

## 直鎖状ポリユビキチン鎖の発見とその機能

岩井 一 宏

ユビキチン修飾系はタンパク質分解系の一部として発見された経緯もあり「ユビキチン」=「分解」として研究が進展したが、現在では分解に留まらず多彩な様式でタンパク質の機能を制御することが知られている。細胞内には多様なポリユビキチン鎖が存在しており、ポリユビキチン鎖の種類によってタンパク質の機能が異なる。筆者らはユビキチンのN末端を介して形成される新規な直鎖状ポリユビキチン鎖を発見し、直鎖状ポリユビキチン鎖は刺激依存的なNF- $\kappa$ B活性化に関与すること、その形成不全により、免疫不全、慢性炎症を惹起することを同定した。NF- $\kappa$ B活性化には多様なポリユビキチン鎖の関与が知られている。そこで、本稿では直鎖状ポリユビキチン鎖の発見の経緯、その生理的、病理的役割とNF- $\kappa$ B活性化における種々のポリユビキチン鎖の役割分担について解説する。

### 1. はじめに

タンパク質は生体で最も重要な生体高分子である。なぜなら、タンパク質は様々な大きさ、形をした分子を形成できるからである。大きさ、形は機能を担う重要な要素である；タイヤは丸いからこそ機能するのであり、タイヤが四角ければ自動車は困ってしまう。しかし、そのタンパク質も存在していれば恒常的に機能していれば良いのではなく、私たちの身体が正常に機能するためには、状況に応じてタンパク質の機能を変換することが必要であり、リン酸化をはじめとした翻訳後修飾が状況に応じたタンパク質の機能変換に果たす重要性はよく知られている。

ユビキチンはすべての真核生物に存在する76アミノ酸の小球状タンパク質であり、ATP依存的に標的タンパク質に結合することでタンパク質の機能を制御するタンパク質性の翻訳後修飾因子である<sup>1)</sup>。ユビキチンはエネルギー依存性タンパク質分解系の一部として発見された経緯もあり<sup>2)</sup>、「タンパク質のユビキチン修飾」=「分解」として研

究が進展した<sup>1)</sup>。ユビキチン依存性タンパク質分解系の重要性は時を得て選択的に基質タンパク質を識別してユビキチンを結合させることができる点にあり、状況に応じて細胞機能に重要なタンパク質を分解に至らしめる。このユビキチンを介したタンパク質分解系（従来はゴミ処理系のように考えられていた）の重要性が認知されるに至り、2004年にはユビキチン依存性タンパク質分解系の発見者たちにノーベル化学賞が授与された<sup>3)</sup>。ある研究分野がノーベル賞の対象に選ばれる時には、その分野は爆発的な進展は一段落して成熟期に達している場合がほとんどである。しかしながら、ユビキチン修飾系はその例には当てはまらず、現在もさらなる拡大を続けている。その理由は、時を得て選択的に基質タンパク質を識別して修飾する能力はタンパク質分解だけに適したものではなく、分解のみならず、多彩な様式でタンパク質の機能を制御することができるからである。実際にユビキチン修飾系は分解ではなくタンパク質の局在変化、タンパク質結合などを介してDNA修復、シグナル伝達、膜タンパク質のソーティングなどに関与していることが知られている<sup>4,5)</sup>。本稿ではまずユビキチン修飾に関するナイーブな疑問から派生した筆者らの直鎖状ポリユビキチン鎖の発見の経緯を概説し、明らかになってきた直鎖状ポリユビキチン鎖の生理的および病理的機構について議論したい。

京都大学大学院医学研究科細胞機能制御学（〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町）

Linear polyubiquitin chains: Discovery, function and future direction

Kazuhiro Iwai (Department of Molecular and Cellular Physiology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

## 2. ユビキチン修飾系の特徴

ユビキチン修飾系はE1 (活性化酵素)/E2 (結合酵素)/E3 (ユビキチンリガーゼ) の3種の酵素群の働きにより、E3が選択的に識別する標的タンパク質にATP 依存的にユビキチンを結合させる翻訳後修飾系である (図 1A)<sup>1)</sup>。時を得て選択的に標的タンパク質を識別することができることがユビキチン修飾系の重要性の源泉である。選択的に識別する分子であるE3は数多く存在しており、ヒトでは約700種類程度の特異性を異にするE3が存在していると考えられている<sup>4)</sup>。加えて、E3は標的タンパク質が存在していれば必ず識別するのではなく、リン酸化、プロリン水酸化などの翻訳後修飾をはじめとした標的タンパク質側の変化や、E3タンパク質の発現誘導なども時を得た選択的な基質識別において重要な役割を果たしていることが知られている<sup>6)</sup>。ユビキチン修飾系はタンパク質性の翻訳後修飾因子という大きな特徴に加え、多くの場合にはタンパク質に結合したユビキチンにユビキチンが次々に付加して生成されるユビキチンのポリマーであるポリユビキチン鎖が結合することでタンパク質の機能を制御する場合が多いと

いう特徴を有する<sup>1)</sup>。(ただし、ユビキチンが一つ結合するモノユビキチン化によってタンパク質の機能を制御する場合もある<sup>7)</sup>)。しかも、細胞内には多様なポリユビキチン鎖が存在していることが報告されている。ポリユビキチン鎖はユビキチンのリシン側鎖のε-アミノ基とユビキチンのC末端のカルボキシ基とがイソペプチド結合することで形成されることが知られていた<sup>1)</sup>。48番目のリシン側鎖 (K48) を介したポリユビキチン鎖がタンパク質の分解シグナルとなるが (図 1B)<sup>6)</sup>、K63 を介したポリユビキチン鎖は分解シグナルではなく、DNA 修復、シグナル伝達に機能する (図 1C) など<sup>9,10)</sup>、ポリユビキチン鎖の種類によってタンパク質の機能が異なると考えられている<sup>11)</sup>。生体にはユビキチンの7個のリシン側鎖の全てを介するポリユビキチン鎖が存在することが報告されており<sup>12)</sup>、近年11番目のリシン (K11) を介したポリユビキチン鎖もタンパク質分解に関与することが示されつつあるが<sup>13)</sup>、K63, K48 以外のリシンを介したポリユビキチン鎖の機能は明確ではなく、ユビキチン修飾系は現在想定されているより以上に多彩な役割を果たしている可能性が考えられる。

