

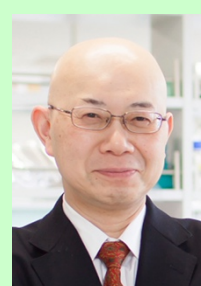
## 直鎖状ユビキチン鎖を生成する LUBAC リガーゼの統括的研究

### Extensive analyses of the LUBAC ubiquitin ligase

課題番号：17H06174

岩井 一宏（IWAI, KAZUHIRO）

京都大学・大学院医学研究科・教授



#### 研究の概要（4行以内）

研究代表者が発見した直鎖状ユビキチン鎖と同鎖を特異的に生成する唯一の酵素である LUBAC ユビキチンリガーゼの疾患研究への展開の基礎を築くことを目指して研究を推進した。そして、LUBAC リガーゼの活性調節機構の基礎的解析から、LUBAC を亢進させることで、免疫不全、自己炎症性疾患が抑制できること、抑制することでリンパ腫の治療に結びつく可能性を見出した。

研究分野：医化学一般

キーワード：ユビキチン、炎症制御、B 細胞リンパ腫、LUBAC リガーゼ、ミオパチー

#### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は従来のユビキチン鎖とは全く異なるタイプである直鎖状ユビキチン鎖と同鎖を特異的に生成する唯一の酵素である LUBAC ユビキチンリガーゼを発見した。LUBAC は HOIL-1L、HOIP、SHARPIN の3サブユニットから構成され（図）、LUBAC が生成する直鎖状ユビキチン鎖は刺激依存的な NF-kappaB 活性化、プログラム細胞死抑制に寄与することを明らかにした。さらに、研究代表者は直鎖状ユビキチン鎖の生成減弱は自己炎症性疾患、亢進は B 細胞リンパ腫に関与することなど、疾患との関連についても明らかにしている。また、LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成はアスペルギルスなどの病原微生物などの感染防御にも関与している。研究代表者は発見、命名者であることを意識し、本研究提案ではその普遍化と疾患研究への展開の基礎を築くことを目指す。

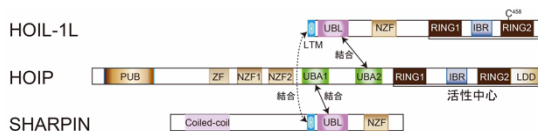


図 LUBAC リガーゼの構造

#### 2. 研究の目的

本研究提案では研究代表者が発見した LUBAC が形成する直鎖状ユビキチン鎖の疾患研究への展開の基礎を築くことを目指して、1. LUBAC ユビキチンリガーゼの活性調節と機能発現機構の解析、2. 直鎖状ユビキチン鎖による新規炎症、免疫調節機構の検索、3. LUBAC

サブユニット欠損マウスを用いた新規バイオロジーの開拓、4. LUBAC 活性化による発ガンイニシエーション機構と LUBAC 阻害剤の開発の4点から研究を推進している。

#### 3. 研究の方法

精製タンパク質を用いた構造解析、試験管内反応、細胞株を用いた細胞生物学実験に加え、研究代表者らがすでに作出しているサブユニットのコンディショナルノックアウト、トランスジェニックマウスを用いた個体レベルでの研究など、多彩な研究手法を用いて研究を推進した。

#### 4. これまでの成果

**A) 安定な LUBAC 複合体形成機構の解析**  
LUBAC は1つのサブユニットが欠損するだけで複合体が不安定化する。そこで、LUBAC が3量体を形成して安定化する機構の解析を進め、HOIL-1L と SHARPIN に存在する LTM が2つのペプチドで1つのドメイン様構造を持つことで非常に安定な複合体を形成することを発見した（図）。さらに2つの LTM によるドメインの形成を阻害するペプチドが、LUBAC を著減させて、B 細胞リンパ腫細胞を死滅させることを示した。論文(4)

#### **B) HOIL-1L のリガーゼ(E3)活性による LUBAC 制御機構**

HOIP が LUBAC の直鎖状ユビキチン鎖生成の活性中心であるが、HOIL-1L もリガーゼ活性を持つ（図）。そこで、HOIL-1L のリガーゼ活性の機能を検索し、HOIL-1L は LUBAC の3つの

サブユニットの全てをモノユビキチン化することで、LUBAC の機能を抑制していることを明らかにした。さらに、HOIL-1L のリガーゼ活性の欠失は、LUBAC 機能の減弱によって発症する自己炎症と免疫不全症をほぼ完全に治癒できること、サルモネラ菌などの病原微生物の感染を抑制することを明らかにした。この成果は、HOIL-1L の E3 活性は免疫能を賦活させるための創薬ターゲットとなることを示している。印刷中

