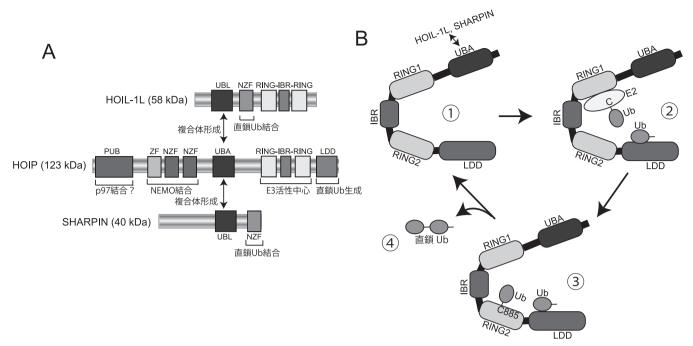


図1 LUBAC の構成サブユニットと RING/HECT 型反応を介した直鎖状ユビキチン産生

(A) LUBAC を構成する HOIL-1L, HOIP, SHARPIN のドメイン構造と機能. Ub:ユビキチン, UBL:ユビキチン様, NZF:Npl4 型 Zn フィンガー, RING:RING フィンガー, IBR:in-between RING, PUB:PNGase/UBA or UBX, ZF:Zn フィンガー, UBA:ユビキチン結合, LDD:linear ubiquitin determining domain.

(B) HOIP の C 末端領域における直鎖状ユビキチン産生機構のモデル 23,24 . ①HOIP は N 末端領域で HOIL-1L や SHARPIN に結合することで自己阻害から解放される。②RING1 にドナーとなる E2-ユビキチンが,LDD にアクセプターとなるユビキチンが結合し,N 末端特異的結合を導くよう保持する。③E2-ユビキチンから RING2 の Cys885 にチオエステル結合を介してユビキチンが転移したのち,④LDD 内のユビキチンの N 末端を介して連結し,直鎖状ユビキチンが産生される。

あったが、2007年に慢性皮膚炎や免疫不全を自然発症す る cpdm (chronic proliferative dermatitis) マウスの原因遺伝 子として Sharpin 変異が同定されたことは大きなブレイク スルーとなった19. cpdm マウスは生後3~5週で重篤な皮 膚炎を発症するとともに脾腫, 二次リンパ節やパイエル板 の欠損、免疫グロブリン低下、骨ミネラルや骨密度の減少 を示し²⁰⁾、これはヒトでは NEMO の遺伝変異で見られる EDA-ID (無汗性外胚葉異形成性免疫不全症) に類似して いる. 我々は他の2グループと同時にSHARPINがHOIL-1L, HOIPとともにLUBACを形成する生理的なサブユ ニットであることを同定し, cpdm マウスでは SHARPIN 欠失によって LUBAC が不安定化することで古典的 NF-κB シグナルが不全になることを明らかにした^{17,21,22)}. LUBAC はE3活性中心を担うHOIPにアクセサリータンパク質で ある HOIL-1L や SHARPIN が会合した約 600 kDa の高分 子量複合体であるが、その構成比率や全体構造は不明であ り,今後の重要な研究課題である.

2) LUBAC の直鎖状ユビキチン鎖生成機構

我々は、HOIPの RING1 や RING2 の変異では直鎖状ユビキチン産生が喪失するが HOIL-1L では影響がないことから、HOIPの RING フィンガーが E3 活性中心として重

要であることを明らかにしていた¹²⁾. また, LUBAC はエ ピトープタグを付した人工的なユビキチンでは直鎖状ユビ キチンを生成できないことから、ユビキチンのN末端領 域を特異的に識別する機構があると考えていた. 最近, Sixma と Rittinger のグループによって独立に HOIP の直鎖 状ユビキチン生成機構が報告された (図1B)^{23,24)}. その結 果、①HOIPのUBA領域はE3活性に対して自己阻害能を もち、この領域が HOIL-1L や SHARPIN に会合すること で抑制から解放している、②ユビキチンをチャージした E2 は HOIP の RING1 に結合したのち、RING2 の Cys885 にチオエステル結合を介してユビキチンを一過性に転移す るという RING/HECT ハイブリッド型 E3 の反応機構をも つ、③HOIPのRING2よりC末端のLDD (Linear ubiquitin chain Determining Domain) と命名された領域でアクセプ ターとなるユビキチンを捕捉して N 末端特異的結合を規 定する、④RING2 にチオエステル結合したドナーとなる ユビキチンは,LDD に結合したアクセプターユビキチン の N 末端 α-NH₂ 基にペプチド結合で連結されることで直 鎖状ユビキチンが産生される、というプロセスからなるこ とが示された (図 1B)^{23,24)}. これらの解析は LUBAC の直 鎖状ユビキチン産生の生化学的機構を説明しうるものだ が、今後、結晶構造解析による詳細な分子認識メカニズム

