

直鎖状ユビキチン鎖生成を介した炎症・免疫シグナル制御と疾患

徳 永 文 稔

大阪市立大学大学院医学研究科 分子病態学

Linear Ubiquitination-mediated Regulation of Inflammatory and Immune Responses
and its Related Diseases

Fuminori Tokunaga

(Department of Pathobiochemistry, Osaka City University, Graduate School of Medicine)

Abstract

Ubiquitination is a post-translational modification involved in the regulation of a wide variety of cellular functions, such as proteasomal protein degradation, membrane trafficking, DNA repair, and signal transduction pathways, such as nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway. NF- κ B is crucial for inflammatory and immune responses, and aberrant NF- κ B signaling is implicated in multiple disorders. We identified that LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex), composed of HOIL-1L, HOIP, and SHARPIN, generates a novel type of Met1 (M1)-linked linear polyubiquitin chain, and specifically regulates the canonical NF- κ B pathway. Moreover, we revealed that a linear ubiquitin-binding protein, optineurin (OPTN), contributes to suppression of NF- κ B and apoptotic pathway, and the aberrant functions in linear ubiquitin-binding of OPTN closely associates with amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

要 約

タンパク質のユビキチン修飾は、プロテアソーム分解に導く標識として見出されたが、その後の研究から細胞内輸送、DNA 修復、シグナル伝達など多彩な生理機能を制御することが明らかになってきた。我々は、HOIL-1L, HOIP, SHARPIN という 3 サブユニットからなる複合体型ユビキチンリガーゼ (LUBAC) を見出し、LUBAC がユビキチンの N 末端 Met1 を介する「直鎖状ユビキチン鎖」という全く新しいタイプのユビキチン連結鎖を特異的に生成することで細胞内シグナル伝達のうち NF- κ B 経路を制御することを見出した。NF- κ B は炎症応答や自然・獲得免疫制御において中心的な働きを司る転写因子で、その活性化経路の破綻は多くの癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、生活習慣病、神経変性疾患発症に関わる。また、LUBAC によって生成される直鎖状ユビキチン鎖に特異的に結合するドメインをもつタンパク質は、NF- κ B 活性調節に寄与する。一例として我々は、直鎖状ユビキチン鎖結合ドメイン (UBAN ドメイン) を有するオプチニューリン (optineurin) が NF- κ B 活性化経路とアポトーシスを抑制し、そのユビキチン鎖結合性の破綻が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 発症に深く関わることを突き止めた。

Key Word: Ubiquitin, NF- κ B, Inflammation, Immune response, Amyotrophic lateral sclerosis

1. はじめに

ユビキチンは 76 残基 (8.6 kDa) からなる低分子量球状タンパク質で真核生物に普遍的に存在し、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

パク質に結合される翻訳後修飾因子である (Fig. 1)¹⁾。タンパク質のユビキチン修飾はプロテアソーム分解に導く標識として機能することが最初に見出されたため、「ユビキチン化=分解」と考えられがちだが、ユビキチン修飾はエンドサイトーシス、DNA 修復、細胞内シグナル伝達など

