

炎症制御に関与する直鎖状ユビキチン結合因子の探索

群馬大学 生体調節研究所 分子細胞制御分野

徳永 文稔

1. はじめに

ユビキチンは真核生物に高度に保存された 76 残基からなる低分子量タンパク質で、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) という 3 種の酵素活性を介して標的タンパク質に連結される翻訳後修飾因子である (1)。さらに、E1-E2-E3 酵素サイクルを繰り返すことによってユビキチンが数珠状に連結したポリユビキチン鎖を生成する。タンパク質のユビキチン化は、結合するユビキチンの分子数やユビキチン間の連結様式のバリエーションによって多彩な生理機能を発現する。例えば、標的タンパク質にユビキチンが 1 分子結合するモノユビキチン化は、エンドサイトーシスなど細胞内輸送に関与する。一方、ユビキチン内の七つの Lys (K) 残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) のいずれかを介してポリユビキチン鎖を生成した場合、K48 ポリユビキチン鎖はプロテアソーム分解を引き起こすが、K63 ポリユビキチン鎖はシグナル伝達や DNA 修復などタンパク質分解以外の役割を担うことが知られる (1)。

これまでに見出されたユビキチン間の結合は、ユビキチン内の Lys 残基を介するイソペプチド結合性であったが、我々は、ユビキチンの N 末端 Met1 を介してペプチド結合で連結される新規「直鎖状ポリユビキチン鎖」を生成するユビキチンリガーゼ複合体 (LUBAC: linear ubiquitin chain assembly complex) を発見し、LUBAC が NF- κ B (nuclear factor- κ B) 制御に必須であることを明らかにした (2-5)。NF- κ B は炎症応答や免疫制御、抗アポトーシスにおいて中心的な役割を果たす転写因子で、通常は阻害タンパク質 (I κ B: inhibitor of κ B) が結合することでサイトゾルに係留されている。しかし、細胞が NF- κ B 活性化刺激を受け I κ B が分解されると核内へ移行し、標的遺伝子の制御エレメントへ結合して 500 種以上の遺伝子転写を亢進する (6)。このため、NF- κ B シグナル経路の不全は、多くのがん、炎症性疾患、自己免疫疾患、生活習慣病、神経変性疾患の発症要因となる (7)。LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成は、NF- κ B 経路の中核の酵素である I κ B キナーゼ (IKK) の活性化を導き、NF- κ B 活性調節に極めて重要な意義をもつ (2-5)。

このように直鎖状ユビキチン鎖は NF- κ B シグナル経路の重要な制御因子として機能すると考えられるので、本研究で我々は新規直鎖状ユビキチン結合因子の探索を行った。その結果、脱ユビキチン化酵素 (A20) の 7 番目の亜鉛フィンガー領域 (ZF7) が特異的に直鎖状ユビキチンに結合することを見出した。さらに、A20 の直鎖状ユビキチン結合能喪失が B 細胞リンパ腫発症に関わることを明らかにした (8)。

2. 方法

細胞培養、ルシフェラーゼアッセイ--- HEK293T 細胞、A20^{+/+}および A20^{-/-}マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) は 10% 牛胎児血清とペニシリン/ストレプトマイシンを添加した DMEM 中で 5% CO₂ 下で培養した。NF- κ B 転写活性は pGL4-NF κ B-Luc と pGL4-Renilla-Luc/TK (プロメガ社) とともに解析用プラスミドを共発現し、24 時間後に細胞を溶解後、Bright-Glo ルシフェラーゼアッセイシステムを用いて測定した。

結晶構造解析--- 大腸菌にて発現した A20 ZF7 と直鎖状ユビキチンをハンギングドロップ法にて結晶化し、SPRING-8 (兵庫) または PF-AR (筑波) にて解析した。構造決定は MOLREP を用いた分子置換法にて行った。

TNF 受容体複合体解析--- 細胞を FLAG-TNF α で刺激した後、20 mM Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、0.2% NP-40、10% グリセロール、プロテアーゼ阻害剤カクテルにて溶解し、FLAG-M2 抗体ビーズを用いて免疫沈降した。サンプルは SDS-PAGE 後、ウェスタンブロットを行った。

GST プルダウン--- GST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) を融合した A20 ZF は大腸菌で発現し、グルタチオンセファロースを用いて精製した。GST 融合タンパク質のユビキチン結合性は、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM DTT、0.1% NP-40、250 mg/ml ウシ血清アルブミン中で