2013年 6月] 417

の解明や基質タンパク質へのユビキチン付加反応の解明が 期待される.

3) LUBAC による古典的 NF-κB 経路活性化機構

我々は LUBAC が転写系へ影響を与える可能性を考え, 各種ルシフェラーゼレポーターを用いてスクリーニングを 行い, LUBAC の過剰発現によって NF-κB 活性が特異的に 亢進することを見いだした. LUBAC の過剰発現では IKKα-IKKβ-NEMO からなる古典的経路の IKK が活性化 し、IκBαのリン酸化・分解を誘起することで p65/p50 の 核移行を促進することから古典的 NF-κB 経路を特異的に 活性化することが示された16. さらに, LUBAC は炎症性 サイトカインの刺激に伴ってIKKの制御因子である NEMO を直鎖状ユビキチン化することを明らかにした(図 2). その後、Walczak らは LUBAC が TNF 受容体複合体の 構成因子の一つであり、TRADD、TRAF2(TNF 受容体関 連因子 2), c-IAP-1/2 に依存して TNF 受容体に会合する こと、NEMO だけでなく RIP1 も直鎖状ユビキチン化する ことを報告した²⁵⁾. TNF-α シグナルを例に現在の知見を総 合して LUBAC による NF-xB 活性化機構をまとめると、 まず、①TNF-α刺激に伴い、TNF 受容体のオリゴマー化 と TRADD や RIP1 の会合や TRAF2-c-IAP-1/2 による RIP1 ユビキチン化が起こる、②c-IAP1/2 が産生する連結型不明のポリユビキチン鎖に LUBAC が会合し、RIP1 や NEMO を直鎖状ユビキチン化する、③NEMO 内には直鎖状ユビキチンに強く結合する UBAN ドメインが存在し、直鎖状ユビキチンを足場として多分子の IKK 複合体が集積する、④IKK の分子間相互作用によって IKKβ が活性化し、IKB α をリン酸化・プロテアソーム分解に導くことで古典的経路の NF- κ B(p65/p50)が核移行して標的遺伝子の転写を亢進すると考えられる(図 2) 9,10 .

従来の古典的 NF-кB 活性化モデルでは、炎症性サイトカイン刺激に伴って E3 酵素である TRAF タンパク質が Ubc13/Uev1a を E2 として K63 ポリユビキチン鎖を産生し、これを足場に TAK1/TAB 複合体が集積することで、IKK や JNK などの MAP キナーゼを活性化すると考えられていた26. ユビキチンの Met1 と Lys63 は近傍に位置し、直鎖状ポリユビキチン鎖と K63 ポリユビキチン鎖は類似した伸びた数珠状の構造をとる27. しかし、NF-кB 関連因子でも TAB2 や TAB3 の NZF ドメインは K63 ユビキチンに結合するが28, HOIL-1L の NZF ドメインや NEMO の UBAN ドメインは直鎖ユビキチンに特異的に結合するな