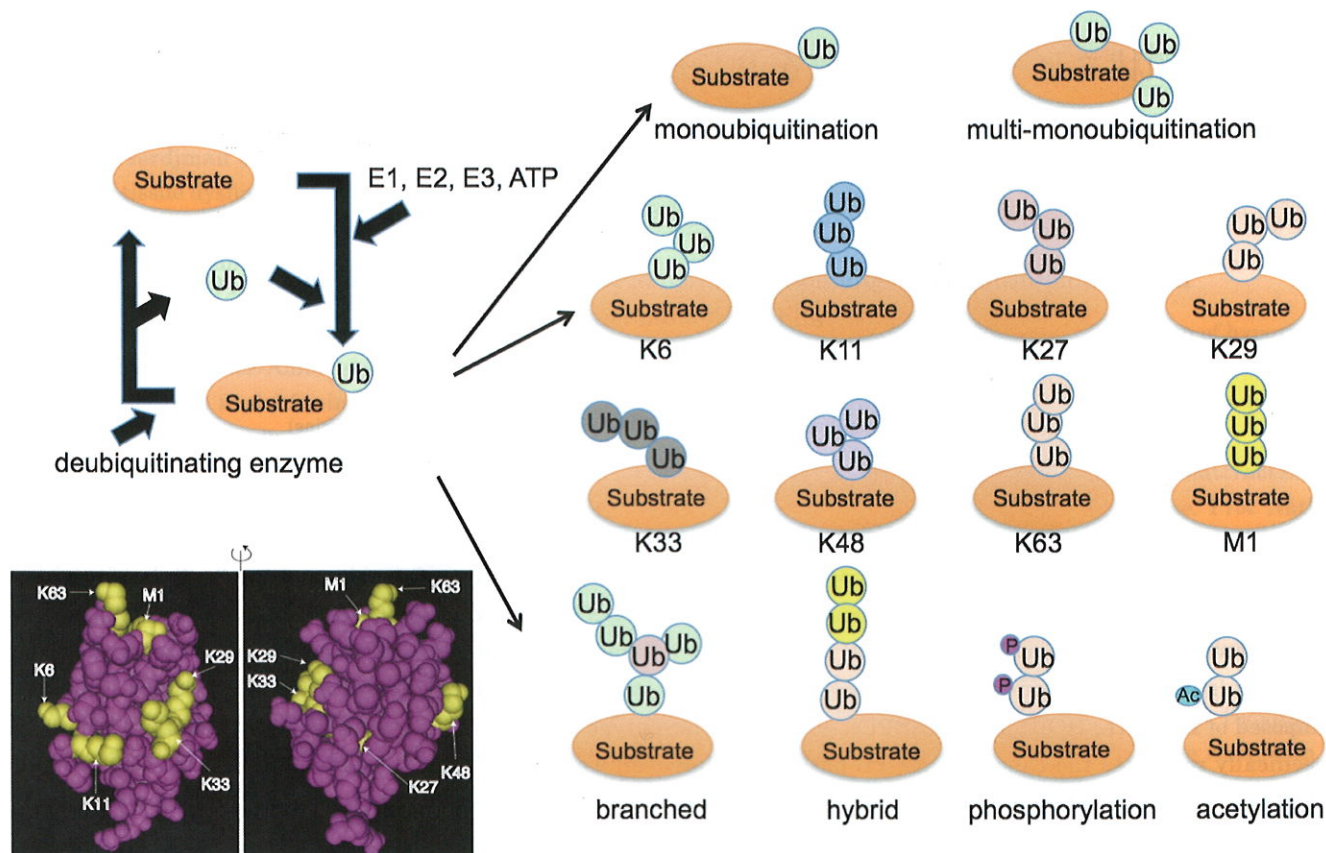


Fig. 1 Diversity of ubiquitin code enables multiple cellular functions. Protein ubiquitination is catalyzed by three enzymes, E1, E2, and E3, whereas the reverse reaction is catalyzed by deubiquitinating enzyme. In addition to monoubiquitination and multi-monoubiquitination, 8 types (M1, K6, K11, K27, K29, K33, K48, and K63) of homogenous polyubiquitin chain, branched polyubiquitin chain, and hybrid polyubiquitin chain are produced in cells. Moreover, phosphorylation and acetylation of specific residues in ubiquitin are recently identified.

非タンパク質分解の機能も数多く担うことが分かってきた。また、細胞周期やタンパク質の品質管理などの細胞の基本機能調節に関与するため、ユビキチン修飾系の破綻は癌、神経変性疾患、ウイルス感染応答など多くの病態発現に関わる。この様にユビキチン修飾系が多様な細胞機能制御を司ることができる分子基盤は、ユビキチン連結の多様性に起因する (Fig. 1)²⁾。つまり、タンパク質に1分子のユビキチンが結合するモノユビキチン化や数分子のモノユビキチンが結合するマルチ-モノユビキチン化に加えて、ユビキチンが分子間で数珠状に連結したポリユビキチン鎖も生成できる。ポリユビキチン鎖には分子内7箇所の Lys (K) 残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) と我々が同定した N 末端 Met1 (M1) を介する「直鎖状ユビキチン鎖」の8通りの均一連結様式のポリユビキチン鎖がある。さらに最近、分岐鎖状ユビキチン鎖や混成型ユビキチン鎖という複雑な構造をもつユビキチン鎖の存在も見出されてきた。また、ユビキチン内の特定残基にリン酸化やアセチル化が施される場合があることも明らかにされてきた。この様なユビキチン連結様式の多様性がそれぞれ特異

