

研究題目 新規ユビキチンコードが調節する生体防御応答機構の解明

研究組織

研究代表者：徳永 文稔（大阪市立大学大学院医学研究科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：及川 大輔（大阪市立大学大学院医学研究科）

研究分担者：清水 康平（大阪市立大学大学院医学研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

申請者らは、ユビキチンのN末端を介した直鎖状ユビキチン鎖を特異的に生成するユビキチンリガーゼ(E3)である LUBAC を世界に先駆けて発見し、LUBAC が炎症応答や自然・獲得免疫制御のマスターレギュレーターとして機能する NF- κ B シグナル経路の活性化に極めて重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。さらに最近、申請者らは LUBAC 活性を制御する新規 E3 や、LUBAC による NF- κ B 活性化を抑制する新規脱ユビキチン化酵素(DUB)を独創的に見出した。

そこで本研究では、炎症応答や自然・獲得免疫制御に関わる新規 E3 および DUB の細胞機能と標的タンパク質の探索を目的として、KO 細胞や各種炎症刺激時における会合タンパク質の網羅的プロテオーム解析を小迫教授との共同利用研究として遂行した。

[1-2]研究の方法・経過

(i) *CYLD/OTULIN*-DKO 細胞におけるプロテオーム解析：NF- κ B 制御に関わることが既知の DUB である *CYLD* と *OTULIN* に対して CRISPR/Cas9 法により作製した *CYLD/OTULIN* ダブルノックアウト(DKO)細胞由来の細胞抽出液を用いて網羅的プロテオーム解析を行い、*CYLD* あるいは *OTULIN* 依存的に発現レベルが変動するタンパク質の探索を進めた。

(ii) 新規 E3 分解基質の探索：新規 E3 ノックアウト(KO)細胞を各種炎症性サイトカインで刺激し、細胞抽出液を用いた網羅的プロテオーム解析により、新規 E3 依存的に発現レベルが変動するタンパク質因子の探索を進めた。

(iii) 新規 DUB 結合因子の探索：HEK293T 細胞において Flag タグを付加した新規 DUB を過剰発現させ、免疫沈降標品を用いて会合タンパク質を質量分析によって解析した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

(i) *CYLD/OTULIN*-DKO 細胞におけるプロテオーム解析：A549 及び Jurkat 細胞由来の DKO 細胞を用いた解析を複数回実施し、*CYLD*、*OTULIN* 依存的に発現量が変動するタンパク質因子を数百種同定することができた。

(ii) 新規 E3 分解基質の探索：HEK293 細胞由来の KO 細胞を用いた解析を複数回実施し、新規 E3 依存的に発現量が変動するタンパク質因子を数十種同定することができた。

(iii) 新規 DUB 結合因子の探索：免疫沈降プロトコルの最適化などの条件検討を行った後、MS 解析を複数回実施し、100 種以上の候補因子を同定することができた。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今回同定した新規基質、結合因子を基にした pathway 解析などから、これら新規 DUB や新規 E3 の作用機序を推測することが出来た。実際、いくつかの因子についてはイムノブロットなどにより確認済みであり、今後、ユビキチン連結様式やユビキチン結合部位の同定を含めた分子基盤の解明と、マウス個体レベルの生理機能解析、各種疾患との関連を明らかにしていく。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