タンパク質を混合したのち、グルタチオンビーズによって沈降させ解析した。

3. 結果と考察

我々は LUBAC 活性を抑制する脱ユビキチン化酵素をスクリーニングする過程で、A20 は脱ユビキチン化酵素活性非依存的に LUBAC による NF- κ B 活性化を強く抑制することを見出した。A20 は脱ユビキチン化酵素活性を担う OTU ドメインと 7 つの ZF 領域からなる (図 1)。そこで、LUBAC 活性抑制に重要なドメインを解析したところ、7 番目の ZF 領域 (ZF7) が必須であることを見出した。さらに、A20 ZF7 生理機能解析を行い、この領域が直鎖状ユビキチンに強固に結合する ($K_d = 9 \mu\text{M}$) が K48 や K63 ユビキチン鎖やユビキチン単量体には結合しないことを明らかにした。これは A20 が ZF7 を介して直鎖状ユビキチンに特異的に結合することを示す。そこで、さらに A20 ZF7 の直鎖状ユビキチン結合を詳細に明らかにするために、共結晶構造解析を行った (図 1) (8)。その結果、A20 ZF7 は遠位ユビキチンの Ile44 疎水性ポケットと近位ユビキチンの α -ヘリックス領域と同時に結合することで直鎖状ユビキチン鎖を認識し、Gly76-Met1 のユビキチン間連結を直接識別しているのではないことが示された。これまでに、直鎖状ユビキチン特異的結合ドメインとして NEMO の UBAN ドメイン (9) と HOIL-1L の NZF ドメイン (10) が報告されているが、A20 ZF7 はこれらの直鎖状ユビキチン特異的認識ドメインとは近位ユビキチン認識機構が大きく異なることが明らかになった (図 2)。興味深いことに、A20 ZF7 における直鎖状ユビキチン認識に重要なアミノ酸は、A20 の七つの ZF ドメインのうち ZF7 にのみ存在し、進化的にはホヤ以上の動物の A20 ZF7 には高度に保存されていた。従って、多機能性分子である A20 は、C 末端の ZF7 において直鎖状ユビキチンと特異的に結合することで、重要な生理機能を担うことが示唆された。

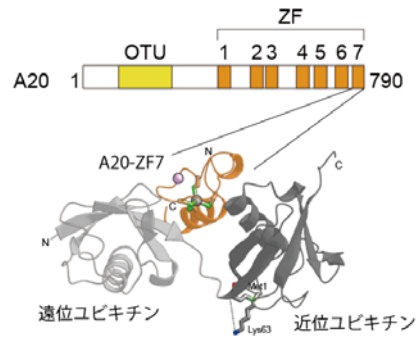


図 1 A20 は C 末端の ZF7 を介して直鎖状ユビキチンに特異的に結合する

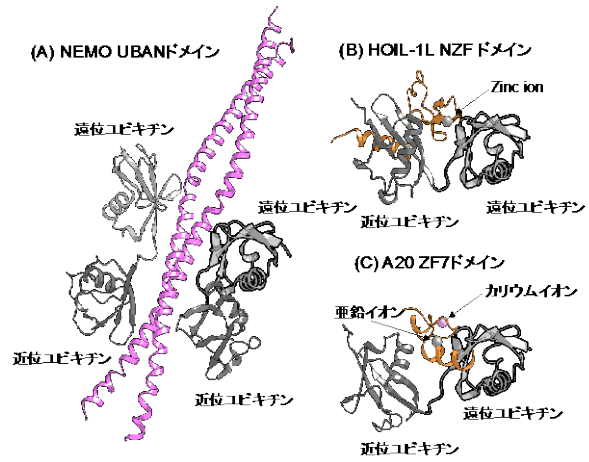


図 2 直鎖状ユビキチン特異的認識機構
これまでに解明された NEMO UBAN ドメイン (A)、HOIL-1L NZF ドメイン (B)、A20 ZF7 ドメイン (C) による直鎖状ユビキチン結合を示す。

近年、A20 の遺伝子変異が悪性リンパ腫の一種である B 細胞リンパ腫の主要な発症原因であることが明らかになり、A20 の遺伝子多型 (SNPs) は全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、乾癬、セリアック病、クローン病、I 型糖尿病など自己免疫疾患や炎症性疾患発症に関わることが示されている (11)。B 細胞リンパ腫は特徴的な多核細胞が現れるホジキンリンパ腫とそれ以外の非ホジキンリンパ腫に大別され、わが国では非ホジキンリンパ腫患者が多い。現在、B 細胞リンパ腫患者には、CD20 に対する分子標的薬と化学薬剤のカクテル療法 (R-CHOP 療法) が行われているが、予後不良の場合も多い (12)。これまでに、B 細胞リンパ腫を引き起