的な一群の結合タンパク質を集積させる足場として働き、その下流で多彩な細胞機能発現を可能にしている。本総説では、我々が同定した LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B シグナル制御とその破綻が引き起こす疾患に焦点を当てて紹介したい。

2. LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B 制御

我々は、HOIL-1L, HOIP, SHARPIN の3つのサブユニットから構成される複合体型ユビキチンリガーゼ (linear ubiquitin chain assembly complex; LUBAC) がユビキチンの N 末端 Met1 を介する直鎖状ユビキチン鎖を特異的に生成することを同定した (Figs 2A and 2B)³⁻⁶⁾。現在のところ、LUBAC は直鎖状ユビキチン鎖を生成する唯一の酵素である。我々は、LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成が炎症応答や自然・獲得免疫制御に中枢的な働きを担う NF- κ B シグナル経路の活性化を導くことを世界に先駆けて明らかにした。細胞が炎症サイトカイン (TNF- α や IL-1 β など) の刺激を受けると、LUBAC は受

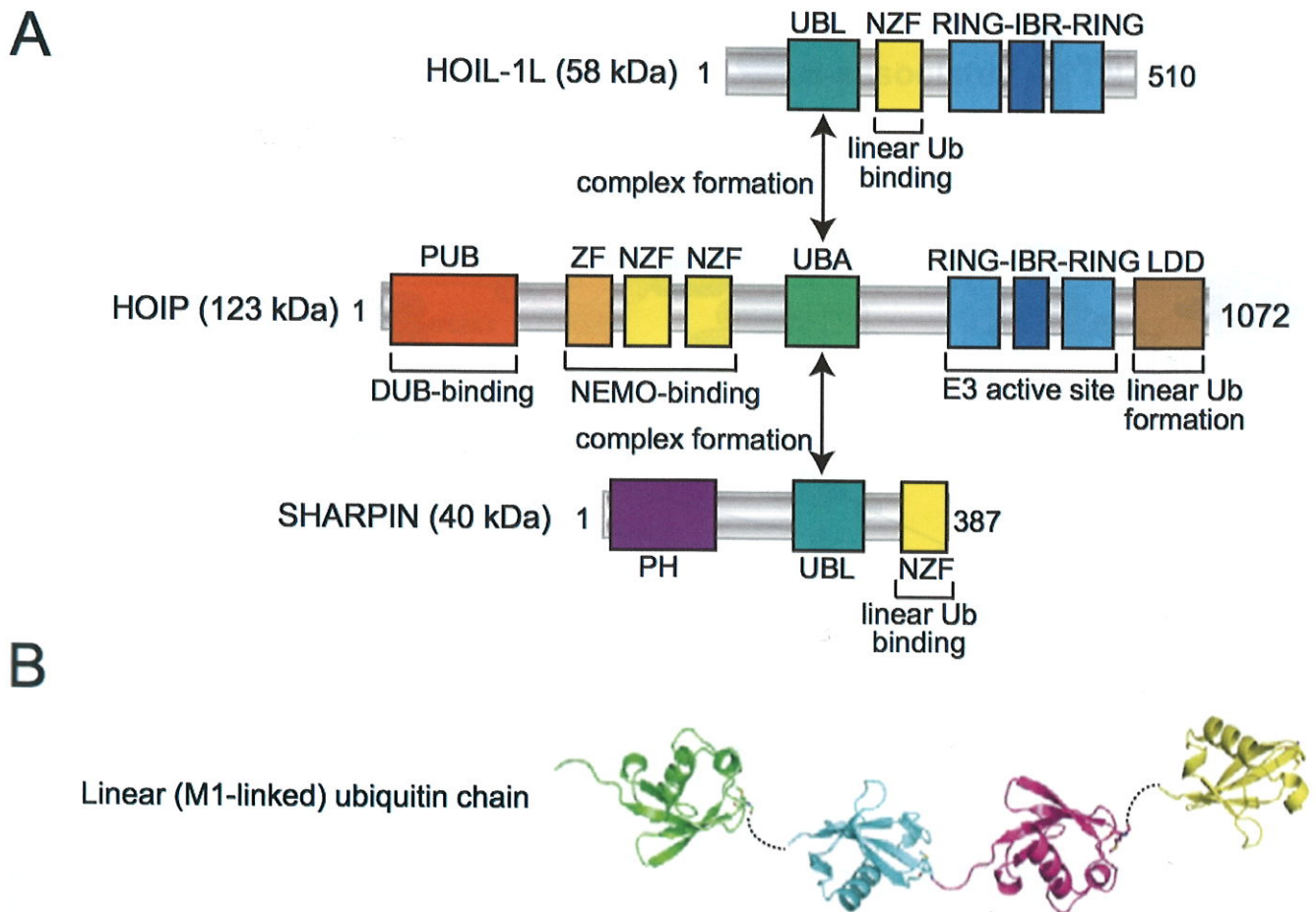


Fig. 2 LUBAC and linear ubiquitin chain. A, LUBAC is composed of three subunits, named HOIL-1L, HOIP, and SHARPIN. RING domains in HOIP are the catalytic active site of LUBAC to generate linear ubiquitin chain. B, Structure of linear (M1-linked) ubiquitin chain.