- 1) Oikawa D, Sato Y, Ohtake F, Komakura K, Hanada K, Sugawara K, Terawaki S, Mizukami Y, Phuong HT, Iio K, Obika S, Fukushi M, Irie T, Tsuruta D, Sakamoto S, Tanaka K, Saeki Y, Fukai S, Tokunaga F. Molecular bases for HOIPINs - mediated inhibition of LUBAC and innate immune responses. *Commun Biol.* 3:163, 2020.
- 2) Oikawa D, Sato Y, Ito H, Tokunaga F. Linear Ubiquitin Code: Its Writer, Erasers, Decoders, Inhibitors, and Implications in Disorders. *Int J Mol Sci.* 21:3381, 2020.
- 3) Takahashi H, Yamanaka S, Kuwada S, Higaki K, Kido K, Sato Y, Fukai S, Tokunaga F, Sawasaki T. A Human DUB Protein Array for Clarification of Linkage Specificity of Polyubiquitin Chain and Application to Evaluation of Its Inhibitors. *Biomedicines.* 8:152, 2020.
- 4) Oikawa D, Hatanaka N, Suzuki T, Tokunaga F. Cellular and Mathematical Analyses of LUBAC Involvement in T Cell Receptor-Mediated NF- κ B Activation Pathway. *Front Immunol.* 11:601926, 2020.
- 5) Nakabayashi O, Takahashi H, Moriwaki K, Komazawa-Sakon S, Ohtake F, Murai S, Tsuchiya Y, Koyahara Y, Saeki Y, Yoshida Y, Yamazaki S, Tokunaga F, Sawasaki T, Nakano H. MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitylation of cFLIPL. *Commun Biol.* 4:80, 2021.
- 6) Kuriyama Y, Shimizu A, Kanai S, Oikawa D, Tokunaga F, Tsukagoshi H, Ishikawa O. The synchronized gene expression of retrotransposons and type I interferon in dermatomyositis. *J Am Acad Dermatol.* in press.
- 7) Dat NQ, Thuy LTT, Hieu VN, Hai H, Hoang DV, Thi Thanh Hai N, Thuy TTV, Komiya T, Rombouts K, Dong MP, Hanh NV, Hoang TH, Sato-Matsubara M, Daikoku A, Kadono C, Oikawa D, Yoshizato K, Tokunaga F, Pinzani M, Kawada N. 6His-tagged Recombinant Human Cytoglobin Deactivates Hepatic Stellate Cells and Inhibits Liver Fibrosis by Scavenging Reactive Oxygen Species. *Hepatology.* in press.
- 8) Iwasaki N, Terawaki S, Shimizu K, Oikawa D, Sakamoto H, Sunami, K, Tokunaga F. Th2 cells and macrophages cooperatively induce allergic inflammation through histamine signaling. *PLoS One* in press.
- 9) Miyashita H, Oikawa D, Terawaki S, Kabata D, Shintani A, Tokunaga F. Crosstalk between NDP52

and LUBAC in innate immune responses, cell death, and xenophagy. *Front Immunol.* in press.

[3-2]学会発表

- 1) 宮下裕久、及川大輔、寺脇正剛、徳永文稔 「NDP52 のユビキチン結合性を介した炎症応答・細胞死制御と LUBAC 阻害剤の影響」第 93 回日本生化学会大会 on-line, 9/14, 2020.
- 2) 清水康平、犬塚博之 「アセチル化を介した MCL1 安定化機構と発がん」第 93 回日本生化学会大会 on-line, 9/14, 2020.
- 3) 徳永文稔、及川大輔、畑中尚也、鈴木貴 「非定型型直鎖状ユビキチン鎖を足場とする NF- κ B 活性化の細胞機能と数理モデル」第 93 回日本生化学会大会 on-line, 9/14, 2020.
- 4) 高橋宏隆、山中聡士、桑田翔平、檜垣佳奈、佐藤裕介、深井周也、徳永文稔、澤崎達也 「ヒト DUB アレイ技術を用いた USP 特異的阻害剤の開発」第 93 回日本生化学会大会 on-line, 9/15, 2020.
- 5) 及川大輔、徳永文稔 「HOIPINs による LUBAC 活性抑制と自然免疫応答制御の分子基盤」第 93 回日本生化学会大会 on-line, 9/15, 2020.
- 6) 中林修、高橋宏隆、村井晋、大竹史明、駒澤幸子、土屋勇一、佐伯泰、吉田雪子、山崎創、徳永文稔、森脇健太、澤崎達也、中野裕康 「cFLIP のユビキチン化による新たなアポトーシス抑制機構の解析」第 93 回日本生化学会大会 on-line, 9/16, 2020.
- 7) Tokunaga F, Oikawa D, Hatanaka N, Suzuki T “Mathematical Model of Linear Ubiquitination-mediated NF- κ B Activation Pathway” JSPS Core-to-Core Program “Establishing International Research Network of Mathematical Oncology” on-line, 10/28, 2020.
- 8) 徳永文稔、伊東秀文、及川大輔 「非定型型直鎖状ユビキチン鎖を足場とした炎症シグナル発信とプロテノパチー」第 43 回日本分子生物学会年会 on-line 12/4, 2020.

[3-3]成果資料等
該当なし

【4】今後の課題等

本研究によって炎症・自然免疫制御の分子ネットワーク解明を進めていくとともに、詳細な翻訳後修飾（ユビキチン化残基とユビキチン連結型）部位の同定を目指す必要がある。