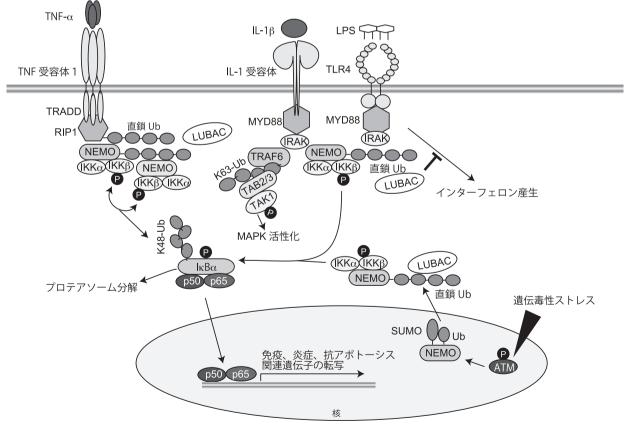


図2 LUBAC による NF-кB 制御

LUBAC は NEMO や RIP1 を直鎖状ユビキチン化することで,TNF- α や IL-1 β など炎症性サイトカインによる NF- κ B 活性化を導くのみならず,TLR など自然免疫応答や遺伝毒性ストレスによる NF- κ B 活性化においても重要な役割を司る.

〔生化学 第85巻 第6号

ど^{14, 29,30)}, それぞれのユビキチン鎖に特異的な結合タンパク質が同定されており, その結果として機能的にも差違を与えると示唆されている (構造生物学的詳細に関しては西増らの稿を参照).

NEMO は古典的 NF-кB 経路活性化に必須の因子であり、 キナーゼである IKKαや IKKβ に結合するだけでなく, UBAN ドメインや C 末端の NZF ドメインを介してユビキ チン鎖に結合することも知られる^{29,30)}.しかし、UBANド メインは直鎖ユビキチンとの結合のみならず, K63 ユビキ チンとの共結晶構造も報告されたことから310、いまだ生理 的な NF-κB 活性化に寄与するユビキチン鎖は不明であっ た. そこで我々は、全長の NEMO を用いて各種ユビキチ ン鎖結合を解析したところ, NEMO は直鎖状ユビキチン に高親和性に、K63 ユビキチンには低親和性に結合するタ ンパク質であることが明らかになった32). さらに, ① NEMO に 2 分子以上のユビキチンが直鎖状に付加される と十分な NF-кВ 活性化が導かれるが, K63 ユビキチンの 場合は長鎖ポリユビキチン生成が必要なこと、②UBAN ドメイン内の直鎖状ユビキチン特異的結合に関わる残基を 変異するとNF-κB活性化が喪失すること、③NEMOの UBAN や NZF ドメインを K63 ユビキチン結合性の TAB2 由来 NZF ドメインに置換したキメラタンパク質を用いた 解析から、K63 ユビキチン結合性の NEMO は NF-κB 活性 化が減弱することが示された32.これらの結果から、古典 的 NF-кB 経路では直鎖状ユビキチン鎖と K63 ユビキチン 鎖を使い分けることで活性の強弱が調節されている可能性 が示されてきた.

4) LUBAC 変異による疾患

Sharpin 遺伝子に異常をもつマウス (cpdm マウス) は, 重篤な皮膚炎や免疫不全を呈するが、同様に HOIP のアク セサリータンパク質である HOIL-1L のノックアウトマウ スでは、古典的 NF-кB 活性化の減弱が細胞レベルで検出 されるものの顕著な表現型を示さない16.しかし最近、ヒ ト HOIL-1L の遺伝子変異によって炎症や免疫不全となる 2家系が見いだされ、LUBAC 欠損によって疾患が惹起さ れることが明確になった33). まず, フランスとイタリアか ら見いだされた発熱,全身の炎症,細菌易感染,免疫不 全, 肝脾腫, 心筋へのアミロペクチン様沈着を呈する患者 において、HOIL-1L遺伝子内の塩基欠失により中途終止 コドンを生じていることが同定された. 患者由来の線維芽 細胞やB細胞では、HOIL-1Lが欠損することでHOIPや SHARPIN の発現レベルも低下し、TNF-α、IL-1β、CD40 リガンド刺激及び Toll 様受容体 (TLR) を介する NF-κB 活性化が減弱していた. また、TNF- α や IL-1 β 刺激に伴う NEMO の受容体への集積や RIP1 と IRAK1 のユビキチン 化も低下していた. NF-κB標的遺伝子の発現レベルを解 析すると IL-1 β 刺激後の標的遺伝子発現に大きな低下が見られることから,HOIL-1L 欠損は主に IL-1 β シグナルに影響を与えると考えられた(図 2). しかし興味深いことに,HOIL-1L 欠損患者由来の末梢血単核球では,IL-1 β 刺激によって NF- κ B 標的遺伝子が過剰に産生されるという全く逆の反応が示された³³⁾. このように,動物種や細胞種によって HOIL-1L 欠損は異なる表現型や NF- κ B シグナル応答を示し,NF- κ B 制御の破綻が疾患に連関する可能性が高い.今後,さらなる解明が待たれる.

