

研究題目 炎症・免疫応答を制御する直鎖状ユビキチン鎖の

新たな動作原理の解明

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）

：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

本研究では、炎症応答や細胞死制御に関わる新規ユビキチンリガーゼ(E3)や脱ユビキチン化酵素(DUB)の網羅的・定量的な基質探索や相互作用因子の探索を目指した。

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複合体型 E3 酵素である 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し、NF- κ B シグナル経路の活性化や細胞死制御に極めて重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。加えて、LUBAC による NF- κ B 活性化に拮抗的に作用する新規 E3 や OTUD1 という DUB を独自に見出すと共に、自然免疫応答を制御する新規スカフォールドタンパク質として LRBA という BEACH ファミリータンパク質を同定した。

本年度、これらの基質の同定、相互作用因子の探索のため、免疫沈降法や各種 KO 細胞を用いた解析を進めた。

[1-2]研究の方法・経過

(i) 新規 E3/ OTUD1 基質の探索：新規 E3 及び OTUD1 ノックアウト(KO)細胞をサイトカイン刺激により細胞死を誘導させ、ユビキチンレムナントモチーフ(K- ϵ -GG)抗体による免疫沈降サンプルを用いた網羅的プロテオーム解析を行った。

(ii) OTUD1 結合因子の探索：前年度に引き続き、HEK293T 細胞において Flag タグを付加した OTUD1 を過剰発現させ、免疫沈降標品を用いた MS 解析を行った。

(iii) LRBA 結合因子の探索：HEK293T 細胞にお

いて、近接依存性ビオチン標識酵素 AirID (Ancestor BirA biotin identification)を付加した LRBA をビオチン存在下で過剰発現させ、Tamavidin 2-REV でビオチン化ペプチドを精製し MS 解析を行った。

【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) 新規 E3/ OTUD1 基質の探索：MS 解析の結果、16,885 種類の ggK ペプチドが同定され、新規 E3、及び OTUD1 依存的な変動を示すものを、それぞれ 186、487 種類同定した。

(ii) OTUD1 結合因子の探索：MS 解析の結果、208 種の候補因子を同定し、上位の因子についてデータベース解析を進めた。

(iii) LRBA 結合因子の探索：MS 解析の結果、3363 種類のビオチン化ペプチド、1655 種類の候補タンパク質が同定された。

[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各種データベース解析から、新規 E3 及び OTUD1 の作用機序を推測することが出来た。予想しなかった細胞死経路との新たな関連性も見出しており、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動作基盤の解明と、動物個体レベルの生理機能、各種疾患との関連性を明らかにしていきたい。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) 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*. 73:2527-2545, 2021.

2) Iwasaki N, Terawaki S, Shimizu K, Oikawa D, Sakamoto H, Sunami K, Tokunaga F. *PLoS One*. 16:e0248158, 2021.

3) Th2 cell-derived histamine is involved in nasal Th2 infiltration in mice. Iwasaki N, Terawaki S, Shimizu K, Oikawa D, Sakamoto H, Sunami K, Tokunaga F. *Inflamm Res*. 70:539-541, 2021.

4) Crosstalk Between NDP52 and LUBAC in Innate Immune Responses, Cell Death, and Xenophagy. Miyashita H, Oikawa D, Terawaki S, Kabata D, Shintani A, Tokunaga F. *Front Immunol*. 12:635475, 2021.

5) Inhibition of CK1 ϵ potentiates the therapeutic efficacy of CDK4/6 inhibitor in breast cancer. Dang F, Nie L, Zhou J, Shimizu K, Chu C, Wu Z, Fassl A, Ke S, Wang Y, Zhang J, Zhang T, Tu Z, Inuzuka H, Sicinski P, Bass AJ, Wei W. *Nat Commun*. 12:5386, 2021.

6) Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. *Cell Rep*. 37:109988, 2021.

7) Coordination of retrotransposons and type I interferon with distinct interferon pathways in dermatomyositis, systemic lupus erythematosus and autoimmune blistering disease. Kuriyama Y, Shimizu A, Kanai S, Oikawa D, Motegi SI, Tokunaga F, Ishikawa O. *Sci Rep*. 11:23146, 2021.

[3-2]学会発表

1) 及川大輔「直鎖状ユビキチン修飾を介した炎症・免疫応答制御機構の研究」第 67 回日本生化学会近畿支部例会 on-line 2021/5/29.

2) 栗山裕子、清水晶、金井早紀、及川大輔、徳永文稔、石川治、茂木精一郎「全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、自己免疫水疱症における協調したレトロトランスポゾンと I 型 IFN 経路の特徴」第 68 回北関東医学会総会 群馬大学医学部刀城会館 2021/9/30.

3) Tran Thi Thuy Linh、清水 康平、及川 大輔、高橋 宏隆、澤崎 達也、徳永 文稔 “A novel LUBAC-associated protein plays important roles in inflammatory response through regulation of

programmed cell death.” 第 94 回日本生化学会大会 on-line 2021/11/4.

4) Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Shiota M, Takahashi H, Sawasaki T, Tokunaga F. “Identification of OTUD1 deubiquitinase as a regulator for innate immune responses, cell death, and inflammatory bowel disease” 第 94 回日本生化学会大会 on-line 2021/11/4.

5) Qiang Zhang, Seigo Terawaki, Fuminori Tokunaga. “HOIPIN-8, a chemical inhibitor for linear ubiquitination, suppresses ALS-related TDP-43 aggregation and inflammatory responses in neuronal cells” 第 15 回日本臨床ストレス応答学会 大阪大学医学部銀杏会館 2021/11/19.

6) 寺脇正剛、張強、及川大輔、林邦忠、布村一人、駒川晋輔、臼杵克之助、徳永文稔「LUBAC ユビキチンリガーゼと直鎖状ユビキチン鎖が筋萎縮性側索硬化症関連 タンパク質 TDP-43 の細胞質内凝集形成を促進する」第 44 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2021/12/2.

7) 岩崎誠、長尾和哉、及川大輔、小迫英尊、徳永文稔、高橋宏隆、澤崎達也「直鎖状ポリユビキチン鎖デコーダー ZnUBP の NF- κ B シグナル制御機構の解明」第 44 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2021/12/2

8) 清水康平、Tran Thi Thuy Linh、及川大輔、小迫英尊、高橋宏隆、澤崎達也、徳永文稔 “A novel LUBAC-associated protein regulates NF- κ B activation, apoptosis and necroptosis pathways” 第 44 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2021/12/3

9) Tokunaga F, Terawaki S, Oikawa D, Shimizu K. “Cellular functions regulated by complex-type ubiquitination including linear polyubiquitin chain” 第 44 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2021/12/3.

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今回の解析から、新規 E3 や OTUD1、LRBA による炎症・自然免疫応答制御の分子機序の一端を明らかにする事ができた。特にデータベース解析からは、関連する様々な疾患を同定することができ、今後も、本共同研究を含めた各種解析を広く展開することで、その動作基盤と生理機能、各種炎症性疾患との関連性を解明していきたい。