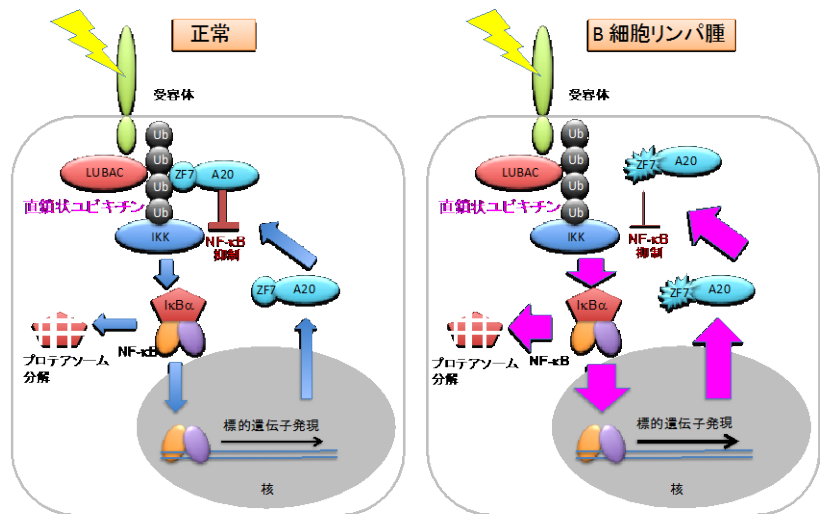


図 3 A20 の直鎖状ユビキチン結合を介した NF- κ B 抑制とその破壊による B 細胞リンパ腫発症のメカニズム
A20 は ZF7 を介して直鎖状ユビキチンに結合することで TNF 受容体へ集積して NF- κ B 活性を抑制するが、A20 の遺伝子変異により ZF7 の直鎖状ユビキチン結合能が失失すると NF- κ B の持続的活性化状態となり、B 細胞リンパ腫を引き起こすと考えられる。

こす多数の A20 遺伝子のノンセンス変異やミスセンス変異が同定されており、ZF7 の欠損やアミノ酸変異ががん発症に関与することが示唆されている(13)。そこで我々は、非ホジキンリンパ腫を引き起こす A20 ZF7 内の Asn772→Lys (N772K) 変異と Glu781→Asp (E781D) 変異に着目して解析を進めた。その結果、これらのアミノ酸変異によって ZF7 の直鎖状ユビキチン結合能が喪失すること、NF- κ B 活性化刺激に伴う A20 の TNF 受容体への集積が減弱し、IKK や LUBAC など NF- κ B 活性を正に調節する因子の受容体からの解離が不全になることを明らかにした(8)。従って、A20 の直鎖状ユビキチンの結合能の欠損は、NF- κ B の持続的活性化を引き起こすことで B 細胞リンパ腫を発症させると示唆された(図 3)。今後、直鎖状ユビキチン鎖を標的にすることで NF- κ B 活性を阻害し、B 細胞リンパ腫の進行を抑制する新たな薬剤の探索が必要と考える。

謝辞

A20 ZF7 と直鎖状ユビキチンとの結晶構造解析は東京大学大学院理学系研究科濡木理教授グループとの共同研究である。公益財団法人アステラス病態代謝研究会のご支援と共に深く感謝したい。

4. 参考文献

1. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**, 761-807
2. Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., and Iwai, K. (2006) A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J* **25**, 4877-4887
3. 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., and Iwai, K. (2009) Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol* **11**, 123-132
4. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, K. (2011) SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* **471**, 633-636
5. Tokunaga, F. (2013) Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders. *J Biochem* **154**, 313-323
6. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* **26**, 203-234
7. Ben-Neriah, Y., and Karin, M. (2011) Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol* **12**, 715-723
8. Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., and Nureki, O. (2012) Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. *EMBO J* **31**, 3856-3870
9. Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S., and Dikic, I. (2009) Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- κ B activation. *Cell* **136**, 1098-1109
10. Sato, Y., Fujita, H., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., Kaiser, S. E., Iwai, K., and Fukai, S. (2011) Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20520-20525
11. Hymowitz, S. G., and Wertz, I. E. (2010) A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **10**, 332-341
12. Cang, S., Mukhi, N., Wang, K., and Liu, D. (2012) Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol* **5**, 64
13. Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y., and Ogawa, S. (2009) Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* **459**, 712-716