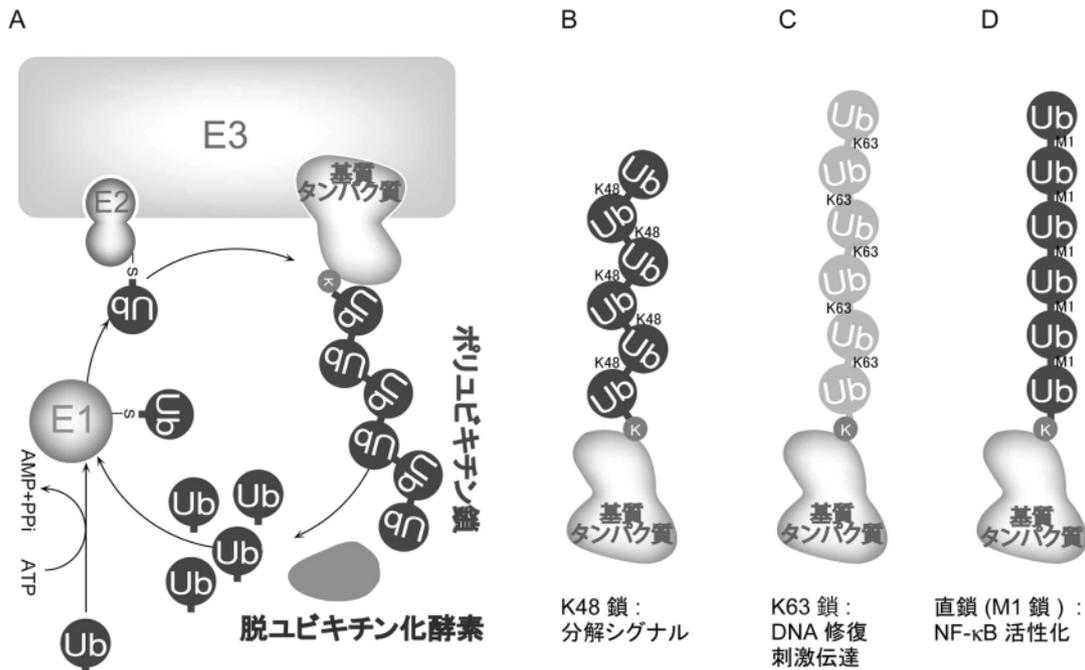


図 1 ユビキチン修飾系の概略

ユビキチン修飾系はE1 (活性化酵素)/E2 (結合酵素)/E3 (ユビキチンリガーゼ) の3種の酵素群の働きにより、基質タンパク質にユビキチン (Ub) を結合させる翻訳後修飾系である。ユビキチンと基質タンパク質との結合を加水分解する脱ユビキチン化酵素も存在することから、ユビキチン系は広くタンパク質の機能を制御する可逆的な翻訳後修飾系であると認識されている (A)。ユビキチン修飾系は多くの場合は連続的にユビキチンが結合することで生じるポリユビキチン鎖が指標となりタンパク質の機能を制御しており、ユビキチンの48番目のリシン (K48) を介したポリユビキチン鎖は基質タンパク質のプロテアソームによる分解シグナルとなるが (B)、K63 を介したポリユビキチン鎖はタンパク質結合ドメインとして機能し、シグナル伝達やDNA 修復に関与する (C)。筆者らが新たに同定した直鎖状ポリユビキチン鎖はNF-κB活性化に関与する (D)。

### 3. 直鎖状ポリユビキチン鎖と同ポリユビキチン鎖を選択的に生成するユビキチンリガーゼ複合体の同定

ポリユビキチン鎖の種類によってタンパク質の制御様式が異なることから、ユビキチン修飾系の役割を理解するためには選択的なポリユビキチン鎖生成メカニズムの解明が不可欠である。しかし、ポリユビキチン鎖を生成するメカニズムも完全には解明されていないのが現実であった<sup>14-16</sup>。そこで、筆者らはポリユビキチン鎖の生成機構に関する素朴な疑問から研究を進めた。

ポリユビキチン鎖はE1/E2/E3の3種類の酵素群が繰り返して反応することで標的タンパク質に結合したユビキチンにユビキチンが次々と結合することで生成されると考えられている(図1A)。しかしながら、E3の大多数を占めるRING型のE3はユビキチンと結合しているE2と標的タンパク質とに結合し、E2から基質へのユビキチンの転移を促進する<sup>4</sup>。単純に考えれば、図2に示すように、ポリユビキチン鎖の伸長につれて、活性中心が空間的に移動するという生化学反応の根幹を逸脱する現象が生じる。ポリユビキチン鎖の伸長に関してはいくつかの仮説が提唱されているが、ポリユビキチン鎖伸長機構はまだ完全には解明されていないのが現状である<sup>14</sup>。筆者らはHOIL-1L, HOIPと呼ばれる二つのタンパク質がRING型ユビキチンリガーゼ複合体を形成することを見いだした<sup>17,18</sup>。同複合体はE2との結合部位であるRING Fingerに加えて、ユビキチン結合部位を有していた。同複合体がそのユビキチン結合部位で、ポリユビキチン鎖の遠位端のユビキチン基質として識別してE2からのユビキチンの転移を触媒すれば、ポリユビキチン鎖が伸長しても活性中心の空間的位置

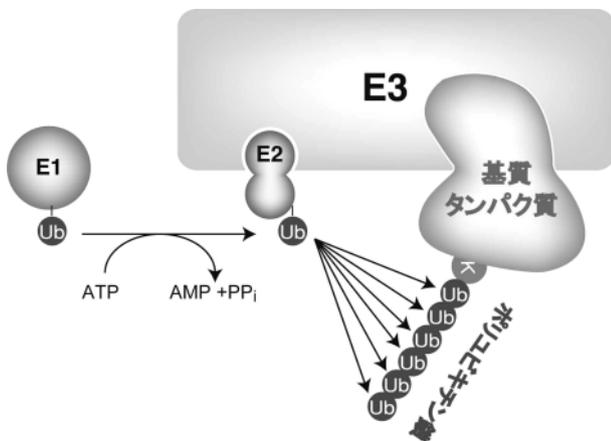


図2 ポリユビキチン鎖形成のパラドクス

E3の大多数を占めるRING型のE3はユビキチンと結合しているE2と標的タンパク質とに結合し、E2から基質へのユビキチンの転移を促進する。単純に考えれば、ポリユビキチン鎖が伸長するにつれて、活性中心が空間的に移動するという生化学反応の根幹を逸脱する現象が生じる。

は変化しない。そこで、N末端にユビキチンを付加した緑色蛍光タンパク質GFP(Ub-GFP)とGFPを人工基質として、試験管内ユビキチン化反応を行ったところ、同複合体はUb-GFPにのみユビキチンを付加した<sup>18</sup>。さらに、変異ユビキチンを用いた試験管内ユビキチン化反応を行ったところ、ユビキチンの7個のリシン残基を全てアルギニンに置換したユビキチンを用いてもポリユビキチン鎖が生成された<sup>18</sup>。質量分析でユビキチン間結合を解析したところユビキチンのC末端グリシンのカルボキシ基と別のユビキチンのN末端メチオニンの $\alpha$ -アミノ基のペプチド結合に由来するペプチド配列が同定されたことから、ユビキチンのリシン残基ではなく、N末端のメチオニンを介したポリユビキチン鎖が形成されることが明確となった。そこで、生成されたポリユビキチン鎖を直鎖状ポリユビキチン鎖と名付けた<sup>18</sup>。また、HOIL-1L, HOIPから形成される複合体はN末端にのみユビキチンを付加する、すなわち、直鎖状ポリユビキチン鎖のみを生成することも明らかとなった<sup>18</sup>。

