

研究題目 炎症応答を制御する新規複合型ユビキチン修飾機構の解明

研究組織

研究代表者：徳永文稔（大阪公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（大阪公立大学大学院医学研究科）

：清水康平（大阪公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、炎症応答を制御する複合型ユビキチン修飾を担う新規ユビキチンリガーゼ(E3)の基質をプロテオーム解析により網羅的・定量的に探索するとともに、ユビキチン連結様式やユビキチン結合部位の同定を目指した。

申請者は、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。さらに、LUBACに結合する新規E3としてLUBAC-associated protein 1 (LAP1)を同定していた。本年度、LAP1による細胞死制御因子のユビキチン化を精査するため、*Lap1*-KO細胞由来サンプルを用いてMS解析を実施した。

[1-2]研究の方法・経過

Lap1 野生型 MEF 及び *Lap1*-KO MEF に TNF/5z7/ZVAD 処理にて細胞死（ネクロプトーシス）を誘導し、細胞抽出液を用いて変性条件下にて RIPK1 抗体による免疫沈降を行い、MS解析を実施した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

MS解析の結果、12種類のユビキチン化ペプチドを同定し、その内3種がRIPK1由来だった。これら3部位のUb化は刺激依存性が強く、*Lap1*-KO細胞では顕著に減少しており、K48-、及びK63-Ub鎖が同定された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これらの結果は、*Lap1*がLUBACを足場として、K48-及びK63-Ub鎖を含む新規複合型ユビキチン修飾を介してネクロプトーシス経路を制御する可能性を示唆する。当該細胞死経路は、様々な炎症性疾患と密接に関連することも知られており、今後、これらとの関連性を含め広く研究を展開して行きたい。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

- Hieu VN, Thuy LTT, Hai H, Dat NQ, Hoang DV, Hanh NV, Phuong DM, Hoang TH, Sawai H, Shiro Y, Sato-Matsubara M, Oikawa D, Tokunaga F, Yoshizato K, Kawada N. Capacity of extracellular globins to reduce liver fibrosis via scavenging reactive oxygen species and promoting MMP-1 secretion. *Redox Biol.* 52:102286, 2022.
- Tokunaga F, Ikeda F. Linear ubiquitination in immune and neurodegenerative diseases, and beyond. *Biochem. Soc. Trans.* 50:799-811, 2022.
- Hoang DV, Thuy LTT, Hai H, Hieu VN, Kimura K, Oikawa D, Ikura Y, Dat NQ, Hoang TH, Sato-Matsubara M, Dong MP, Hanh NV, Uchida-Kobayashi S, Tokunaga F, Kubo S, Ohtani N, Yoshizato K, Kawada N. Cytoglobin attenuates pancreatic cancer growth via scavenging reactive oxygen species. *Oncogenesis* 11:23, 2022.
- Hara Y, Ando F, Oikawa D, Ichimura K, Yanagawa H, Sakamaki Y, Nanamatsu A, Fujiki T, Mori S, Suzuki S, Yui N, Mandai S, Susa K, Mori T, Sahara E, Rai T, Takahashi M, Sasaki S, Kagechika, H, Tokunaga F, Uchida S. LRBA is essential for urinary concentration and body water homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 119: e2202125119, 2022.
- Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, Wanibuchi H, Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF- κ B- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. *Cell Death Dis.* 13:694, 2022.

6. Yoshizato K, Taira T, Sato-Matsubara M, Sekiguchi S, Yabunaka Y, Kira Y, Ohashi T, Daikoku A, Ofusa K, Kadono C, Oikawa D, Matsubara T, Nakagama Y, Kido Y, Tokunaga F, Ikeda K, Kaneko A, Kawada N. Cloaking the ACE2 receptor with salivary cationic proteins inhibits SARS-CoV-2 entry. *J. Biochem.* 172:205-216, 2022.
7. Nakazawa S, Mamiya R, Kawabata-Iwakawa R, Oikawa D, Kaira K, Tokunaga F, Nobusawa S, Sato Y, Sasaki A, Yajima T, Shirabe K. Identification and molecular analysis of RNF31 Q622H germline polymorphism. *Oncol. Lett.* 24:394, 2022.
8. Zhang Q, Terawaki S, Oikawa D, Okina Y, Usuki Y, Ito H, Tokunaga F. Suppression of linear ubiquitination ameliorates cytoplasmic aggregation of truncated TDP-43. *Cells* 11:2398, 2022.
9. Saito R, Tada Y, Oikawa D, Sato Y, Seto M, Satoh A, Kume K, Ueki N, Nakashima M, Hayashi S, Toyoshima Y, Tokunaga F, Kawakami H, Kakita A. Spinocerebellar ataxia type 17-digenic TBP/STUB1 disease: neuropathologic features of an autopsied patient. *Acta Neuropathol. Commun.* 10:177, 2022.
10. Sato Y, Terawaki S, Oikawa D, Shimizu K, Okina Y, Ito H, Tokunaga F. Involvement of heterologous ubiquitination including linear ubiquitination in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Mol. Biosci.* 10:1089213, 2023.
11. Oikawa D, Shimizu K, Tokunaga F. Pleiotropic roles of a KEAP1-associated deubiquitinase, OTUD1. *Antioxidants* 12:350, 2023.

