

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

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(M1-Ub 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 NF- κ B シグナルの活性化を介して炎症・免疫応答に極めて重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。また近年、LUBAC に結合する新規 E3 として LUBAC-associated protein 1 (LAP1)を同定し、ネクロプトーシス制御の新たな機構として LUBAC と LAP1 による RIPK1 の協調的な Ub 修飾を見出してきた。そこで本年度は、ネクロプトーシス過程における LUBAC・LAP1 による RIPK1 の Ub 化の意義を精査するため、*Lap1*-KO 細胞由来サンプル及び LUBAC 阻害剤(HOIPIN-8)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 (TAK1 阻害剤) /ZVAD (カスパーゼ阻害剤) ±HOIPIN8 処理にて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

PRM 法による精密定量の結果、野生型 MEF においてネクロプトーシス初期に刺激依存性の特に高い Ub 化部位を 2 箇所同定した。これらの Ub 化頻度は HOIPIN8 処理によって部分的に低下することが分かり、LUBAC によるプライミング Ub 化が RIPK1 の Ub 化過程に含まれることが示唆された。現在当該 Ub 化のネクロ

プトーシス制御における生理的意義について RIPK1 点変異体を用いた解析を進めている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

炎症誘導性細胞死であるネクロプトーシスは様々な炎症性疾患の発症や病態形成に関与することから、RIPK1 阻害剤をはじめ、臨床応用に向けた研究が世界中で精力的に進められている。

本成果により、LUBAC と LAP1 による複合型 Ub 修飾を介した新たなネクロプトーシス制御機構が明らかになりつつあり、炎症性腸疾患を含む複数の疾患との関連性を見出している。本成果は、未だに制御が困難な炎症性疾患治療における重要な創薬標的の提示に繋がることが期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. Hoshino K, Nakazawa S, Yokobori T, Hagiwara K, Ishii N, Tsukagoshi M, Igarashi T, Araki K, Harimoto N, Tokunaga F, Shirabe K. RNF31 promotes proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma via nuclear factor kappaB activation. *Sci Rep*. 14: 346, 2024.
2. Yanagawa H, Hara Y, Ando F, Suzuki S, Fujiki T, Oikawa D, Yui N, Mandai S, Mori Y, Susa K, Mori T, Sohara E, Tokunaga F, Uchida S. LRBA signalosomes activate vasopressin-induced AQP2 trafficking at recycling endosomes. *J Physiol*. 601:5437-5451, 2023.
3. Fukushi M, Ohsawa R, Okinaka Y, Oikawa D, Kiyono T, Moriwaki M, Irie T, Oda K, Kamei Y, Tokunaga F, Sotomaru Y, Maruyama H, Kawakami H, Sakaguchi T. *PLoS One*. 18:e0287545, 2023.

[3-2]学会発表

1. 清水 康平、魏 民、及川 大輔、Tran Thi Thuy

Linh、小迫 英尊、高橋 宏隆、澤崎 達也、徳永 文稔「新規 LUBAC 結合 E3 による TNF 誘導性細胞死の多面的制御」第 46 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド 2023/12/8

2. 及川 大輔、翁 良徳、魏 民、塩田 正之、福士 雅也、入江 崇、堀居 拓郎、畑田 出穂、坂口 剛正、河田則文、徳永 文稔「BEACH ドメイン含有タンパク質 (BDGP) の新機能: RNA ウイルス誘導性細胞死の制御と非アルコール性脂肪性肝疾患への寄与」第 46 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド 2023/12/7

3. 畑中 由香里、及川 大輔、翁 良徳、臼杵 克之助、徳永 文稔「直鎖状ユビキチン鎖生成酵素 (LUBAC) 阻害剤の ALS モデルマウスへの影響」第 17 回日本臨床ストレス応答学会大会 徳島大学 2023/11/17

4. 及川 大輔、翁 良徳、魏 民、塩田 正之、福士 雅也、入江 崇、堀居 拓郎、畑田 出穂、坂口 剛正、河田 則文、徳永 文稔「LRBA による RIG-I 様受容体シグナル制御と非アルコール性脂肪性肝疾患への寄与」第 17 回日本臨床ストレス応答学会大会 徳島大学 2023/11/17

