

# 抗炎症ユビキチンコードに着眼した IBD 発症機構の解明

大阪公立大学大学院医学研究科医化学

清水 康平

## 1. 緒言

ユビキチン修飾は、ヒトにおいて約 600 種存在するユビキチンリガーゼ (E3) が基質にユビキチン (Ub) を付加する翻訳後修飾で、多くの場合は Ub 内に存在する 7 つのリジン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) あるいは 1st メチオニン (M1) を介して Ub が数珠状に結合し、その連結型によって特有の構造を呈する種々のポリ Ub 鎖が形成される。各 Ub 鎖に特異的な Ub 結合タンパク質が動員されることで、プロテアソームによる基質の分解をはじめ多彩な細胞機能が発現する (図 1)。

近年、我々を含む複数のグループが複合型 Ub 鎖と呼ばれるヘテロな連結型の新規 Ub 修飾パターンを相次いで発見し (図 1)、加えて細胞内 Ub 鎖の 10~20% は複合型であるとの報告から、一つの基質に対して複数の E3 が協調的に Ub 鎖を形成することは決して珍しい現象ではないことが分かってきた (Nature. 2019;572:533-537, J. Biochem. 2022;171:361-366)。しかし、複合型 Ub 鎖が如何にして形成され、どのような生理機能を担っているのか、全容はほとんど把握されていない。そのため、拡張された Ub 修飾パターンの構造多様性が内包する細胞機能情報「ユビキチンコード」を解読することは、生命現象のシン (新・深・真) の理解に必須の課題と考えられる。

我々は、直鎖状 Ub 鎖 (M1Ub 鎖) を生成する唯一の E3 複合体として知られる LUBAC の解析を進め、M1Ub 鎖がシグナロソーム形成の足場として機能することが NF- $\kappa$ B 活性化に極めて重要であることを明らかにしてきた (Nat Cell Biol. 2009;11:123-32, Nature. 2011;471:633-6, 他)。NF- $\kappa$ B は炎症・免疫・抗アポトーシス応答の中核を担う転写因子であり、LUBAC の制御不全が炎症性疾患、自己免疫疾患、がんなど多くの疾患発症に関与することから、LUBAC は臨床的に重要な疾患因子であり、その制御機構解明が求められている。

以上の背景から我々は、LUBAC が他の E3 と協調することで M1Ub 鎖を含む複合型 Ub 鎖を形成し、NF- $\kappa$ B の制御や他の細胞機能の発現に寄与している可能性を考えた。本仮説を検証するため、AlphaScreen 法にて LUBAC に直接結合する E3 を網羅的に同定し、さらなる解析を進めた結果、TNF 刺激にตอบสนองして LUBAC に結合する LUBAC-associated protein 1 (LAP1) を発見した。興味深いことに、LAP1 欠損細胞は TNF 誘導性のアポトーシスに抵抗性を示す一方、炎症誘導性細胞死であるネクロプトーシスに対して高い感受性を示した。さらに、Lap1 欠損マウスは、ネクロプトーシスが病態形成に深く関与する潰瘍性大腸炎モデルにおいて高感受性を示すことが分かった。また重要なことに、Lap1 欠損新生仔マウスはその約半数が自然発生的な消化管の出血を認め、血液学的解析から炎症レベルが上昇していることを突き止めた。そこで本研究では、LAP1 及び LUBAC によるネクロプトーシス制御機構を分子レベルで解明し、予備解析から特に明らかになりつつある炎症性腸疾患 (IBD) との連関を究明することとした。

