

研究題目 生体防御を制御するユビキチン修飾機構の新規基質探索

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、炎症応答や自然免疫応答、細胞死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)、及び足場タンパク質の基質や刺激特異的会合タンパク質をプロテオーム解析により網羅的に探索し、各種生体防御機構において担う生理機能の解明を目指した。

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。加えて近年、新たな関連因子として LRBA (LPS-responsive beige-like anchor protein) を同定した。

申請者らは *Lrba*-KO 細胞において RNA ウイルス感染時の直鎖状ユビキチン鎖産生が亢進することを見出した。さらに、*Lrba*-KO マウスを独自に構築し解析を進め、当該マウスが薬物性肝障害(DILI)や MASLD（代謝異常関連脂肪性肝疾患）モデルに耐性を示すことを見出した。

その分子機序を明らかにするため、本年度、LRBA の相互作用因子を探索するため、免疫沈降法や近接ビオチン法を用いた質量分析を進めた。

[1-2]研究の方法・経過

(i) 免疫沈降法による LRBA 結合因子の探索：HEK293T 細胞において Flag タグを付加した LRBA を過剰発現させ、免疫沈降標品を用いた MS 解析を行った。

(ii) 近接ビオチン標識法による 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) 免疫沈降法による LRBA 結合因子の探索：MS 解析の結果、801 種の候補因子を同定し、そのうち、control と比較して LRBA 免疫沈降標品でシグナルが高い因子を 99 種同定した。それらの中には複数のユビキチン修飾因子が含まれていた。

(ii) 近接ビオチン法による 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、1644 種類の候補タンパク質が同定された。そのうち、control と比較して AirID-LRBA 発現サンプルで高いシグナルを示すタンパク質が 754 種検出され、リン酸化シグナル因子や LRBA 自身のビオチン化ペプチドも多数検出された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今回同定した新規結合因子を基にした各種データベース解析から、ウイルス感染時、LRBA は直鎖状ユビキチン鎖を含む複雑型ユビキチン修飾の足場として機能する可能性が示唆された。さらに、リン酸化シグナルに寄与する可能性や、自己会合の可能性も示され、予想しなかったシグナル経路とのクロストークや、生理機能発現の分子機序を見出すことができた。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. Shimizu K, Inuzuka H, Tokunaga F. The

interplay between cell death and senescence in cancer. *Semin Cancer Biol.* 108:1-16, 2025.

2. Tokunaga F. BACH to the ferroptosis. *J Biochem.* 176:423-426, 2024.

3. Honda S, Misawa N, Sato Y, Oikawa D, Tokunaga F. The hypothetical molecular mechanism of the ethnic variations in the manifestation of age-related macular degeneration; focuses on the functions of the most significant susceptibility genes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 262:2799-2811, 2024.

[3-2]学会発表

1. 畑中 由香里、及川 大輔、翁 良徳、徳永 文稔「ALS モデルマウスに対する直鎖状ユビキチン鎖生成酵素(LUBAC)阻害剤(HOIPIN-8)投与の影響」日本生化学会近畿支部例会 国立循環器病研究センター 2024/5/25

2. 清水 康平、魏 民、及川 大輔、Tran Thi Thuy Linh、小迫 英尊、佐藤 裕介、高橋 宏隆、中野 裕康、澤崎 達也、徳永 文稔「LUBAC 結合性生体防御 E3 による RIPK1-RIPK3 を基軸とした TNF 誘導性細胞死の多元制御」日本 CellDeath 学会 第 32 回学術集会 徳島大学 2024/7/21

3. 徳永 文稔「LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B 制御と皮膚疾患」第 39 回日本乾癬学会学術大会 グランフロント大阪 2024/8/24

4. 畑中 由香里、及川 大輔、永井 正義、翁 良徳、徳永 文稔「筋萎縮性側索硬化症モデルマウスへの直鎖状ユビキチン鎖生成 E3 酵素(LUBAC) 阻害剤経鼻投与の影響解明」第 18 回日本臨床ストレス応答学会 宮崎市民プラザ 2024/11/1

5. 及川 大輔、翁 良徳、魏 民、Duc Pham Minh、Le Thi Thanh Thuy、池永 寛子、松原 勤、高橋 宏隆、堀居 拓郎、畑田 出穂、澤崎 達也、小迫 英尊、河田則文、徳永 文稔「*Lrba* 欠損マウスにおける MASLD 病態の抑制と遺伝子変動解析」第 18 回日本臨床ストレス応答学会 宮崎市民プラザ 2024/11/2

6. 及川 大輔、翁 良徳、魏 民、Duc Pham Minh、Le Thi Thanh Thuy、池永 寛子、松原 勤、高橋 宏隆、堀居 拓郎、畑田 出穂、澤崎 達也、小迫 英尊、河田則文、徳永 文稔「LRBA は MAFLD (代謝異常関連脂肪性肝疾患) の新規リスク因子である」第 97 回日本生化学会大会 パシフィコ横浜ノース 2024/11/6

7. 高橋 宏隆、檜垣 佳奈、佐藤 裕介、平野 港、好井 健太朗、鳴海 哲夫、渡邊 千鶴、本間 光

貴、及川 大輔、徳永 文稔、澤崎 達也「コムギ無細胞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阻害剤開発」第 97 回日本生化学会大会 パシフィコ横浜ノース 2024/11/7

8. Ikenaga H、Matsubara T、Enomoto M、Sato-Matsubara M、Le Thi Thanh Thuy、Ninh Quoc Dat、Truong Huu Hoang、Ngo Vinh Hanh、Kadono C、Fujii H、Uchida-Kobayashi S、Tanaka S、Kubo S、Ishizawa T、Oikawa D、Tokunaga F、Tamori A、Sergi Guixé-Muntet、Jordi Gracia-Sancho、Frank J Gonzalez、Ikeda K、Kawada N. “Change in Eicosatrienoic Acid Metabolism due to Enhanced Hepatic EPHX1 Expression is Associated with Liver Fibrosis” AASLD 2024 San Diego, California 2024/11/17

9. 畑中 由香里、及川 大輔、翁 良徳、徳永 文稔「筋萎縮性側索硬化症治療を目指した直鎖状ユビキチン鎖生成酵素阻害剤の影響解明」日本認知症学会 ビッグパレットふくしま 2024/11/22

10. 福士 雅也、及川 大輔、徳永 文稔、外丸 祐介、川上秀史、坂口 剛正「オブチニューリン欠損マウスが病原体抵抗性である理由の解明」第 47 回日本分子生物学会年会 on-line 2024/11/26

11. 清水 康平、塩田 正之、高橋 宏隆、澤崎 達也、徳永 文稔「高腫瘍性タンパク質 Skp2 を標的とするユビキチン-プロテアソーム経路の同定と解析」第 47 回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場 2024/11/27

12. 清水 康平「A new guide for TNF signaling to avoid in flames」第 4 回細胞死コロキウム 京都大学 2025/1/20

13. 畑中 由香里、及川 大輔、徳永 文稔「筋萎縮性側索硬化症治療を目指した直鎖状ユビキチン生成酵素 LUBAC 阻害剤 HOIPIN-8 経鼻投与の薬効解明」第 10 回大阪公立大学アカデミア創薬シンポジウム TKP ガーデンシティ PREMIUM 東京駅日本橋 2025/1/21

[3-3]成果資料等
該当なし

【4】今後の課題等

今後は、同定した候補因子と LRBA との相互作用の細胞基盤や各種疾患との関連性を明らかにし、ウイルス感染時の生体防御機構や肝疾患に対する新たな治療標的・創薬標的としての可能性を模索していきたい。