容体直下で I κ B キナーゼ (IKK) の制御サブユニットの NEMO に直鎖状ユビキチン鎖を付加する (Fig. 3)⁴⁾。さらに、NEMO には直鎖状ユビキチンに特異的に結合する UBA1 ドメインがあるため⁷⁾、直鎖状ユビキチン鎖を足場として多分子の IKK 複合体が集積し、分子間リン酸化反応によって IKK が活性化することが明らかになった⁸⁾。近年、LUBAC は炎症サイトカイン刺激のみならず、Toll 様受容体を介した自然免疫応答や抗がん剤など遺伝毒性ストレスによって核内から活性化する NF- κ B 経路、および IL-1 β 産生に関わるインフラマソームの活性化制御にも関与することが示され、LUBAC による直鎖状ユビキチン化が広範な炎症応答や自然・獲得免疫制御に重要であることが明白になりつつある (Fig. 3)⁹⁾。

3. 直鎖状ユビキチン結合タンパク質オプチニューリン (OPTN) の機能破綻による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 発症

OPTN は、NEMO に高い相同性をもつタンパク質で、直鎖状ユビキチン鎖結合性の UBA1 ドメインも含有す

る。これまでに OPTN の生理機能として、NF- κ B 活性、インターフェロン産生、オートファジー、細胞内膜輸送など多様な細胞機能制御に関与することが示されている¹⁰⁾。さらに、興味深いことに、OPTN 遺伝子の変異は原発開放隅角緑内障 (POAG)¹¹⁾ や ALS¹²⁾ など神経変性疾患を引き起こすことが報告されている。しかし、OPTN がどのように二つの異なる疾患を惹起するのか、そのメカニズムについてはよく解っていない。

そこでまず我々は、OPTN の POAG 型変異や ALS 型変異が NF- κ B 活性制御にどのような影響を与えるか解析した。その結果、POAG 型変異体は野生型と同様に、強く NF- κ B 活性を抑制したが、ALS 型変異体では NF- κ B 活性抑制能を喪失していることを突き止めた (Fig. 4)¹³⁾。ALS 型変異体の多くは、UBA1 ドメインの欠損またはアミノ酸置換に起因しているため、OPTN の NF- κ B 阻害活性に UBA1 ドメインが重要であり、その機能破綻が ALS 発症に関連することが示唆された。そこで、実際に OPTN の UBA1 ドメインが直鎖状ユビキチン鎖に結合できるか確かめるために、共結晶構造解析を行った。その結