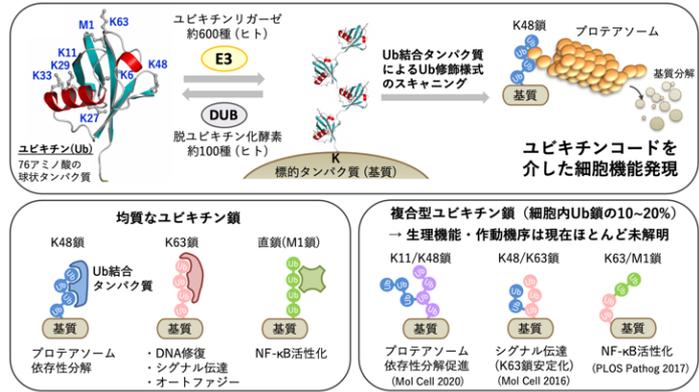


図1. ユビキチンコード：ユビキチン修飾の構造多様性がもたらす細胞機能情報

## 2. 結果と考察

### 2-1 ネクロプトーシス制御における LUBAC と LAP1 の役割

これまでに、RIPK1/RIPK3/MLKL から成るネクロプトーシス誘導複合体(ネクロソーム)における LUBAC 依存的な RIPK1 の Ub 鎖形成は、ネクロプトーシスを抑制することが示唆されているが、その分子機序は不明であった。本研究では、ネクロプトーシスの制御における LAP1 の役割を検討すると共に LUBAC とのクロストークに焦点を当て解析を進めた。その結果、*Lap1* 欠損 MEF は TNF 刺激及び IKK・Caspase-8 チェックポイント阻害によって誘導されるネクロプトーシスに極めて高い感受性を示した。一方、HOIPIN-8 処理による LUBAC 阻害条件下においては、*Lap1* 欠損 MEF は野生型 MEF と比べてネクロプトーシスレベルが若干亢進しているものの、有意な差は認められなかった。このことから、*Lap1* 欠損 MEF のネクロプトーシス高感受性には LUBAC の機能不全が関与していることが示唆された。次に、特定ユビキチン鎖結合担体(TUBE)を用いた pull-down 法により、ネクロプトーシス過程の RIPK1 のユビキチン化状態を調べたところ、*Lap1* 欠損 MEF では LUBAC 依存的な M1Ub 鎖のほか、K48Ub 鎖、K63Ub 鎖の形成が著しく低下していた。質量分析にてネクロプトーシス誘導時の RIPK1 の Ub 化頻度を解析したところ、野生型 MEF と比べて *Lap1* 欠損 MEF では検出された全ての Ub 化部位でその修飾頻度が低下していたものの、その差は予想に反して小さかった。以上の結果から、LUBAC は主に RIPK1 の priming ubiquitination を担っており、LAP1 は Ub 鎖の伸長を担っていることが考えられた。この点について、RIPK1 の Ub 化部位変異体と UbiCRest 法を用いた検証を行ったところ、LUBAC と LAP1 は RIPK1 の kinase domain (KD) と intermediate domain (ID) において M1Ub 鎖を基盤とする複合型 Ub 鎖を形成していることが示された。そこで次に、LUBAC/LAP1 が Ub 化標的とするリジンをアルギニンに置換した RIPK1 変異体(RIPK1-ΔUb)を作製し、LUBAC/LAP1 が創出する複合型 Ub 鎖のネクロプトーシス制御における役割を免疫沈降法や Proximity Ligation Assay (PLA) により多角的に検討した。その結果、本複合型 Ub 鎖は RIPK1 と RIPK3 の相互作用を阻害していることが明らかとなった。以上の結果から、LUBAC は基質である RIPK1 に対し、LAP1 と協調して抗炎症ユビキチンコードを創出し、ネクロプトーシスを抑制していることが明らかとなった。