5) 自然免疫応答における LUBAC の役割

自然免疫は、細菌やウイルス感染時における最初の生体防御反応として広汎な生物種で重要な役割を司る。細菌やウイルスに特徴的な病原体関連分子パターン(細菌壁構成成分やウイルスの DNA や RNA など)は、Toll 様受容体(TLR)、RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) 様受容体(RLR)、NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) 様受容体(NLR) によってそれぞれ特異的なリガンドが認識され、NF-кB 活性化による炎症性サイトカインの発現や IRF(interferon regulatory factor)3 活性化を介した I 型インターフェロン産生を導く³⁴⁾。

自然免疫応答における LUBAC の役割に関して,まず SHARPIN が欠損した cpdm マウス由来の細胞では,TLR4 リガンド(LPS)や TLR2 リガンド(PamsCSK4)による NF- κ B 活性化が減弱することから,LUBAC は TLR を介した NF- κ B 制御に関わることが示された(図 2) 21 . また,RLR を介した経路では,LUBAC が TRIM25 と IRF3 のプロテアソーム分解を誘起することや直鎖状ユビキチン化された NEMO が TRAF3 と会合することで NF- κ B 経路は活性化 するがインターフェロン産生経路を抑制すると示されている 35,36 . さらに,NLR を介した自然免疫応答でも XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)が産生するユビキチン鎖に LUBAC が集積することが NF- κ B 活性化に重要であることが報告された 37 . このように LUBAC は自然免疫応答においても NF- κ B 経路を活性化するとともにインターフェロン産生経路の制御に関わることが明らかになりつつある.

6) 抗がん剤応答における直鎖状ユビキチン鎖生成の寄与

抗がん剤など DNA 損傷を与える薬剤は、遺伝毒性ストレス(genotoxic stress)となり、核内から惹起される NF- κ B 活性化を起こす。この経路では DNA 損傷によって活性化した ATM(ataxia telangiectasia mutated)キナーゼが遊離の NEMO をリン酸化することで、NEMO のユビキチン化やユビキチン様タンパク質である SUMO(small ubiquitinlike modifier)結合を誘導する。その結果、NEMO はサイトゾルへ移行して $IKK\alpha/\beta$ と結合することで $NF-\kappa$ B 経路を活性化する³⁸⁾。興味深いことに、遺伝毒性ストレスに

よって引き起こされる NEMO の修飾部位は、LUBAC が直鎖状ポリユビキチン化する Lys 残基と同一であるため、Niu らは、遺伝毒性ストレス応答における LUBAC の役割を解析したところ、HOIL-1L や SHARPIN の欠損細胞では抗がん剤(エトポシドやドキソルビシンなど)による NF-κB 活性化が減弱することや、これらの薬剤は LUBAC による NEMO の直鎖状ユビキチン化を導くことを見いだした(図 2)³⁹. LUBAC による NEMO の直鎖状ポリユビキチン化は遺伝毒性ストレスによる NF-κB 活性化にも重要な役割を果たすと考えられる.

