

114. 直鎖状ポリユビキチン鎖を介した炎症バランスの制御

及川 大輔

Key words : ユビキチン, NF- κ B, TNF α

群馬大学 生体調節研究所
分子細胞制御分野

緒言

NF- κ Bを始めとする炎症シグナルは、発生する組織・部位、さらには、シグナル入力の種類・タイミングに応じて時空間特異的に厳密に制御されており、その破綻が癌やクローン病などの炎症性疾患、関節リウマチなどの自己免疫疾患、さらには糖尿病を含む生活習慣病の発症と密接に関連することが知られている。このような炎症シグナルの制御機構の一つとして、我々の研究室では、直鎖状ポリユビキチン鎖に着目して研究を展開している。直鎖状ポリユビキチン鎖は、ユビキチン分子の1stメチオニンを介して連結される特殊なタイプのユビキチン鎖で、LUBACという酵素複合体によって生成される。LUBACはHOIP, HOIL-1L, SHARPINの三者から構成され、NEMOやRIP1を始めとする様々なシグナル因子に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することで、炎症シグナルを正または負に制御すると考えられている。しかしながら、LUBACを構成する各因子が、どのような細胞・組織においてLUBAC複合体の形成を担い、また、炎症シグナルを制御するのか、具体的な比較解析はほとんど進められていない。そこで本研究では、複数の細胞種においてLUBAC構成因子を破壊し、そのシグナル動態やLUBAC複合体の生化学的な解析を進めることで、組織・細胞間におけるLUBAC構成因子の機能差を解明すべく解析を進めた。

方法および結果

1. LUBAC構成因子の遺伝子破壊によるNF- κ Bシグナルの減弱。

まずは、LUBAC構成因子の一つであるHOIL-1L遺伝子の単独欠損によるNF- κ Bシグナルへの影響を評価するため、HOIL-1L KOマウス由来のMEF細胞を用いてTNF α 刺激への応答性を評価した。その結果、HOIL-1Lを欠損したMEF細胞では、刺激依存的なI κ B α のリン酸化が減弱するとともに、I κ B α 自身の分解も減弱していた(図1A)。それと一致して、TNF α 刺激時のIKKのキナーゼ活性も、HOIL-1L欠損細胞において減弱することが分かった¹⁾(図1B)。

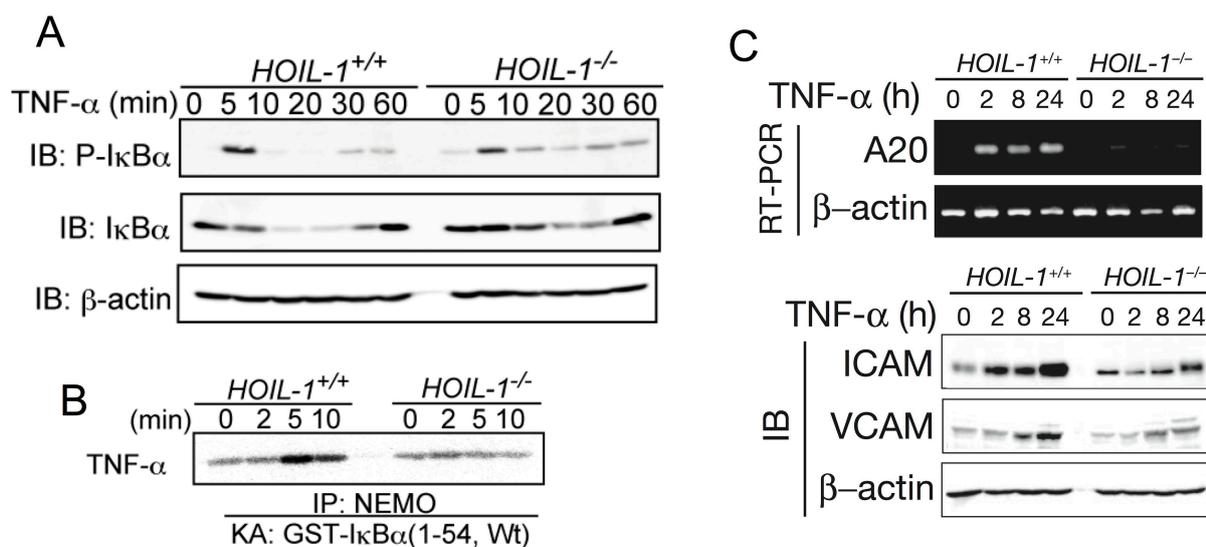


図1. *HOIL-1L* 単独欠損による NF- κ B シグナルの減弱.