#### C) T 細胞の異常でも自己免疫疾患ではなく、自己炎症性疾患が発症する

活性中心である HOIP の欠損は LUBAC の機能を完全に消失するが、SHARPIN 欠損ではごく僅かではあるが機能は残存する。この LUBAC の特徴を生かし、2つの免疫疾患、自己免疫疾患と自己炎症性疾患を解析した。自己免疫疾患は自己反応性 T 細胞などリンパ球を主体とした獲得免疫系の異常によって生じる。一方、自己炎症性疾患は自然免疫系の活性化による炎症性サイトカインの過剰分泌などを介して引き起こされる。制御性 T 細胞はエフェクター T 細胞の機能を抑制することで免疫を制御する。HOIP を制御性 T 細胞で欠失すると、エフェクター T 細胞機能が高度に活性化して自己免疫疾患を発症する。しかし、SHARPIN を制御性 T 細胞で欠失した場合には、エフェクター T 細胞機能の亢進は軽度であり、自己免疫疾患ではなく、自己炎症性疾患様の症状を呈した。この結果は、獲得免疫系の異常だけで自己炎症性疾患が生じること、自己炎症性疾患と自己免疫疾患は別々の疾患ではなくオーバーラップがある可能性を明らかにした。論文(2)

#### D) LUBAC 活性化による B 細胞リンパ腫の発症機構の解析

LUBAC 活性増強は ABC 様のびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (ABC-DLBCL) 発症に関与することを示してしていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。加えて、データベース解析でヒト ABC-DLBCL では LUBAC の活性中心である HOIP の発現が他のリンパ腫と比べて増加しており、LUBAC 活性が増強していることが判った。そこで、疾患モデルマウスを作製してそのメカニズムを解析した。

その結果、LUBAC 活性亢進は NF- $\kappa$ B 活性化だけではなく、DNA 損傷依存的な細胞死を抑制することでリンパ腫発症を促進している。さらに、マウスの移植モデルを用いて新たに同定した LUBAC 阻害化合物が、B 細胞リンパ腫の増殖を抑制することを明らかにした。この結果は LUBAC は従来想定されていた NF- $\kappa$ B 活性化に加え、DNA 損傷依存的な細胞死を抑制することでリンパ腫発症に寄与すること、LUBAC 阻害剤が優れた抗がん剤である可能性を示した。

#### E) その他

研究代表者は LUBAC のインフルエンザ感染、染色体分配における役割も解明している。

#### 5. 今後の計画

本研究は当初の目的に向けて順調に進捗しており、研究計画に沿って LUBAC、直鎖状ユビキチン鎖の疾患研究への展開の基礎を築くことを目指す。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- (1) Brazeo, P.L., Morales-Nebreda, L., Magnani, N.D., Garcia, J.G., Misharin, A.V., Ridge, K.M., Budinger, G.R.S., Iwai, K., Dada, L.A., and Sznajder, J.I. Linear ubiquitin assembly complex regulates lung epithelial-driven responses during influenza infection. **J. Clin. Invest.** 130:1301-1314, 2020.
- (2) Sasaki, K., Himeno, A., Nakagawa, T., Sasaki, Y., Kiyonari, H. and Iwai, K. Modulation of autoimmune pathogenesis by T cell-triggered inflammatory cell death. **Nature Commun.** 10:3878, 2019.
- (3) Wu, M., Chang, Y., Hu, H., Mu, R., Zhang, Y., Qin, X., Duan, X., Li, W., Tu, H., Zhang, W., Wang, G., Han, Q., Li, A., Zhou, T., Iwai, K., Zhang, X. and Li, H. LUBAC controls chromosome alignment by targeting CENP-E to attached kinetochores. **Nature Commun.** 10:273, 2019
- (4) Fujita, H., Tokunaga, A., Shimizu, S., Whiting, A. L., Aguilar-Alonso, F., Takagi, K., Walinda, E., Sasaki, Y., Shimokawa, T., Mizushima, T., Ohki, I., Ariyoshi, M., Tochio, H., Bernal, F., Shirakawa, M., and Iwai, K. Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization. **Cell Reports** 23:1192-1204, 2018

#### 受賞

- |                  |         |
|------------------|---------|
| (1) 平成 29 年 11 月 | 持田記念学術賞 |
| (2) 令和元年 11 月    | 武田医学賞   |
| (3) 令和 2 年 3 月   | 上原賞     |

#### 7. ホームページ等

研究室のホームページ

<http://www.mcp-kyoto-u.jp>

論文(2)、(4)の研究内容の紹介ページ

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2019/190828\\_2.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190828_2.html) 論文(2)

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2018/180425\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/180425_1.html) 論文(4)