### 4. 直鎖状ポリユビキチン鎖の生理機能：NF- $\kappa$ B活性化

筆者らはポリユビキチン鎖の生成メカニズムの解析を進める過程で、全く新しいタイプのユビキチン鎖である直鎖状ポリユビキチン鎖を発見した<sup>18</sup>。そこでその機能解析を進め、困難を極めたが、直鎖状ポリユビキチン鎖は刺激依存的なNF- $\kappa$ Bに関与することを明らかにした<sup>19</sup>。NF- $\kappa$ Bは炎症性サイトカインなどの多様な刺激によって活性化されて種々の遺伝子の発現を亢進させることで、免疫応答、炎症、細胞の生存などの多彩な生理作用を発揮する転写調節因子である<sup>20</sup>。その活性亢進がアトピー性皮膚炎、自己免疫疾患、がんを含め幾多の疾患に関与していることが知られており、PubMedでNF- $\kappa$ Bを検索すると40,000以上の論文がリストに登場するように、応用面も含めその重要性が広く認知されている<sup>21-23</sup>。NF- $\kappa$ BはRelファミリータンパク質の二量体から構成される転写因子であり、未刺激状態では阻害タンパク質と結合して細胞質に存在している<sup>24</sup>。NF- $\kappa$ Bは種々の刺激によって活性化されるが、活性化経路はcanonical, alternativeの二つの経路に大別され<sup>25</sup>、直鎖状ポリユビキチン鎖はcanonical経路にのみ関与する<sup>19,26</sup>。canonical経路ではNF- $\kappa$ B(主にp65/p50)は未刺激の状態では阻害タンパク質であるI $\kappa$ B $\alpha$ (inhibitor of  $\kappa$ B  $\alpha$ )と結合して細胞質に存在している。TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインやToll様受容体リガンドなどで刺激されると、IKK(I $\kappa$ B kinase)  $\alpha$ , IKK $\beta$ とNEMO(NF- $\kappa$ B essential modulator)から構成されるIKK複合体が活性化され(IKK $\beta$ の特定のセリン残基のリン酸化による<sup>24</sup>)<sup>27</sup>、I $\kappa$ B $\alpha$ をリン酸化してユビキチン依存的な分解に導く。その結果、NF- $\kappa$ BがI $\kappa$ B $\alpha$ から遊離して核に移行する<sup>24</sup>

(図3). alternative 経路は BAFF (B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family) や lymphotoxin- $\beta$  (LT- $\beta$ ) 受容体などの一部の TNF 受容体ファミリーのリガンドによって刺激され、主に RelB/p52 からなる NF- $\kappa$ B を活性化させる。未刺激状態では RelB は p52 の前駆体である NF- $\kappa$ B2/p100 と結合しており、p100 の C 末端部位が阻害タンパク質として機能することで細胞質に存在している。上記受容体のリガンドで刺激されると、未刺激状態では恒常的に分解されている NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) が安定化して IKK $\alpha$  をリン酸化する。リン酸化された IKK $\alpha$  が p100 をリン酸化することで p100 の C 末端部分が部分分解されて p52 に変換され、RelB/p52 が核に移行して活性化される<sup>28)</sup> (図4)。

直鎖状ポリユビキチン鎖が関与する canonical 経路では、IkB $\alpha$  のリン酸化依存的な分解以降の経路はほぼ確立して

いるが、非常に多くの研究が行われてきたにもかかわらず、刺激依存的な IKK 活性化機構はまだ完全には解明されていないのが現状である<sup>29)</sup>。筆者らは、TNF- $\alpha$  などの刺激依存的に IKK 複合体の活性調節サブユニットである NEMO が直鎖状ポリユビキチン化されることで、canonical な NF- $\kappa$ B 活性化に関与することを見いだした<sup>19)</sup>。次に、直鎖状ポリユビキチン鎖形成が NF- $\kappa$ B 活性化に必須であるかを検索するため、HOIL-1L のノックアウト (KO) マウスを作製した。HOIL-1L KO マウス由来細胞では NF- $\kappa$ B の活性化は強く減弱していたが、完全には消失していなかった<sup>19)</sup>。そこで、詳細に解析したところ、HOIL-1L KO 由来細胞では直鎖状ポリユビキチン鎖形成の活性中心である HOIP は少ないながらも発現していたので、HOIP が HOIL-1L 以外の分子と複合体を形成して存在する可能性を想定した。HOIL-1L の N 末端に存在する UBL ドメイン

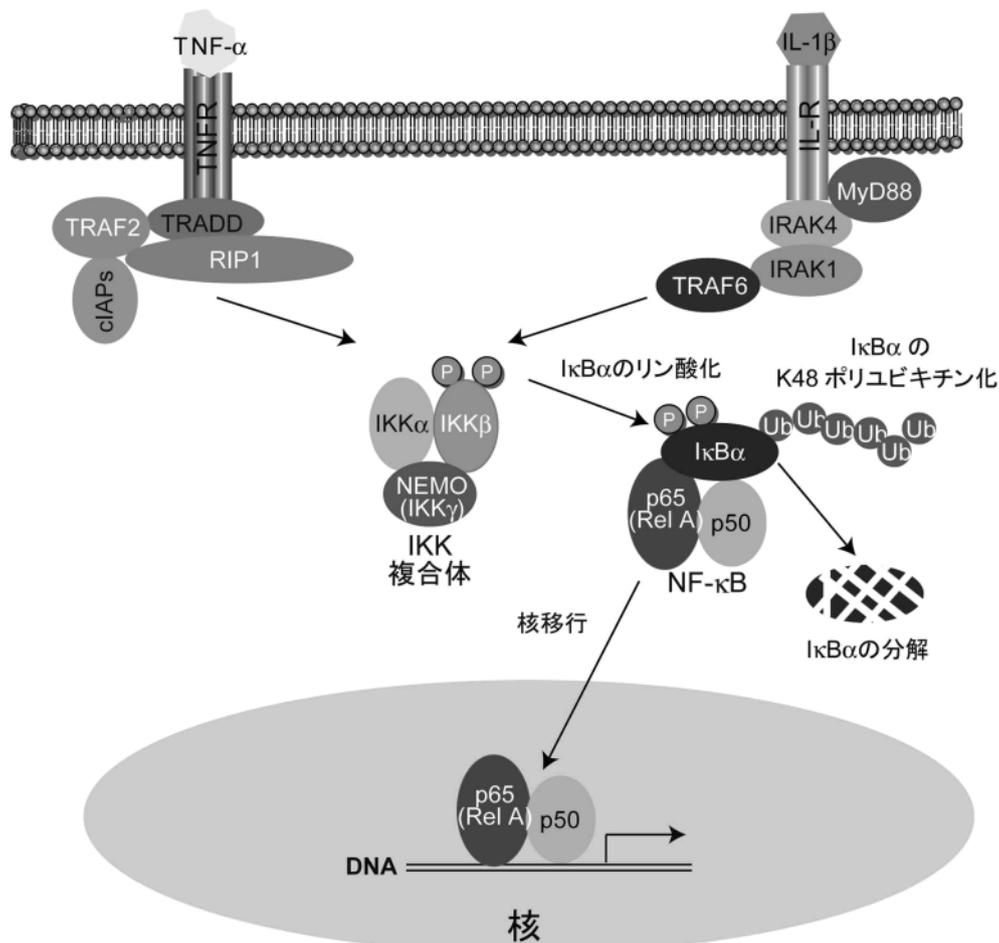


図3 canonical NF- $\kappa$ B 活性化機構

NF- $\kappa$ B はヘテロ (またはホモ) 二量体である。canonical 経路で活性化される NF- $\kappa$ B は主に p65/p50 であり、非活性化状態では阻害タンパク質である I $\kappa$ B $\alpha$  と結合して細胞質に存在している。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインなどで刺激されると、図示したシグナル分子が刺激された受容体にリクルートされ、IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  と NEMO から構成される IKK 複合体中の IKK $\beta$  がリン酸化されて活性化される。活性化 IKK は I $\kappa$ B $\alpha$  をリン酸化してユビキチン依存的な分解に導く。その結果、NF- $\kappa$ B が I $\kappa$ B $\alpha$  から遊離して核に移行して、種々の遺伝子の発現を亢進させる。