A) *HOIL-1L* KO MEF における NF- κ B シグナルの減弱. 各種 MEF 細胞を TNF α (20 ng/ml) で刺激した後, イムノブロット法により解析した. B) *HOIL-1L* KO MEF における IKK キナーゼ活性の減弱. 各種 MEF 細胞を TNF α (20 ng/ml) で刺激した後, NEMO を免疫沈降により取得し, 試験管内で I κ B α とインキュベートし, イムノブロット法により解析した. C) *HOIL-1L* KO MEF における NF- κ B ターゲットの誘導性減弱. (上段) 各種 MEF 細胞を TNF α (20 ng/ml) で刺激した後, 各 mRNA の誘導を RT-PCR 法により解析した. (下段) 各種 MEF 細胞を TNF α (20 ng/ml) で刺激した後, イムノブロット法により解析した.

次に, *SHARPIN* 遺伝子の自然変異マウスである cpdm マウス由来の MEF 細胞を用いて, *SHARPIN* 欠損による影響を評価した. その結果, *SHARPIN* の発現が消失している cpdm マウス由来細胞において, 刺激依存的な I κ B α の分解とリン酸化が減弱するとともに (図 2 A), NEMO のリン酸化活性も減弱していた (図 2 B). さらに, A20 や ICAM などの NF- κ B シグナルの下流因子の誘導も, 減弱することが分かった²⁾ (図 2 C).

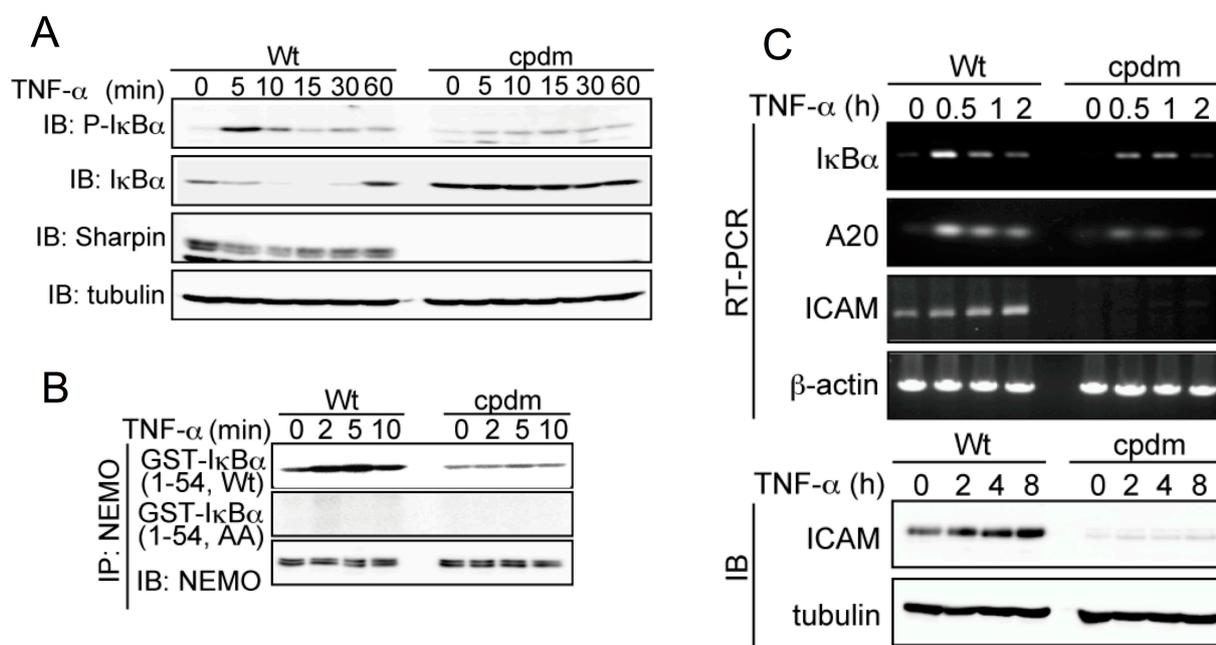


図2. *SHARPIN* 単独欠損による NF- κ B シグナルの減弱.

A) cpdm マウス由来の MEF における NF- κ B シグナルの減弱. 各種 MEF 細胞を TNF α (20 ng/ml) で刺激した後, イムノブロット法により解析した. B) cpdm マウス由来の MEF における IKK キナーゼ活性の減弱. 各種 MEF 細胞を TNF α (20 ng/ml) で刺激した後, NEMO を免疫沈降により取得し, 試験管内で I κ B α とインキュベートし, イムノブロット法により解析した. C) cpdm マウス由来の MEF における NF- κ B ターゲットの誘導性減弱. (上段) 各種 MEF 細胞を TNF α (20 ng/ml) で刺激した後, 各 mRNA の誘導を RT-PCR 法により解析した. (下段) 各種 MEF 細胞を TNF α (20 ng/ml) で刺激した後, イムノブロット法により解析した.