5. Tran Thi Thuy Linh、Oikawa D、Shimizu K、Okina Y、Tokunaga F「OTUD1 plays an important role in inflammatory response through regulation of programmed cell death」第 17 回日本臨床ストレス応答学会大会 徳島大学 2023/11/17

6. 徳永 文稔、及川 大輔、清水 康平、畑中 由香里「LUBAC 阻害剤および LUBAC 協働性 E3 による細胞機能制御」第 96 回日本生化学会大会 シンポジウム 福岡国際会議場 2023/11/1

7. 坂口 詩穂、高橋 宏隆、及川 大輔、徳永 文稔、西野 耕平、小迫 英尊、澤崎 達也「ウイルス RNA 受容体 MDA5 を介した IFN 産生シグナルを制御する脱ユビキチン化酵素の機能解析」第 96 回日本生化学会大会 福岡国際会議場 2023/10/31

8. Shiota M、Min G、Oikawa D、Tokunaga F. “Heat shock protein 70-dependent regulation of cell adhesion and migration” 第 82 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 2023/9/22

9. Kouhei Shimizu、Min Gi、Daisuke Oikawa、Tran Thi Thuy Linh、Hidetaka Kosako、Hirohisa Takahashi、Tatsuya Sawasaki、Fuminori Tokunaga. LUBAC and its associated ubiquitin ligase generate heterotypic ubiquitin chains to inhibit necroptosis. The 3rd Japan and Australia Meeting on Cell Death 2023/8/17

10. 清水 康平、魏 民、及川 大輔、Tran Thi Thuy Linh、小迫 英尊、高橋 宏隆、澤崎 達也、徳永 文稔「新規 LUBAC 結合 E3 による複合型ユビ

キチン鎖形成を介したネクロプトーシスの制御」第 31 回日本 Cell Death 学会学術集会 順天堂大学 7 号館小川秀興講堂 2023/7/16

11. 及川 大輔、魏 民、塩田 正之、福士 雅也、入江 崇、堀居 拓郎、畑田 出穂、坂口 剛正、徳永 文稔「LRBA は RNA ウイルス誘導性細胞死 (RIPA) を制御する」第 31 回日本 Cell Death 学会学術集会 順天堂大学 7 号館小川秀興講堂 2023/7/15

12. 柳川 英輝、安藤 史顕、及川 大輔、七松 東、原 悠、鈴木 聡一郎、藤木 珠美、萬代 新太郎、森 雄太郎、森 崇寧、須佐 紘一郎、蘇原 映誠、徳永 文稔、内田 信一「LRBA は尿細管における塩および水の再吸収を制御する」第 66 回日本腎臓学会学術総会 パシフィコ横浜 2023/6/9

13. Saito R、Tada Y、Oikawa D、Sato Y、Iwanaga K、Satoh A、Seto M、Kume K、Ueki N、Nakashima M、Hayashi S、Toyoshima Y、Tokunaga F、Kawakami H、Kakita A. “Gordon Holmes syndrome and SCA17-DI: pathologic features of 2 patients with Huntington-like disorder” 第 64 回日本神経学会学術大会 幕張メッセ 2023/6/1

14. 清水 康平、魏 民、及川 大輔、Tran Thi Thuy Linh、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ネクロプトーシス制御機構」第 69 回生化学会近畿支部例会 京都大学百周年時計台記念館 2023/5/27

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

これまでの本共同利用の支援をもとに、LAP1-LUBAC 依存的な RIPK1 の Ub 修飾がネクロプトーシスの進行を抑制していることを見出した。ネクロプトーシス過程に修飾される RIPK1 の Ub 化部位は多数存在し、TMT 法により刺激依存的な修飾部位の全容は掴めた。そこで次に、ネクロプトーシスの抑制に特に寄与する RIPK1 の主要な Ub 修飾部位を絶対定量によって明らかにし、当該部位の RIPK1 点変異体がネクロプトーシス制御に与える影響を評価する。さらに、修飾様式のバリエーションについても検討し、ネクロプトーシス抑制に寄与する新規ユビキチンコードを同定することで本制御系の詳細な動作原理を明らかにする。