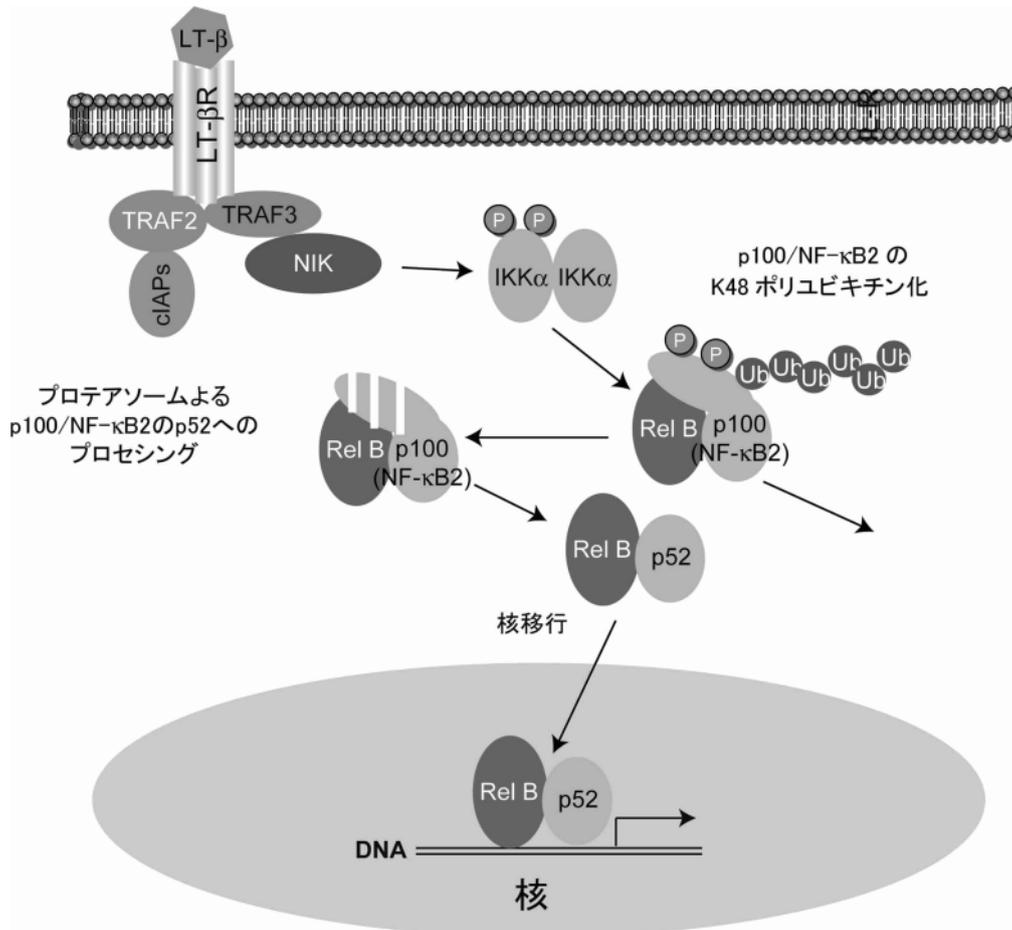


図4 alternative NF-κB 活性化機構

alternative 経路で活性化される NF-κB は主に RelB/p52 である。未刺激状態では RelB は p52 の前駆体である NF-κB2/p100 と結合しており、p100 の C 末端部位が阻害タンパク質として機能することで細胞質に存在している。BAFF や LT-β 受容体などの一部の TNF 受容体ファミリーのリガンドによって刺激されると、未刺激状態では恒常的に分解されている NIK が安定化して IKKα をリン酸化する。リン酸化された IKKα が p100 をリン酸化することで p100 の C 末端部分が部分分解されて p52 に変換され、RelB/p52 が核に移行して活性化される。

は HOIP との結合に、NZF ドメインは NF-κB 活性化に必須である<sup>18)</sup>。それらと高い相同性を有する領域を C 末端側に有する分子として SHARPIN を見いだしたので<sup>30)</sup>、HOIP は SHARPIN と結合して存在するのではないかと考えて解析を行った。結果は予想に反し、SHARPIN は HOIP と二量体を形成するのではなく、HOIL-1L、HOIP と 3 者で直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に生成するユビキチンリガーゼ複合体を形成すること (図 5)、TNF-α などの種々の刺激依存的に IKK 複合体の活性調節サブユニットである NEMO を識別して直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することで、IKK を活性化し NF-κB を活性化に導くことを明らかにした<sup>30)</sup> (図 6)。そこで、HOIL-1L-HOIP-SHARPIN 複合体を LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) と名付けた<sup>18,30)</sup>。

## 5. 直鎖状ポリユビキチン鎖形成不全による免疫不全と自己炎症性疾患様症状

SHARPIN は慢性皮膚炎などの多彩な症状を呈する自然変異マウスとして報告された cpdm (chronic proliferative dermatitis) マウスの責任遺伝子産物として同定されていた<sup>31)</sup> (図 7)。cpdm マウスは胸腺依存性抗原への免疫応答の低下、血中 IgG、IgA、IgE の低値、パイエル板欠損などの免疫不全と、慢性増殖性皮膚炎、関節、肺、食道、胃などの多彩な臓器、部位の炎症症状を呈する<sup>32-35)</sup>。しかしながら、cpdm マウスが上記のような多彩な症状を示す理由は不明であったので解析を進めた<sup>30,36,37)</sup>。cpdm マウス由来細胞では SHARPIN は完全に欠損しているが、LUBAC の他の構成成分である HOIL-1L と HOIP の発現レベルは非常に低下するものの、完全には消失していなかつ