LUBAC による NF-κB 活性化を抑制する 脱ユビキチン化酵素

1) CYLD と A20 による異なる LUBAC 活性阻害様式

キナーゼの連鎖的活性化後に標的タンパク質がリン酸化 されたのち、プロテインホスファターゼによってリン酸基 が除去されることで制御されるように、E1-E2-E3の連鎖 反応によるタンパク質のユビキチン化は, 脱ユビキチン化 酵素によって負に制御される. 脱ユビキチン化酵素はヒト では約100種存在し、活性中心にCvsをもつUCH型 (ubiquitin C-terminal hydrolyase), USP 型 (ubiquitin-specific proteases), OTU型 (ovarian tumor), ジョセフィン(Josephine) 型と、活性中心に Zn イオンをもつ JAMM/MPN⁺型に分類 される⁶. LUBAC を負に抑制する脱ユビキチン化酵素に ついては全く不明であったので、まず我々はNF-кB経路 の制御に関わることが報告されていたOTU型のA20 (TNFAIP3) と Cezanne, USP型の CYLD に着目して抑制 能を解析した⁴⁰⁾. その結果, A20 と CYLD は発現量を増加 させると LUBAC 発現による NF-кB 活性化を強く阻害す るが、Cezanne は抑制効果が低いことが示された。そこ で、A20とCYLDに絞って解析を進めた. CYLDはUSP 型の脱ユビキチン化酵素で、その遺伝子変異が円柱腫や毛 包上皮腫を引き起こすことから、NF-кB 制御を介して制 がん遺伝子として機能すると考えられる. 我々は、CYLD は K63 と直鎖状ユビキチン鎖を分解するが K48 ユビキチ ン鎖は分解できないこと、CYLD の活性中心 Cys を変異す ると阻害能が喪失することを見いだし, CYLD は脱ユビキ チン化酵素活性依存的に LUBAC による NF-κB 活性化を 抑制することを示した (図 3A)41).

一方、A20 は N 末端領域に OTU ファミリーの脱ユビキチン化酵素ドメインをもち、C 末端領域に七つの ZF ドメインをもつ(図 3B) 42 . 興味深いことに我々は、A20 は K63 と K48 ポリユビキチン鎖を分解するが直鎖状ポリユビキチン鎖を全く分解できず、A20 の活性中心 Cys を変異しても阻害能を保持することから脱ユビキチン化酵素活性には依存しない抑制機構をもつと考えた。そこで、A20 の

構造ドメインのうち、LUBACを介する NF- κ B 活性化の抑制に重要な領域の絞り込みを行い、A20の7番目の ZFドメイン (ZF7) が阻害活性に必須であることを同定した 411 . A20 ZF 領域のユビキチン結合性を詳細に調べた結果、ZF1 \sim 7 では直鎖と K63 のユビキチンに結合するが、ZF1 \sim 6 では K63 ユビキチン結合性は残るものの直鎖ユビキチン結合性は喪失することから ZF7 が直鎖状ユビキチン結合部位であることが示唆された。実際に、GST-ZF7を用いて全 8 通りの結合のユビキチン鎖をプルダウンしたところ、GST-ZF7 は直鎖ユビキチンに特異的に結合(K_a =9 μ M)することを同定した。さらに A20 ZF7 と直鎖状ユビキチンとの共結晶構造解析を行い、ZF7 が遠位と近位の直鎖状ユビキチンを同時に識別することを明らかにした (詳細は西増らの稿を参照) 411 .

これまで A20 の生理機能としては,①OTU ドメインの脱ユビキチン化酵素活性によって RIP1 から K63 ポリユビキチン鎖を除去したのち,ZF4 を E3 活性中心として K48 ポリユビキチン鎖を付加することで RIP1 を分解させる 43 ,②ZF 領域で UbcH5 や Ubc13 などの E2 に結合することで TRAF2 や c-IAP などの E3 活性を減弱させる 44 ,③ZF4 や ZF7 が K63 ユビキチン結合部位である 45,46 ,など様々な報告があるが,今回初めて A20 が ZF7 を介して直鎖状ユビキチンに特異的に結合することで NF- κ B 活性制御を司ることが明らかになった(図 3B) 41,47 .

2) B 細胞リンパ腫発症における直鎖状ユビキチン制御の 重要性

A20 は NF-κB 活性化に伴って顕著に誘導される標的遺 伝子であり、NF-κBのネガティブフィードバック機構と して重要な役割を果たす.したがって、A20のノックアウ トマウスは、NF-κB活性が過剰亢進するため、メンデル 則に従って出生するものの1週後から多臓器に重篤な炎症 が起こる48.一方,ヒトでのA20遺伝子変異は主にB細 胞リンパ腫を引き起こし49~51), さらに A20 の遺伝子多型 (SNPs) が、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、乾 癬、セリアック病、クローン病、I型糖尿病など自己免疫 疾患や炎症性疾患発症に関わる42,52). B細胞リンパ腫は悪 性リンパ腫の一種で、特徴的な多核細胞が現れるホジキン リンパ腫とそれ以外の非ホジキンリンパ腫に大別され、本 邦では非ホジキンリンパ腫患者が多い. A20 遺伝子変異は ホジキン・非ホジキン両リンパ腫を引き起こし、現在では B細胞リンパ腫発症原因の約18%を占めるに至っている. これまでに、多数の A20 遺伝子のノンセンス変異やミス センス変異が同定されたが、これらの結果からインタクト な ZF7 を欠損すると、大部分の A20 が発現されたとして もB細胞リンパ腫を引き起こすことが明らかにされてい る52)。