このような NF- κ B シグナルの減弱が, 他の細胞種においても見られるかを確認するため, ヒト B 細胞株である BJAB 細胞や, ヒト T 細胞株である Jurkat 細胞でも評価を進めた. *HOIP* や *SHARPIN* などの LUBAC 構成因子をそれぞれ CRISPR/Cas9 法により破壊し, その刺激応答性を評価したところ, *HOIP* 欠損による NF- κ B シグナルの減弱は見られたものの, *SHARPIN* 欠損による減弱はほとんど見られなかった.

2. *SHARPIN* 欠損による LUBAC 複合体の不安定化

次に, LUBAC 複合体の形成動態を評価するためゲル濾過カラムを用いた生化学解析を進めた. MEF 細胞由来の抽出液をゲル濾過カラムにより分離後, *HOIP*, *HOIL-1L*, *SHARPIN* 特異的な抗体を用いてそれぞれウエスタン解析を行ったところ, それぞれ 669 kDa 付近に三者に由来するシグナルが検出された. また, *HOIL-1L* は複数本のバンドで検出されることから, 何らかのタンパク質修飾を受けている可能性が考えられた (図3左; Wt). 同様の解析を cpdm マウス由来の MEF 細胞を用いて行ったところ, *HOIP* のシグナルが減弱した他, *HOIL-1L* の修飾バンドも消失した (図3中央; Cpdm). これらの現象は, *SHARPIN* の入れ戻しによってキャンセルされることから (図3右; Cpdm/WT-*SHARPIN*), *HOIL-1L* の修飾や LUBAC 複合体が *SHARPIN* の欠損により不安定化すると考えられた²⁾.

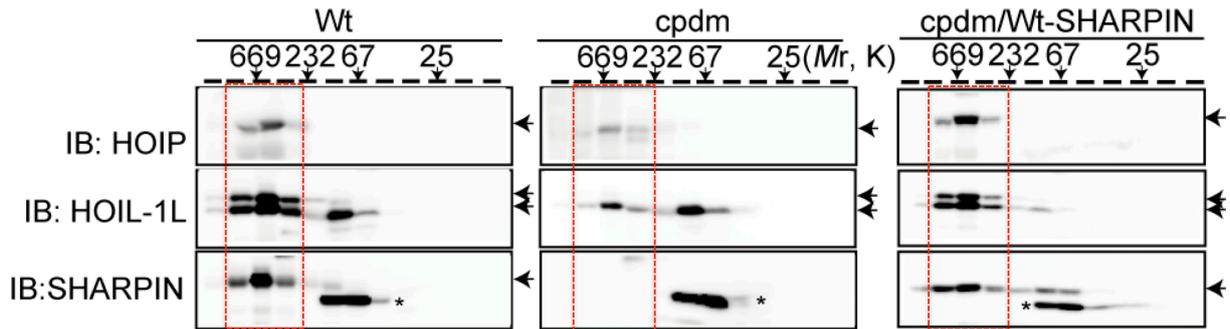


図3. *SHARPIN* 単独欠損による LUBAC 複合体の不安定化.

各種 MEF 細胞由来の抽出液をゲル濾過カラムにより分離後, HOIP, HOIL-1L, Sharpin 特異的な抗体を用いてそれぞれウエスタン解析を行った. 赤枠は, LUBAC 複合体 (600 kDa) を示す.

同様の解析を, *HOIP* や *SHARPIN* をそれぞれ破壊した BJAB 細胞・Jurkat 細胞で行ったところ, *HOIP* KO では LUBAC 複合体の不安定化が見られたものの, *SHARPIN* KO ではそのような現象が見られなかった.

考 察

本研究では, MEF 細胞を対象とした *HOIL-1L* 及び *SHARPIN* 単独欠損の影響, 及び, BJAB 細胞や Jurkat 細胞での *HOIP* 及び *SHARPIN* 単独欠損の影響を評価することができた.

近年, *HOIP* KO マウスの解析例がいくつか報告され, B 細胞特異的に *HOIP* を破壊した場合, B 細胞での NF- κ B シグナルや MAPK シグナルが減弱すること, また, *HOIP* の conventional な破壊によって, TNF α による細胞死が卵黄嚢で高度に誘発され, 個体発生が中断することなども明らかになりつつある. このように HOIP は NF- κ B シグナルに対して広い組織・細胞種で広角に影響する他, HOIL-1L 及び SHARPIN の両者と相互作用する機能ドメインを有することから (図4), LUBAC 形成において中心的な役割を果たすことが想定される.