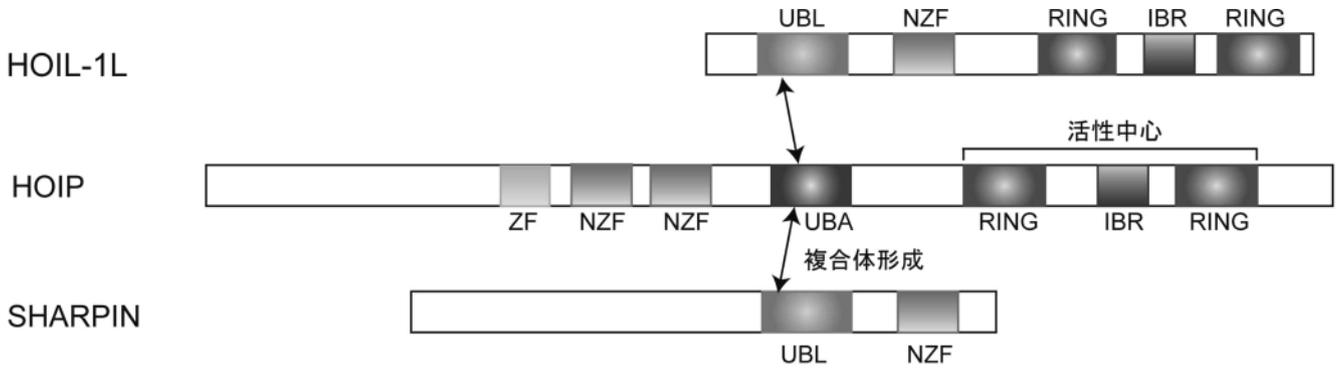


図5 LUBAC ユビキチンリガーゼの構造

LUBAC ユビキチンリガーゼは HOIL-1L, HOIP と SHARPIN から構成される。図示するように多くのドメインを有しており, HOIP の RING-IBR-RING が直鎖状ポリユビキチン鎖形成の活性中心である。HOIL-1L, SHARPIN の UBL ドメインと HOIP の UBA ドメインが複合体形成に関与する。HOIL-1L, HOIP, SHARPIN の NZF ドメインはユビキチン結合能を有する。

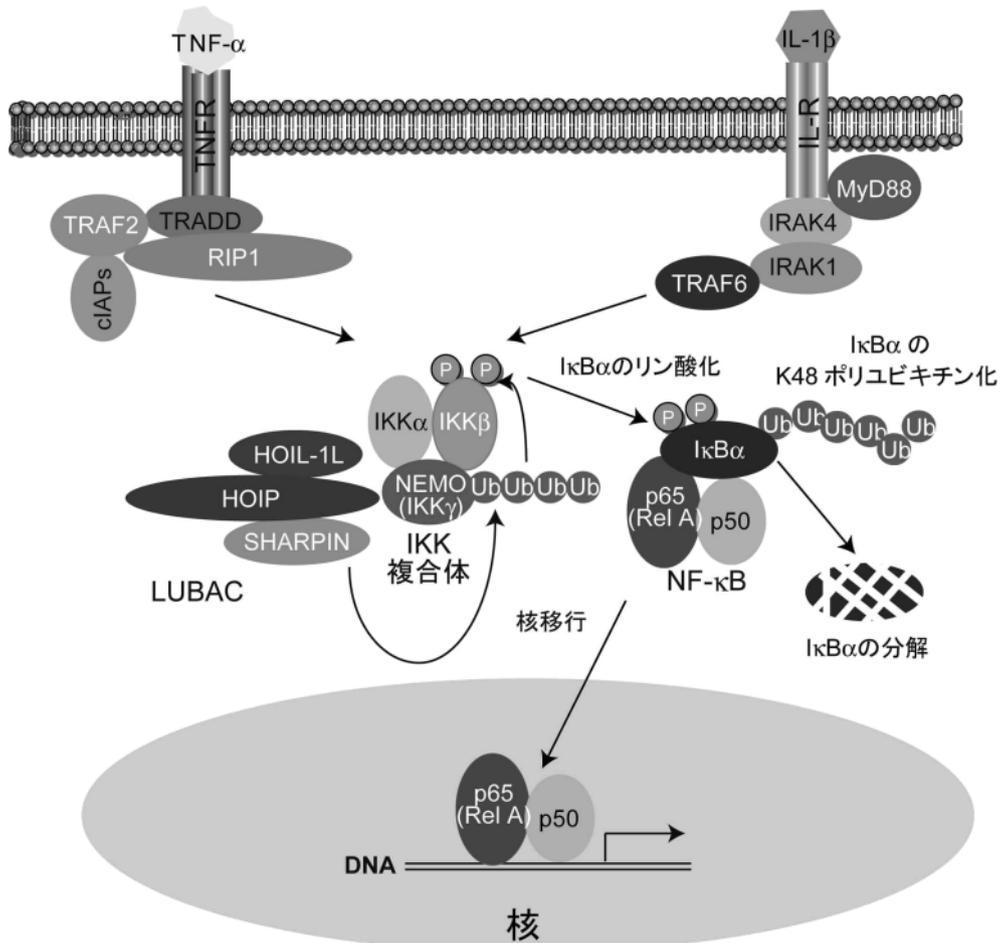


図6 canonical NF-κB 活性化における直鎖状ポリユビキチン鎖の役割

細胞が TNF-α や IL-1β, Toll 様受容体リガンドなどで刺激されると HOIL-1L, HOIP, SHARPIN からなる LUBAC ユビキチンリガーゼ複合体が NEMO と結合して, NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を結合させる。NEMO が直鎖状ポリユビキチン化されると IKK 複合体が活性化され, NF-κB と結合している IκBα をリン酸化, 分解へと導く。IκBα から遊離した NF-κB (この図では p65/p50 複合体) が核に移行して DNA と結合して, 種々の遺伝子の転写を亢進させる。



図7 cpdm マウスの慢性皮膚炎

た<sup>30, 36, 37</sup>。次に、cpdm マウス由来胎仔線維芽細胞 (MEF) に SHARPIN を発現させたところ、HOIL-1L, HOIP の発現も野生型マウス MEF とほぼ同じ量に回復したので、SHARPIN の欠損により LUBAC の他の二つのサブユニットが不安定化すると考えられた。TNF- $\alpha$  で刺激したところ、cpdm 由来 MEF では NF- $\kappa$ B の活性化は減弱していたが、完全には消失していなかった。SHARPIN 導入 cpdm MEF では野生型マウス由来 MEF と同等の NF- $\kappa$ B の活性化が認められた<sup>30</sup>。免疫グロブリンのクラススイッチに関与する TNF 受容体ファミリー分子の一つである CD40 は canonical, alternative 両経路の NF- $\kappa$ B を活性化させる<sup>38</sup>。cpdm マウスの脾臓 B 細胞の CD40 依存的な alternative な NF- $\kappa$ B 活性化はほぼ正常マウスと差がなかったが、canonical な NF- $\kappa$ B 活性化は減弱していた<sup>30</sup>。したがって、cpdm マウスの免疫不全症状はおそらく種々の刺激依存的な canonical な NF- $\kappa$ B 活性化の減弱によって生じると考えられる<sup>30</sup>。NF- $\kappa$ B は炎症反応の中核を担う転写因子であり、種々の炎症性疾患で活性が亢進している<sup>22</sup>。しかしながら、cpdm マウスは NF- $\kappa$ B 活性化が減弱しているにもかかわらず多彩な炎症症状を示す<sup>30, 36, 37</sup>。一方、筆者らが樹立した HOIL-1L KO マウスは cpdm マウスと同様に刺激依存的な NF- $\kappa$ B 活性化は減弱しているにもかかわらず顕著な炎症症状は示さない<sup>19</sup>。NF- $\kappa$ B 活性化の減弱だけで cpdm マウスの慢性炎症症状が発症するかどうかは明確ではない。そこで、MEF を用いて cpdm, HOIL-1L KO マウ