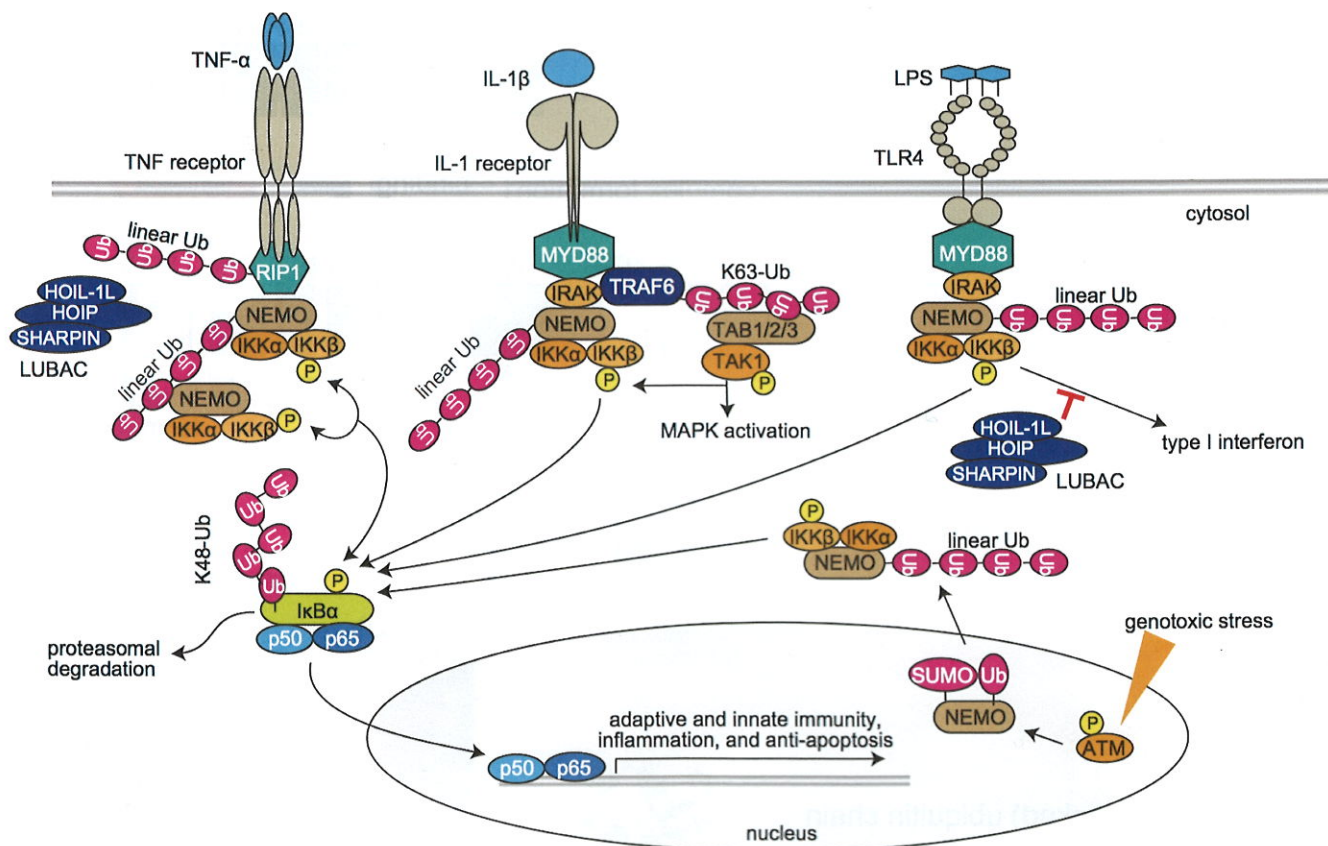


Fig. 3 LUBAC-mediated regulation of NF- κ B activation pathways. LUBAC conjugates linear ubiquitin chains to NEMO upon stimulation by proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β . Then, the linear ubiquitinated NEMO functions as a scaffold to recruit other IKK molecules through NEMO's UBAN domain, which is a linear ubiquitin-specific binding domain. The accumulated IKK molecules are activated by *trans*-phosphorylation reaction and this initiates the canonical NF- κ B pathway. In addition to inflammatory responses, LUBAC is also involved in innate immunity and genotoxic stress-induced NF- κ B pathways.

果, OPTN の UBAN ドメインは二量体を形成し, その両側に直鎖状ユビキチンが結合していることを見出した¹³⁾. これらの結果から, OPTN の直鎖状ユビキチン結合能が喪失すると NF- κ B 活性が異常に亢進するため, ALS 発症に至る可能性が示された.