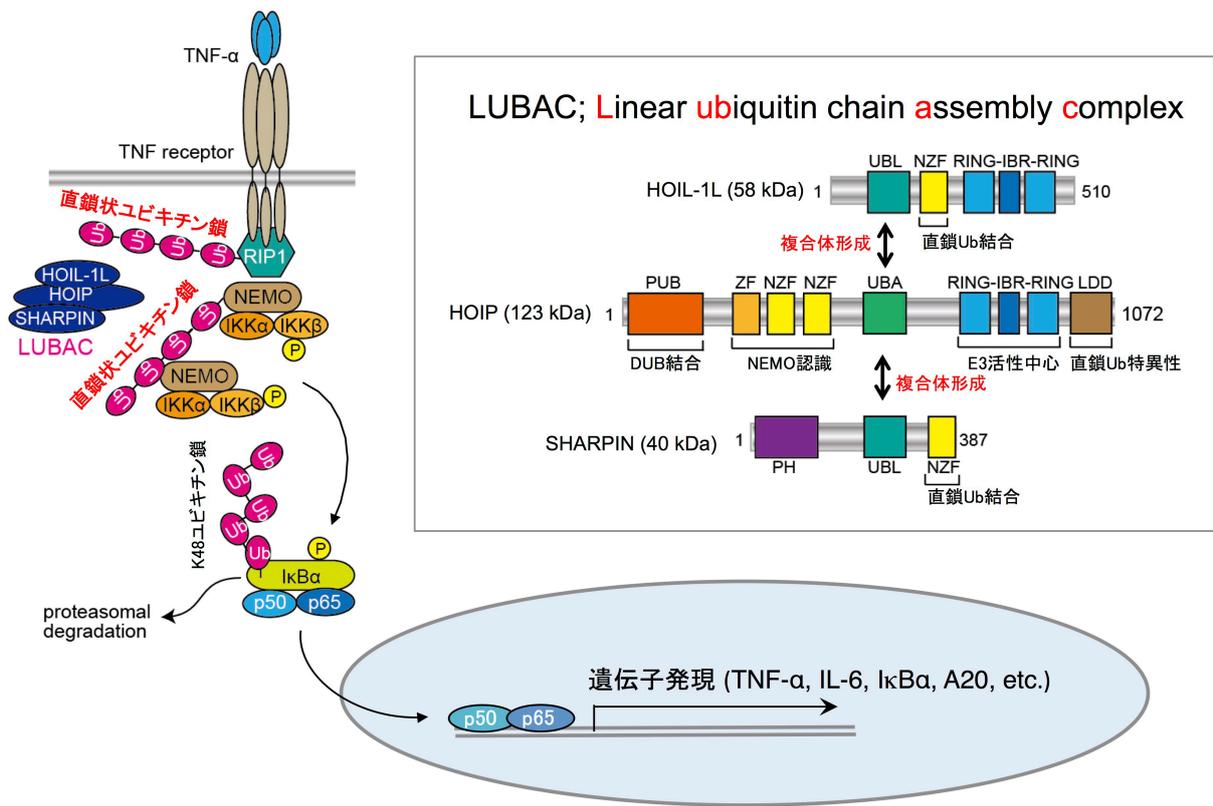


図4. LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖を介した NF-κB シグナルの制御。

一方、*HOIL-1L* KO マウスは、脾臓の肥大やリステリア感染に脆弱になる等、本研究と同様、NF-κB シグナルを含む免疫機能の異常を示唆する知見が得られている。しかしながら、マウス自身は正常に発生し、外見では野生型マウスと大きな変化は無い。よってその影響は、免疫組織を含む一部の組織・細胞、あるいは特定の時期に特化している可能性がある。

SHARPIN 遺伝子の単独欠損の影響については、本研究と同様に NF-κB シグナルの減弱が報告されている他、個体レベルの解析では、特に、ケラチノサイトなどの皮膚組織における重要性、TNF α 誘導性の細胞死から細胞を保護する役割が報告されている。しかしながら、その効果は肝臓などの体細胞組織においては非常に小さいことから、*SHARPIN* の機能は皮膚を含む一部の組織において強く発揮されることが考えられる。

HOIL-1L や *SHARPIN* の単独欠損で見られる、このような限定的な影響を説明する分子機序は明らかになっていないが、一つの可能性として、*HOIL-1L* または *SHARPIN* が他のタンパク質との結合を介して LUBAC の機能を制御している、あるいは、*HOIL-1L* あるいは *SHARPIN* が特異的に識別する因子が (NEMO や RIP1 以外に) 複数存在し、組織・細胞や個体発生の段階でそれらが多様に変化する、ことが考えられる。これらの可能性を踏まえ、今後、LUBAC の新規構成因子の探索や、新規の直鎖状ポリユビキチン鎖ターゲットの探索などの解析を進め、LUBAC を介した時空間特異的な免疫制御機構を明らかにしていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、群馬大学生体調節研究所分子細胞制御分野の徳永文稔、後藤英治である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K. & Iwai, K. : Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat. Cell Biol.*, **11** : 123-132, 2009.
- 2) Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H. & Iwai, K. : SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*, **471** : 633-636, 2011.