スの相違について解析を進め、cpdm マウス由来 MEF が HOIL-1L KO MEF に比して TNF- $\alpha$  依存的なアポトーシスに高感受性であること<sup>30, 36, 37</sup>、IL-1 $\beta$  依存的な NF- $\kappa$ B 活性化の減弱の程度が HOIL-1L KO マウスに比して軽度であるなどの違いを見いだした<sup>30</sup>。しかしながら、上記知見のみで SHARPIN の欠損により催炎症性を呈する理由を明確には説明できず、HOIL-1L あるいは SHARPIN が特異的に識別して直鎖状ポリユビキチン化する NEMO 以外の標的タンパク質が存在しており、その直鎖状ポリユビキチン化が炎症の発症と関連する可能性なども踏まえた今後の詳細な解析が必要である。

## 6. IKK 活性化における多様なポリユビキチン鎖の関与と直鎖状ポリユビキチン鎖の役割

ユビキチンのタンパク質分解以外の役割の研究の大きな推進役となったのは、その NF- $\kappa$ B 活性化における役割の研究である。2000 年に canonical な NF- $\kappa$ B 活性化にはユビキチンの 63 番目のリシンを介して形成される K63 鎖が関与することが報告され<sup>10</sup>、その後、非常に精力的に解析が進められてきた。K63 鎖の役割に関しては優れた総説が上程されているので<sup>39, 40</sup>、詳細は省略し現在想定されているメカニズムを簡潔に記載したい。TNF- $\alpha$  刺激の場合には TRAF2 あるいは cIAP (cellular inhibitor of apoptosis protein)、IL-1 $\beta$  刺激の場合には TRAF6 ユビキチンリガーゼによって K63 鎖が生成される (図 3)。TAB2/3 (TGF- $\beta$  activated kinase 1 binding protein 2/3) と NEMO が K63 鎖結合活性を有しているので、TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1)-TAB1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1 binding protein 1)-TAB2/3 複合体と IKK 複合体が刺激された受容体複合体にリクルートされる。TAK1 キナーゼが IKK 複合体の IKK $\beta$  をリン酸化することで IKK が活性化され、NF- $\kappa$ B が活性化される<sup>41</sup>。しかしながら、K63 鎖を選択的に生成する E2 である Ubc13 の KO マウスでは TNF- $\alpha$  依存的な NF- $\kappa$ B 活性化が減弱しなかったことなどから、NF- $\kappa$ B 活性化には K63 鎖が必須でない可能性も指摘されつつある<sup>42</sup>。しかし、細胞遺伝学的手法を用いて K63 鎖は IL-1 $\beta$  依存的な NF- $\kappa$ B の活性化には必須であるが、TNF- $\alpha$  依存的な活性化には関与しないことも報告されている<sup>43, 44</sup>。また近年、cIAP によって形成される K11 鎖も TNF- $\alpha$  依存的な NF- $\kappa$ B 活性化に関与する可能性が指摘されつつある<sup>45</sup>。

K63, K11, 直鎖状ポリユビキチン鎖の 3 種のユビキチン鎖ともに種々の刺激から IKK 活性化に至る活性化経路に関与することが指摘されているので、それぞれのポリユビキチン鎖の役割分担について考えてみたい。個体レベルでの遺伝学的解析で NF- $\kappa$ B 活性化への関与が最も明確に示唆されているのは直鎖状ポリユビキチン鎖である。HOIL-1L KO, SHARPIN を欠損した cpdm マウス由来

MEFでは他の二つのサブユニットから構成されるLUBACが少ないながらも残存していることもあり、NF- $\kappa$ B活性化は減弱しているが完全には消失していない<sup>19,30,36,37</sup>。cpdm由来MEF細胞でHOIL-1Lをノックダウンしたところ、HOIL-1LのみならずHOIPの発現もほぼ完全に抑制されたのに伴い、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 依存的なNF- $\kappa$ B活性化もほぼ完全に抑制された<sup>30</sup>。それゆえ、LUBACによる直鎖状ポリユビキチン鎖形成はcanonicalなIKK活性化の中核を担っている可能性が考えられる。

IKK複合体の活性調節サブユニットであるNEMOはユビキチン結合能を有しており、ユビキチン結合ドメインを変異したNEMOはNF- $\kappa$ Bを活性化できないことからNEMOのユビキチン結合能はNF- $\kappa$ B活性化に必須である<sup>46,47</sup>。NEMOはK63鎖と親和性を有すると考えられてきたが、ユビキチンが二つ連結したジユビキチンで解析したところ、NEMOはK63鎖に比して、直鎖に100倍以上強い親和性を示すことが示された<sup>48,49</sup>。それゆえ、NEMOが直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に認識することによってIKK複合体が活性化される可能性が高い。

cIAPはカスパーゼを阻害することで抗アポトーシス作用を発揮するユビキチンリガーゼであると考えられてきたが<sup>50,51</sup>、TNF- $\alpha$ 依存的なcanonicalなNF- $\kappa$ B活性化にも関与することが報告された<sup>52,53</sup>。LUBACはTNF- $\alpha$ 刺激によってTNF受容体1(TNFR1)にリクルートされるが、cIAP欠損MEFまたはcIAP阻害剤で処理した細胞ではTNF- $\alpha$ 刺激によってNF- $\kappa$ Bは活性化されない<sup>52,53</sup>。cIAPはTNF- $\alpha$ 刺激によってK63鎖、K11鎖をRIP1に付加すること<sup>40,45</sup>、cIAPのユビキチンリガーゼ活性はLUBACのTNFR1へのリクルートに必須であることも示されている<sup>54</sup>。それゆえ、cIAPはcanonical NF- $\kappa$ B活性化経路でLUBACよりも上流に位置していると考えられる。

一方、IL-1 $\beta$ 刺激ではTRAF6によってK63鎖が形成される<sup>55</sup>。K63鎖はIL-1 $\beta$ 依存的なNF- $\kappa$ B活性化には必須であるが、TNF- $\alpha$ 依存的なNF- $\kappa$ B活性化には必須ではない<sup>43</sup>。加えてLUBACはユビキチン鎖結合能を有している<sup>18,54</sup>。これらの知見を総合すれば、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ によるIKKの活性化機構に関して以下の仮説が考えられる。TNF- $\alpha$ 刺激ではまずTRAF2、cIAP (TRAF2とcIAPは複合体を形成している<sup>50</sup>)によってK63鎖とK11鎖、IL-1 $\beta$ 刺激ではTRAF6によってK63鎖が形成される。それらのポリユビキチン鎖によってLUBACが活性化された受容体へリクルートされてNEMOに直鎖状ポリユビキチン鎖を結合させる(図8)。

NEMOの直鎖状ポリユビキチン化によってIKKの活性化、すなわちIKK $\beta$ のリン酸化が惹起されるメカニズムも明確ではない。しかし、筆者らはNEMOのC末端に直鎖状ポリユビキチン鎖を結合させることでNF- $\kappa$ Bを活性化