そこで我々は, CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集技術によって OPTN 遺伝子を欠損させた細胞を作製し, この細胞では刺激に伴う NF- κ B 活性化が正常型より強くなることや, アポトーシスも亢進することを見出した¹³⁾. これらの結果は, OPTN が神経炎症や細胞死を防ぐ役割を担っていることを意味する (Fig. 4). 最後に, OPTN 遺伝子変異 (Q398X や E478G 変異) を伴う ALS 患者由来の運動ニューロンの病理染色を行ったところ, これらの患者由来標本では直鎖状ユビキチンや活性型 NF- κ B 因子 (リン酸化 p65) が細胞質凝集体に染色されることが見出され, アポトーシスの指標である活性型カスパーゼ 3 の染色も亢進した¹³⁾. これまで, アルツハイマー病, パーキンソン病, ALS など神経変性疾患でユビキチン陽性凝集体が検出されることはよく知られていたが, 直鎖状ユビキチ

ン鎖が細胞質凝集体に包含されているという知見は今回初めて見出されたものである. 本研究から OPTN の直鎖状ユビキチン鎖結合不全によって神経炎症の持続的亢進と神経細胞死の促進が起こり, これが ALS 発症に関わることが明らかにされた (Fig. 4).

4. おわりに

ALS は筋肉を動かし, 運動を司る神経ニューロンが特異的に障害を受けるため, 手足, のど, 舌の筋肉や呼吸に必要な筋肉が萎縮する神経難病である. 発症は 60 ~ 70 歳代が主で, 男女比はおよそ 1.3 : 1 とやや男性が多く, 国内には約 1 万人の患者がおられ, 年々増加傾向を示している. 現在, 神経細胞の保護効果を持ち, 病勢抑制効果を持つ薬剤はあるが, 根本的な治療法はない¹⁴⁾. ALS の約 90% は発症原因が不明の孤発性 ALS だが, 約 10% は遺伝子変異が関連する家族性 ALS である. これまでに約 20 の原因遺伝子が見出され, その遺伝子異常が引き起こす生理機能破綻を解析することで, ALS 発症機構解明を目指す研究が精力的に進められている¹⁵⁾. OPTN の遺伝子変異