〔生化学 第85卷 第6号

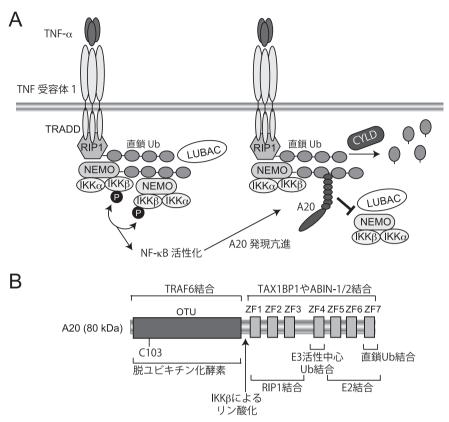


図3 LUBACを介した NF-кB 活性化の脱ユビキチン化酵素(A20, CYLD)による制御 (A) LUBAC が直鎖状ユビキチン生成を介して NF-кB 活性化を導いたのち, CYLD は直鎖状ユビキチンを分解することで NF-кB 活性を抑制する. 一方, A20 は ZF7 を介して直鎖状ユビキチン鎖に結合することで, LUBAC や IKK の受容体への会合を阻止する. これら脱ユビキチン化酵素が異なる制御機構で LUBAC 活性抑制に寄与する. (B) A20 のドメイン構造と機能.

そこで我々は、非ホジキンリンパ腫を引き起こす A20 ZF7 内のミスセンス変異として同定された Asn772→Lys (N772K) 変異体と Glu781→Asp (E781D) 変異体に着目して解析を進めたところ 51 , これらの変異によって ZF7 の直鎖状ユビキチン結合能が喪失すること、野生型の A20 では TNF- α 刺激直後に TNF 受容体へ集積して IKK や LUBAC の受容体への会合を調節しているが(図 3A)、ZF7 変異体では刺激後の TNF 受容体への集積が低下するため NF- κ B 活性が抑制されないことを突き止めた 41 . これらの結果は、A20 は ZF7 の直鎖状ユビキチン結合能を介して 受容体近傍に集積していること、その不全は NF- κ B 活性の持続的亢進となり B 細胞リンパ腫を発症させることを 示唆している。したがって、直鎖状ユビキチン結合性を標的として NF- κ B 活性を抑制することで新たな創薬が期待できると我々は考えており、研究進展を図っている。

5. おわりに

本稿では、直鎖状ユビキチン化という新しい翻訳後修飾を司る LUBAC による NF-κB シグナル制御に関して我々

の研究成果を中心に現状を解説した. NF-κB 経路では K63 ユビキチン化の研究が先行しており、直鎖状ユビキチン化の寄与に関しては発見当初、厳しい意見もあったが、現在では主要な NF-κB 制御メカニズムとして確固たる役割を果たしていると認識されるに至り、自然・獲得免疫制御や炎症応答では極めて重要な翻訳後修飾といえる. したがって、LUBAC による NF-κB 制御の破綻は、がん、自己免疫疾患、炎症性疾患、生活習慣病などの病因に連関すると考えられ、実際にマウスレベルの解析や HOIL-IL 欠損症患者の炎症、免疫不全発症の発見は遺伝学的にもLUBAC や直鎖状ユビキチン化の重要性を強力に支持している. 今後、より詳細な生理機構の解明とともに LUBAC や直鎖状ユビキチン鎖を標的とした創薬研究が遂行され、新たな治療薬が生まれることを強く期待している.