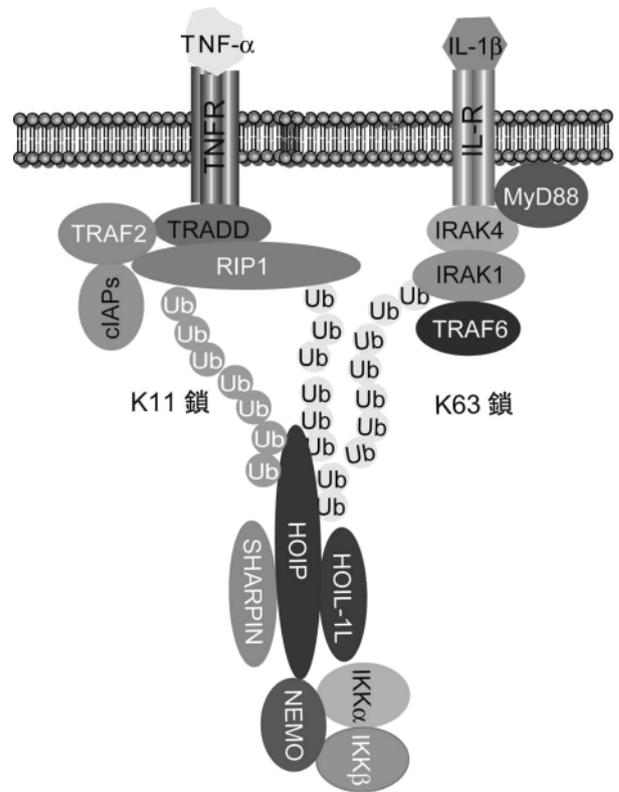


図8 K63, K11, 直鎖状ポリユビキチン鎖のcanonical NF- $\kappa$ B活性化における役割分担の仮説

TNF- $\alpha$ 刺激ではTRAF2、cIAPによってK63鎖とK11鎖が、IL-1 $\beta$ 刺激ではTRAF6によってK63鎖が形成される。それらのポリユビキチン鎖をLUBACが認識することで、活性化された受容体へリクルートされてNEMOに直鎖状ポリユビキチン鎖を結合させる。

できることを見だしている。NEMOの直鎖状ポリユビキチン化がIKK $\beta$ のリン酸化を引き起こす可能性は高い<sup>30</sup>。IKK $\beta$ などのリン酸化酵素は上流のリン酸化酵素によるリン酸化、あるいはEGFRなどのチロシンキナーゼ型受容体に代表されるように二量体化してお互いをリン酸化し合うトランス自己リン酸化(trans-autophosphorylation)によってリン酸化される<sup>57</sup>。NEMOに付加した直鎖状ポリユビキチン鎖が他のIKK複合体中のNEMOに識別されるとすれば、IKK複合体が近接する。その結果としてIKKがtrans-autophosphorylationによって活性化される可能性が想定される(図9A)。また、直鎖状ポリユビキチン鎖と結合することでNEMOの構造が変化することも報告されており<sup>48</sup>、NEMOの直鎖状ポリユビキチン化によってNEMOの構造変化が誘発され、その結果、IKK $\alpha$ とIKK $\beta$ の位置が変化することでIKK $\beta$ がリン酸化される可能性も想定される(図9B)。2011年にIKK $\beta$ に構造が報告され、IKK $\beta$ には二量体化に必要なドメインが存在し、同ドメインの変異によりIKK $\beta$ が活性化されなくなることが報告されているので<sup>58</sup>、図9Aの仮説の方が正しい可能性が高い

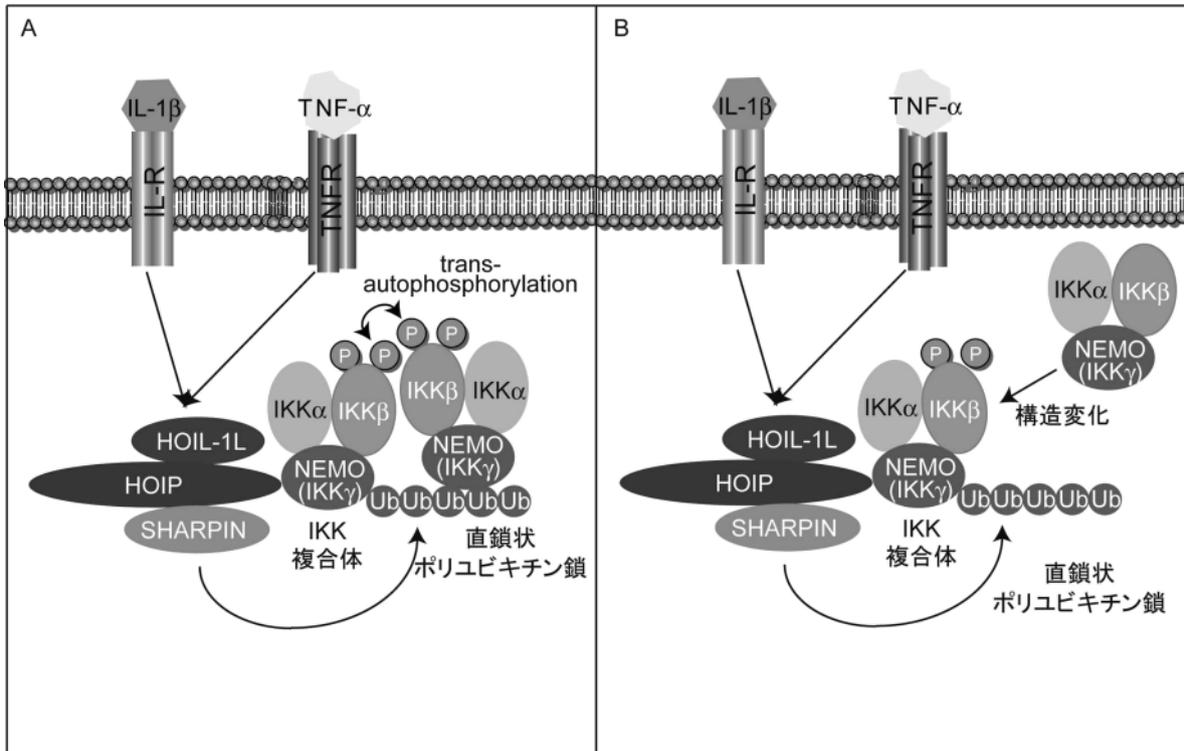


図9 NEMOの直鎖状ポリユビキチン化によるIKKβリン酸化メカニズムの仮説

NEMOに付加した直鎖状ポリユビキチン鎖が他のIKK複合体中のNEMOに識別されるとすれば、IKK複合体が近接する結果、IKKβがtrans-autophosphorylationによって活性化される可能性が想定される(A)。NEMOの直鎖状ポリユビキチン化によってNEMOの構造変化が誘発され、IKKαとIKKβの位置が変化することでIKKβがリン酸化される(B)。IKKβには二量体化に必要なドメインが存在し、同ドメインの変異によりIKKβが活性化されなくなることが報告されているので、(A)の仮説の方が正しい可能性が高いと考えられる。

と考えられる。

また、前述のように直鎖状ポリユビキチン鎖がNF-κB活性化に中核的な働きを有している可能性が考えられるが、直鎖状ポリユビキチン鎖が全てのcanonicalなNF-κB活性化に必須であるかは不明である。ユビキチン鎖長が長くなればK63鎖やK11鎖もNEMOと高い親和性で結合することから<sup>45,59)</sup>、直鎖状ポリユビキチン鎖の代わりに長鎖のK63鎖やK11鎖がNEMOに識別されてIKKが活性化される可能性も想定されるので、今後の研究の進展が待たれる。