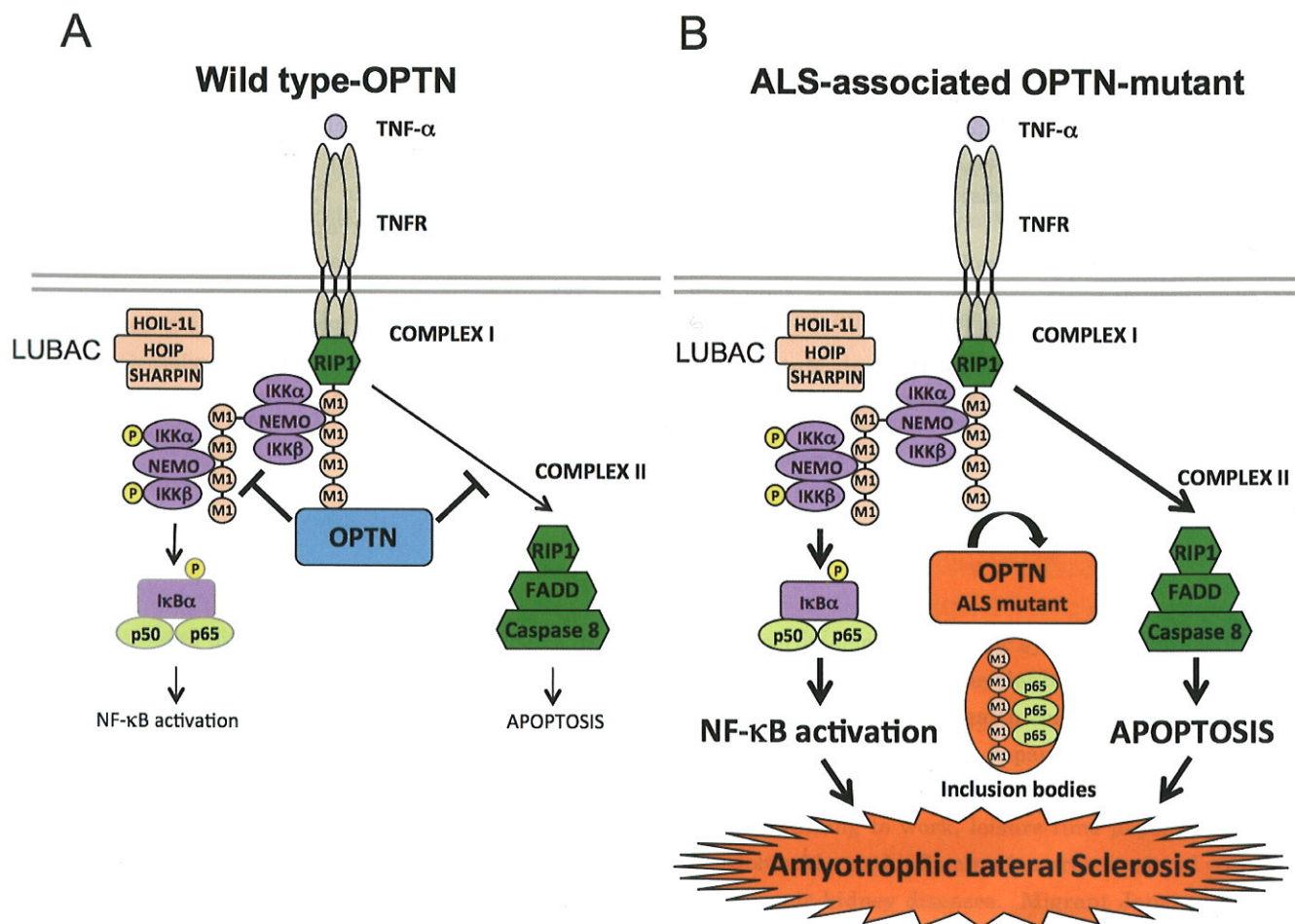


Fig. 4 OPTN regulates NF- κ B and apoptotic pathways through linear ubiquitin-binding, and the failure of the function induces ALS. A, Under the physiological conditions, OPTN binds linear ubiquitin through its UBA domain, and suppresses NF- κ B and apoptotic pathways. B, Most of the ALS mutants of OPTN lost linear ubiquitin-binding ability, which result in the enhanced NF- κ B activation. Moreover, linear ubiquitin and activated NF- κ B (P-p65) are accumulated in cytoplasmic inclusions. Then, apoptotic pathway is also enhanced. The dysregulation of signaling pathways is a possible cause for ALS.

がALSに関わることは2010年に日本で発見され、ALS発症に関連する重要なタンパク質であることが明らかにされている¹²⁾。我々は、LUBACによる直鎖状ユビキチン鎖生成を介したNF- κ B活性化という新規細胞機構を明らかにするとともに、その制御破綻がALS発症に関わる可能性を示した。今後、LUBAC活性阻害剤がALS治療薬開発の標的となるなど、新たな研究進展が期待される。さらに、NF- κ B活性制御の破綻は神経変性疾患のみならず、多くの癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、生活習慣病に関わることが知られ、直鎖状ユビキチン鎖を介した炎症制御と疾患に関する基礎医学研究の重要性は益々高くなると考えられている。

文 献

- 1) Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425-479.
- 2) Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev*

Biochem 2012;81:203-229.

- 3) Kirisako T, Kamei K, Murata S, et al. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J* 2006;25:4877-4887.
- 4) Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol* 2009;11:123-132.
- 5) Tokunaga F, Nakagawa T, Nakahara M, et al. SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* 2011;471:633-636.
- 6) Tokunaga F. Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders. *J Biochem* 2013; 154:313-323.
- 7) Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, et al. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- κ B activation. *Cell* 2009;136:1098-1109.
- 8) Fujita H, Rahighi S, Akita M, et al. Mechanism underlying I κ B kinase activation mediated by the linear ubiquitin chain assembly complex. *Mol Cell Biol* 2014;

- 34:1322-1335.
- 9) Sasaki K, Iwai K. Roles of linear ubiquitinylation, a crucial regulator of NF- κ B and cell death, in the immune system. *Immunol Rev* 2015;266:175-189.
 - 10) Slowicka K, Vereecke L, van Loo G. Cellular functions of optineurin in health and disease. *Trends Immunol* 2016; 37:621-633.
 - 11) Rezaie T, Child A, Hitchings R, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002;295:1077-1079.
 - 12) Maruyama H, Morino H, Ito H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010; 465:223-226.
 - 13) Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, et al. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Commun* 2016;7: 12547.
 - 14) Weishaupt JH, Hyman T, Dikic I. Common molecular pathways in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Trends Mol Med* 2016;22:769-783.
 - 15) Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 2015;347:1436-1441.