謝辞

本稿で紹介した研究は、岩井一宏教授(現:京都大学大学院医学研究科)研究室所属時に発表または着手したものである。また、A20の直鎖状ユビキチン結合に関しては濡

木理教授(東京大学大学院理学系研究科)研究室との共同研究である。本研究に関わった多くの共同研究者に深く御礼申し上げます。

文 献

- Vallabhapurapu, S. & Karin, M. (2009) Annu. Rev. Immunol., 27, 693-733.
- 2) Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2012) Genes Dev., 26, 203-234.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) Annu. Rev. Biochem., 67, 425–479.
- Glickman, M.H. & Ciechanover, A. (2002) Physiol. Rev., 82, 373–428.
- 5) Pickart, C.M. (2001) Annu. Rev. Biochem., 70, 503-533.
- Komander, D., Clague, M.J., & Urbe, S. (2009) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 10, 550–563.
- Wenzel, D.M., Lissounov, A., Brzovic, P.S., & Klevit, R.E. (2011) *Nature*, 474, 105–108.
- Komander, D. & Rape, M. (2012) Annu. Rev. Biochem., 81, 203–229.
- 9) Tokunaga, F. & Iwai, K. (2012) Endocr. J., 59, 641-652.
- Tokunaga, F. & Iwai, K. (2012) Microbes Infect., 14, 563– 572.
- 11) Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M., Rouault, T.A., Morishima, I., Minato, N., Ishimori, K., & Iwai, K. (2003) Nat. Cell Biol., 5, 336–340.
- 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) Yagi, H., Ishimoto, K., Hiromoto, T., Fujita, H., Mizushima, T., Uekusa, Y., Yagi-Utsumi, M., Kurimoto, E., Noda, M., Uchiyama, S., Tokunaga, F., Iwai, K., & Kato, K. (2012) EMBO Rep., 13, 462–468.
- 14) Sato, Y., Fujita, H., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., Kaiser, S.E., Iwai, K., & Fukai, S. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108, 20520–20525.
- Madsen, L., Seeger, M., Semple, C.A., & Hartmann-Petersen, R. (2009) Int. J. Biochem. Cell Biol., 41, 2380-2388.
- 16) Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., & Iwai, K. (2009) Nat. Cell Biol., 11, 123–132.
- 17) Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., & Iwai, K. (2011) *Nature*, 471, 633–636.
- 18) Lim, S., Sala, C., Yoon, J., Park, S., Kuroda, S., Sheng, M., & Kim, E. (2001) Mol. Cell Neurosci., 17, 385–397.
- Seymour, R.E., Hasham, M.G., Cox, G.A., Shultz, L.D., Hogenesch, H., Roopenian, D.C., & Sundberg, J.P. (2007) Genes Immun., 8, 416–421.
- HogenEsch, H., Janke, S., Boggess, D., & Sundberg, J.P. (1999) J. Immunol., 162, 3890–3896.
- 21) Gerlach, B., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Emmerich, C.H., Rieser, E., Haas, T.L., Webb, A.I., Rickard, J.A., Anderton, H., Wong, W.W., Nachbur, U., Gangoda, L., Warnken, U., Purcell, A.W., Silke, J., & Walczak, H. (2011) *Nature*, 471, 591–596.
- 22) Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skanland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Schaefer, L., Rittinger,