[3-2]学会発表

1. 原悠、安藤史顕、及川大輔、市村浩一郎、藤木珠美、萬代新太郎、森崇寧、須佐紘一郎、蘇原映誠、頼建光、徳永文稔、内田信一「LRBAは尿濃縮と体液恒常性維持に必須の分子である」第65回日本腎臓学会学術総会(優秀演題賞)神戸コンベンションセンター 2022年6月12日
2. 及川大輔、張強、寺脇正剛、翁良、臼杵克之助、徳永文稔「直鎖状ユビキチン鎖生成酵素を標的とした阻害剤開発と疾患治療薬としての基礎検討」第74回日本細胞生物学会大会(シンポジウム)タワーホール船堀 2022年6月28日
3. 及川大輔「直鎖状ユビキチン鎖を標的としたTDP-43凝集体抑制手法の開発」第15回小胞体ストレス応答研究会 京都産業大学 2022年7月31日
4. 及川大輔、魏民、清水康平、小迫英尊、塩田正之、高橋宏隆、澤崎達也、徳永文稔「脱ユビキチン化酵素 OTUD1による炎症・細胞死制御と病態」第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 愛媛大学南加記念ホール 2022年8月20日
5. 高橋宏隆、檜垣佳奈、山中聡士、佐藤裕介、平野港、好井健太郎、高谷大輔、本間光貴、及川大輔、徳永文稔、澤崎達也「タンパク質アレイ技術を基盤とした脱ユビキチン化酵素の機能解析」第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 愛媛大学南加記念ホール 2022年8月20日

6. Hara Y, Ando F, Oikawa D, Ichimura K, Fujiki T, Mandai S, Mori T, Susa K, Sohara E, Rai T, Tokunaga F, Uchida S. Yanagawa H, Sakamaki Y, Nanamatsu A, Mori S, Suzuki S, Yui N, Takahashi M, Sasaki S, Kagechika, H, “LRBA is essential for urinary concentration and body water homeostasis” ASN kidney week 2022, Orlando, Florida, USA. 2022年11月3日
7. 小林祐斗、森島良貴、辻尚樹、福田亮介、及川大輔、徳永文稔、沖米田司「形質膜におけるCFTR脱ユビキチン化の促進はCF治療剤の効果を増強する」第95回日本生化学会大会 名古屋国際会場 2022年11月9日
8. 坂口詩穂、高橋宏隆、西耕平、小迫英尊、及川大輔、徳永文稔、澤崎達也「ウイルスRNA受容体MDA5を介したIFNシグナルを制御する脱ユビキチン化酵素の同定と機能解析」第95回日本生化学会大会 名古屋国際会場 2022年11月9日
9. 及川大輔、魏民、清水康平、小迫英尊、塩田正之、高橋宏隆、澤崎達也、徳永文稔「OTUD1-KEAP1経路による細胞死制御とその破綻に伴う炎症性腸疾患の悪化」第95回日本生化学会大会(シンポジウム) 名古屋国際会場 2022年11月10日
10. 高橋宏隆、坂口詩穂、西野耕平、小迫英尊、及川大輔、徳永文稔、澤崎達也「細胞内ウイルス受容体MDA5を制御するDUBの探索と機能解析」第95回日本生化学会大会(シンポジウム) 名古屋国際会場 2022年11月10日
11. Zhang Q, Terawaki S, Oikawa D, Okina Y, Usuki Y, Tokunaga F. “The inhibition of LUBAC mitigates amyotrophic lateral sclerosis-associated TDP-43 aggregation” 第95回日本生化学会大会 名古屋国際会場 2022年11月10日
12. 清水康平、魏民、Tran Thi Thuy Linh、及川大輔、小迫英尊、高橋宏隆、澤崎達也、徳永文稔「新規LUBAC結合タンパク質による細胞死制御機構の解析」第45回日本分子生物学会年会 幕張メッセ 2022年11月30日
13. 徳永文稔「直鎖状ユビキチン鎖生成を介した炎症・細胞死制御と疾患及び創薬への挑戦」PRiME・PROS 第10回学術シンポジウム 愛媛大学南加記念ホール 令和5年3月10日(特別講演)

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今回の解析から、LAP1がLUBAC及び直鎖状ユビキチン鎖を足場として、K48-及びK63-Ub鎖を含む新規複合型ユビキチン修飾を介して細胞死経路を制御する可能性を見出すことができた。並行して進めているデータベース解析からは、炎症性腸疾患(IBD)を含む複数の疾患との関連性を見出し、今後も、本共同研究を含めた各種解析を広く展開し、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。