## 7. おわりに

直鎖状ポリユビキチン鎖によるNF-κB活性化機構はベールを脱いだばかりであり、多くの未解明な問題がある。その機能に関しては、1) 直鎖状ポリユビキチン鎖はcanonicalなNF-κB活性化に必須なのか、2) NF-κB活性化にのみ関与するのか、3) SHARPIN欠損とHOIL-1L欠損によって、免疫不全や慢性炎症症状の違いが生じるメカニズムは何か、4) ヒト疾患におけるLUBAC、直鎖状ポリユビキチン鎖の関与は何か、5) LUBACによる直鎖状ポ

リユビキチン鎖生成阻害剤は臨床に役立つかなど、応用面も含め解明すべき課題が山積である。とりわけ、NF-κBは炎症を惹起する転写因子であると考えられてきたが、SHARPINを欠損したcpdmマウスはNF-κB活性化が減弱しているにもかかわらず、慢性皮膚炎をはじめとして多様な慢性炎症症状を呈するメカニズムの解析は炎症の発症メカニズムの理解にも大きなエポックを与える可能性があると考えている。一方生化学的な反応の面からも、1) LUBACはなぜ直鎖状ポリユビキチン鎖のみを生成するのか、2) LUBACのサブユニットの一つが欠損するとなぜ不安定になるのかなど解明すべき問題が数多い。

筆者らは「ポリユビキチン鎖の生成機構」という生化学的に謎であった素過程の理解を目指す過程で直鎖状ポリユビキチン鎖を同定した。直鎖状ポリユビキチン鎖は筆者が全く想像していなかったNF-κB活性化に関与し、種々の疾患にも関与する可能性も見いだされてきた。今後研究が進展し、筆者らの素朴な疑問に端を発した研究が、疾患に苦しんでおられる人たちに少しでも福音をもたらすことができるようになれば望外の幸いである。

## 文 献

- 1) Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479.
- 2) Ciechanover, A., Hod, Y., & Hershko, A. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1100-1105.
- 3) Ciechanover, A. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 1178-1190.
- 4) Deshaies, R.J. & Joazeiro, C.A. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 399-434.
- 5) Finley, D. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 477-513.
- 6) Glickman, M.H. & Ciechanover, A. (2002) *Physiol. Rev.*, **82**, 373-428.
- 7) Hicke, L. & Dunn, R. (2003) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 141-172.
- 8) Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., & Varshavsky, A. (1989) *Science*, **243**, 1576-1583.
- 9) Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., & Finley, D. (1995) *Mol. Cell Biol.*, **15**, 1265-1273.
- 10) Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., & Chen, Z.J. (2000) *Cell*, **103**, 351-361.
- 11) Ikeda, F. & Dikic, I. (2008) *EMBO Rep.*, **9**, 536-542.
- 12) Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., & Gygi, S.P. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 921-926.
- 13) Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., & Rape, M. (2008) *Cell*, **133**, 653-665.
- 14) Hochstrasser, M. (2006) *Cell*, **124**, 27-34.
- 15) Ye, Y. & Rape, M. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 755-764.
- 16) Behrends, C. & Harper, J.W. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 520-528.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Baltimore, D. (2009) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a000026.
- 21) Staudt, L.M. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a000109.
- 22) Ben-Neriah, Y. & Karin, M. (2011) *Nat. Immunol.*, **12**, 715-723.
- 23) Iwai, K. (2011) *Cell Cycle*, **10**, 3095-3104.
- 24) Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2008) *Cell*, **132**, 344-362.
- 25) Bonizzi, G. & Karin, M. (2004) *Trends Immunol.*, **25**, 280-288.
- 26) Iwai, K. & Tokunaga, F. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 706-713.
- 27) Israel, A. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a000158.
- 28) Sun, S.C. (2011) *Cell Res.*, **21**, 71-85.
- 29) Iwai, K. (2012) *Trends Cell Biol.*, **22**, 355-364.
- 30) Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., & Iwai, K. (2011) *Nature*, **471**, 633-636.
- 31) 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.
- 32) Hogenesch, H., Gijbels, M.J., Offerman, E., van Hooft, J., van Bekkum, D.W., & Zurcher, C. (1993) *Am. J. Pathol.*, **143**, 972-982.
- 33) Gijbels, M.J., Zurcher, C., Kraal, G., Elliott, G.R., Hogenesch, H., Schijff, G., Savelkoul, H.F. & Bruijnzeel, P.L. (1996) *Am. J. Pathol.*, **148**, 941-950.
- 34) Hogenesch, H., Janke, S., Boggess, D., & Sundberg, J.P. (1999) *J. Immunol.*, **162**, 3890-3896.
- 35) Seymour, R., Sundberg, J.P., & Hogenesch, H. (2006) *Vet. Pathol.*, **43**, 401-423.
- 36) 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., Androurlidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Schaefer, L., Rittinger, K., Macek, B., & Dikic, I. (2011) *Nature*, **471**, 637-641.
- 37) 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., Warmken, U., Purcell, A.W., Silke, J., & Walczak, H. (2011) *Nature*, **471**, 591-596.
- 38) Rickert, R.C., Jellusova, J., & Miletic, A.V. (2011) *Immunol. Rev.*, **244**, 115-133.
- 39) Skaug, B., Jiang, X., & Chen, Z.J. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 769-796.
- 40) Wertz, I.E. & Dixit, V.M. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a003350.
- 41) Chiu, Y.H., Zhao, M., & Chen, Z.J. (2009) *Chem. Rev.*, **109**, 1549-1560.
- 42) Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K.J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 962-970.
- 43) Xu, M., Skaug, B., Zeng, W., & Chen, Z.J. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 302-314.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M., & Ashwell, J. D. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 398-406.
- 47) Winget, J.M. & Mayor, T. (2010) *Mol. Cell*, **38**, 627-635.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., & Reed, J.C. (1998) *EMBO J.*, **17**, 2215-2223.
- 51) McCarthy, J.V. & Dixit, V.M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 24009-24015.
- 52) Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., Flygare, J.A., Fairbrother, W.J., De-

- shayes, K., Dixit, V.M., & Vucic, D. (2007) *Cell*, **131**, 669–681.
- 53) Vince, J.E., Wong, W.W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A.U., Benetatos, C.A., Chunduru, S.K., Condon, S.M., McKinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B.A., Koentgen, F., Vaux, D.L., & Silke, J. (2007) *Cell*, **131**, 682–693.
- 54) 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.
- 55) Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., & Wilkinson, K.D. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 363–397.
- 56) Mace, P.D., Smits, C., Vaux, D.L., Silke, J., & Day, C.L. (2010) *J. Mol. Biol.*, **400**, 8–15.
- 57) Hunter, T., Lindberg, R.A., Middlemas, D.S., Tracy, S., & van der Geer, P. (1992) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **57**, 25–41.
- 58) Xu, G., Lo, Y.C., Li, Q., Napolitano, G., Wu, X., Jiang, X., Dreano, M., Karin, M., & Wu, H. (2011) *Nature*, **472**, 325–330.
- 59) Laplantine, E., Fontan, E., Chiaravalli, J., Lopez, T., Lakisic, G., Veron, M., Agou, F., & Israel, A. (2009) *EMBO J.*, **28**, 2885–2895.
-