- K., Macek, B., & Dikic, I. (2011) Nature, 471, 637-641.
- 23) Smit, J.J., Monteferrario, D., Noordermeer, S.M., van Dijk, W. J., van der Reijden, B.A., & Sixma, T.K. (2012) *EMBO J.*, 31, 3833–3844.
- 24) Stieglitz, B., Morris-Davies, A.C., Koliopoulos, M.G., Christo-doulou, E., & Rittinger, K. (2012) EMBO Rep., 13, 840–846.
- 25) Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., Koschny, R., Komander, D., Silke, J., & Walczak, H. (2009) Mol. Cell, 36, 831–844.
- 26) Chen, Z.J. (2005) Nat. Cell Biol., 7, 758–765.
- 27) Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J.D., Odenwaelder, P., Wilkinson, K.D., & Barford, D. (2009) EMBO Rep., 10, 466–473.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., & Fukai,
 S. (2009) EMBO J., 28, 3903–3909.
- 29) Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S., & Dikic, I. (2009) Cell, 136, 1098–1109.
- 30) Lo, Y.C., Lin, S.C., Rospigliosi, C.C., Conze, D.B., Wu, C.J., Ashwell, J.D., Eliezer, D., & Wu, H. (2009) Mol. Cell, 33, 602–615.
- 31) Yoshikawa, A., Sato, Y., Yamashita, M., Mimura, H., Yama-gata, A., & Fukai, S. (2009) FEBS Lett., 583, 3317–3322.
- 32) Kensche, T., Tokunaga, F., Ikeda, F., Goto, E., Iwai, K., & Dikic, I. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 23626–23634.
- Boisson, B., Laplantine, E., Prando, C., Giliani, S., Israelsson, E., Xu, Z., Abhyankar, A., Israel, L., Trevejo-Nunez, G., Bogunovic, D., Cepika, A.M., MacDuff, D., Chrabieh, M., Hubeau, M., Bajolle, F., Debre, M., Mazzolari, E., Vairo, D., Agou, F., Virgin, H.W., Bossuyt, X., Rambaud, C., Facchetti, F., Bonnet, D., Quartier, P., Fournet, J.C., Pascual, V., Chaussabel, D., Notarangelo, L.D., Puel, A., Israel, A., Casanova, J.L., & Picard, C. (2012) Nat. Immunol., 13, 1178-1186.
- 34) Kawai, T. & Akira, S. (2011) Immunity, 34, 637-650.
- 35) Inn, K.S., Gack, M.U., Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.Y., Iwai, K., & Jung, J.U. (2011) Mol. Cell, 41, 354–365.
- 36) Belgnaoui, S.M., Paz, S., Samuel, S., Goulet, M.L., Sun, Q., Kikkert, M., Iwai, K., Dikic, I., Hiscott, J., & Lin, R. (2012) Cell Host Microbe, 12, 211–222.
- 37) Damgaard, R.B., Nachbur, U., Yabal, M., Wong, W.W., Fiil, B.K., Kastirr, M., Rieser, E., Rickard, J.A., Bankovacki, A., Peschel, C., Ruland, J., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Kaufmann, T., Strasser, A., Walczak, H., Silke, J., Jost, P.J., & Gyrd-Hansen, M. (2012) Mol. Cell, 46, 746–758.
- 38) Miyamoto, S. (2011) Cell Res., 21, 116-130.
- Niu, J., Shi, Y., Iwai, K., & Wu, Z.H. (2011) EMBO J., 30, 3741–3753.
- Harhaj, E.W. & Dixit, V.M. (2012) Immunol. Rev., 246, 107– 124.
- 41) 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.
- Ma, A. & Malynn, B.A. (2012) Nat. Rev. Immunol., 12, 774–785.
- 43) Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V., & Dixit, V.M. (2004) *Nature*, 430, 694–699.
- 44) Shembade, N., Ma, A., & Harhaj, E.W. (2010) Science, 327, 1135–1139.

422 〔生化学 第 85 巻 第 6 号

- 45) Bosanac, I., Wertz, I.E., Pan, B., Yu, C., Kusam, S., Lam, C., Phu, L., Phung, Q., Maurer, B., Arnott, D., Kirkpatrick, D.S., Dixit, V.M., & Hymowitz, S.G. (2010) Mol. Cell, 40, 548– 557
- 46) Skaug, B., Chen, J., Du, F., He, J., Ma, A., & Chen, Z.J. (2011) Mol. Cell, 44, 559–571.
- 47) Verhelst, K., Carpentier, I., Kreike, M., Meloni, L., Verstrepen, L., Kensche, T., Dikic, I., & Beyaert, R. (2012) EMBO J., 31, 3845–3855.
- 48) Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P., & Ma, A. (2000) Science, 289, 2350–2354.
- 49) Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y.,

- Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y., & Ogawa, S. (2009) *Nature*, 459, 712–716.
- 50) Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., & Pasqualucci, L. (2009) *Nature*, 459, 717–721.
- 51) Schmitz, R., Hansmann, M.L., Bohle, V., Martin-Subero, J.I., Hartmann, S., Mechtersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., Stanelle, J., Siebert, R., & Kuppers, R. (2009) J. Exp. Med., 206, 981–989.
- 52) Hymowitz, S.G. & Wertz, I.E. (2010) Nat. Rev. Cancer, 10, 332–341.