### 2-2 LUBAC-LAP1 が創出する抗炎症ユビキチンコードの病態・生理学的意義の解析

細胞レベルの解析から、LUBAC-LAP1 軸による RIPK1 の Ub 化はネクロプトーシスを抑制することが明らかとなった。そこで、*Lap1* 欠損マウスで確認された新生仔致死性や IBD モデルの病態増悪がネクロプトーシスに起因することを立証するため、ネクロプトーシスの必須因子である RIPK3 を追加で欠損させた *Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスの解析を進めた。まず、*Lap1* 欠損マウスの新生仔致死性については、*Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスにおいて完全ではないものの統計的に有意に改善されるという結論を得た。また、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発潰瘍性大腸炎モデルについて、病態形成や腸管上皮のネクロプトーシス、炎症性サイトカイン発現レベルが同二重欠損マウスにおいて緩和を認め、*Lap1* 欠損マウスの IBD モデルに対する脆弱性はネクロプトーシス高感受性に起因する可能性が高いと判断された。さらに、大腸オルガノイドを樹立し、腸管上皮のネクロプトーシス感受性について LUBAC 阻害剤 HOIPIN-8 を活用して検討したところ、MEF の結果と同様に、*Lap1* 欠損によるネクロプトーシス高感受性は LUBAC 活性に依存していることが分かった。また、*Lap1* 欠損マウスは新生仔期に消化管を中心に出血傾向が見られることから、小児 IBD 患者に着目し、トランスクリプトームデータを解析した。その結果、临床上注目すべきことに、小児 IBD 患者群において LAP1 の発現が有意に低下していることを見出し、LAP1 の発現低下が IBD の発症や病態形成に関連する可能性が示唆された。

## 3. 今後の展望

ヘテロな連結様式を有する複合型 Ub 鎖は、最近様々な修飾パターンが報告されつつあるが、ユビキチンコ

ードの形成機構や生理機能、その詳細な動作原理については不明な点が多い。本研究ではLUBAC依存性の複合型Ub鎖に着目し、LAP1とのクロストークによる複雑なUb鎖の形成やネクロプトーシス抑制における作動機序を明らかにした。重要なことに、LAP1はネクロプトーシス経路を制御することで炎症性疾患の病態形成を抑制している可能性が示唆された。そのため、今後は本研究において見出された抗炎症ユビキチンコードの生体内における役割を明確に示すことが重要な課題であると考えられる。特に、LAP1はIBDとの関連が示唆されたことから、LUBAC/LAP1が標的とするUb化部位に変異を導入した*Ripk1*ノックインマウスや独自開発したLUBAC阻害剤HOIPIN-8を活用し、腸管組織を中心にネクロプトーシスの制御において実際にRIPK1の複合型Ub鎖が機能しているか検証を進める必要がある。さらに、IBD患者検体を用いてLAP1やLUBACの発現レベルと病態の相関を評価し、LAP1/LUBACの病態生理学的意義を明らかにすることも必要である。本成果により、複合型Ub鎖という新たな側面からネクロプトーシスと疾患との分子病態連関がより明確になれば、特に炎症性疾患の発症・病態形成機構の解明や、新規知見に基づく創薬モダリティ・シーズの導出と治療法の開発に貢献でき、基礎生命科学・臨床医学両面において大きな波及効果が期待できる。また、*Lap1*欠損マウスが新生仔致死性を示すことも大きな発見の一つであった。*Lap1/Ripk3*二重欠損マウスの解析から、ネクロプトーシスの亢進が*Lap1*欠損マウスの致死性に大きく寄与しているものと想定された。本成果が今後、新生児敗血症などヒト新生児疾患のメカニズム解明にも繋がることが期待される。

#### 4. 学会等における発表

- 1) 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. 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. 第69回生化学会近畿支部例会, 2023年5月27日, 一般口頭発表.
- 2) 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. 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. 第31回日本Cell Death学会学術集会, 2023年7月16日, 一般口頭発表. ベストプレゼンテーション賞受賞.
- 3) LUBAC and its associated ubiquitin ligase generate heterotypic ubiquitin chains to inhibit necroptosis. Kouhei Shimizu, Min Gi, Daisuke Oikawa, Tran Thi Thuy Linh, Hidetaka Kosako, Hirota Takahashi, Tatsuya Sawasaki, Fuminori Tokunaga. The 3rd Japan and Australia Meeting on Cell Death 2023, 2023年8月17日, ポスター発表. 1st Prize Poster Presentation 受賞.
- 4) 新規LUBAC結合E3によるTNF誘導性細胞死の多面的制御. 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. 第46回日本分子生物学会年会, 2023年12月8日, シンポジウム招待講演.