

# 研究終了報告書

## 「リニアユビキチンコードが制御する生体防御応答機構の解析と応用」

研究期間： 2021年10月～2024年3月

研究者：清水 康平

### 1. 研究のねらい

細胞は、基質タンパク質に形成される種々のユビキチン修飾パターン「ユビキチンコード」を駆使することで、状況に応じた様々な細胞機能を発現することができる(図1)。ユビキチン修飾系では、ユビキチンリガーゼ(E3)が個々に特有の連結様式で基質にポリユビキチン修飾を施すが、近年、複合型ユビキチン鎖と呼ばれるヘテロな連結様式を

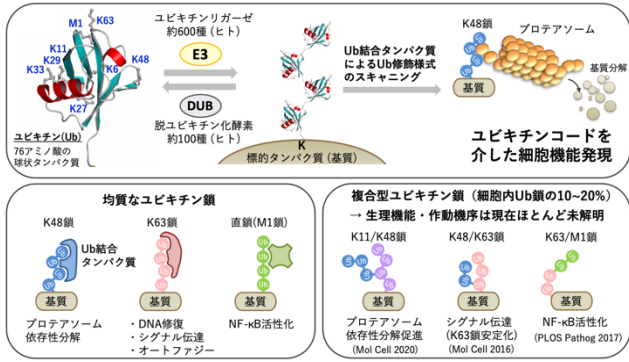


図1. ユビキチンコード：ユビキチン修飾の構造多様性がもたらす細胞機能情報

有する新たなユビキチンコードが見つかり、複数の E3 が協調的にユビキチン鎖を形成していることが考えられた。しかし、この複合型ユビキチン鎖が如何にして形成され、どの様な生理機能を発揮するのか、全容はほとんど分かっていない。従って、新規ユビキチンコードの発見とその生理的意義の解明は、ユビキチンバイオロジーの観点から生命現象を分子レベルで詳細に捉えるために必須の課題と考えられる。

LUBAC は、ユビキチンの 1st メチオニンを介して直鎖状のポリユビキチン鎖(M1Ub 鎖)を生成する唯一の E3 複合体であり、本活性が NF-κB の活性化や細胞死の制御において極めて重要な役割を果たしている。LUBAC の制御不全は炎症性疾患、免疫不全症、がんなど多くの疾患発症に関与することが指摘されており、その詳細な制御機構解明が求められている。本研究では、LUBACと協働するE3が作り出す複合型ユビキチン鎖を「リニアユビキチンコード」と定義し、その生体防御応答における病態・生理学的意義を解明すると共に、ユビキチンコードに基づく細胞機能を化学技術で操る革新的技術の創出と医療応用への推進を目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

##### I. LAP1-LUBAC が創出するリニアユビキチンコードの同定と生体防御応答における役割

新規 LUBAC 結合タンパク質として同定し、LAP1(LUBAC-associated protein 1)と命名した E3 が細胞内で LUBAC とどのようにクロストークし、リニアユビキチンコードを介して生体防御応答を制御し得るのか、LUBAC の生理機能に照らして包括的な解析を実施した。その結果、LAP1 は TNF シグナルにตอบสนองして即時に LUBAC に結合し、LUBAC 依存的な NF-κB 活性化を抑制することを見出した。本機構に関して、基質への LUBAC との協調的なユビキチン鎖形成は認められず、寧ろ基質修飾に対する競争を示唆する結果が得られた。一方、TNF シグナル経路において細胞死が誘導される局面においては、LUBAC は基質である RIPK1 に対して LAP1 と協調的に M1Ub 鎖を基盤とする複合型のリニアユビキチンコードを創出し、ネクロプト

ーシスを抑制することを見出した。個体レベルでは、*Lap1* 欠損マウスが新生仔致死性を示すことを発見し、現在その死因がネクロプトーシスに起因することを示す遺伝学的データが得られつつある。さらに、新生仔致死を免れた *Lap1* 欠損成体マウスはネクロプトーシスが病態形成に関与するとされる炎症性腸疾患(IBD)モデルや敗血症モデルに脆弱であることが明らかとなった。本研究より、LAP1 は LUBAC を介した NF- $\kappa$ B 制御やリニアユビキチンコードによるネクロプトーシス制御など、TNF シグナル経路において細胞の生存から死の局面に渡り多面的な機能を発揮する極めて重要な生体防御因子であることが明らかとなった。

## II. ユビキチンコードに基づく次世代細胞機能編集技術の開発と医療応用

ユビキチンコードに基づく細胞機能の人為的制御を可能とする化合物を探索し、医療応用に繋げる目的で、LUBAC の活性中心を担う HOIP と LAP1 とのタンパク質間相互作用(PPI)を安定化あるいは阻害する低分子化合物(9600 種)・中分子化合物(15000 種)のスクリーニングを AlphaScreen にて実施した。最終的に、HOIP-LAP1 間の結合阻害効果を示すヒット化合物を4 種同定することに成功した。今後、ヒット化合物が細胞内において、想定したメカニズムで炎症を制御し得るか検証することが課題となる。

### (2)詳細

#### I. LAP1-LUBAC が創出するリニアユビキチンコードの同定と生体防御応答における役割

##### A. NF- $\kappa$ B シグナル制御における役割

LUBAC は基質である RIPK1 の M1Ub 鎖修飾を介して炎症や免疫などの生体防御応答を司る転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することが知られる。本プロセスにおける LAP1 の関与を明らかにするため、ヒト胎児腎細胞(HEK293 細胞)やマウス胎児線維芽細胞(MEF)を用いて、LAP1 の発現レベルや E3 酵素活性の有無が TNF や LUBAC によって誘導される NF- $\kappa$ B シグナルにどのような影響を及ぼすか多角的に検証した。HEK293 細胞における解析の結果、LAP1 は TNF 刺激に伴い即時に LUBAC に結合し、E3 活性依存的に NF- $\kappa$ B シグナルを抑制することが明らかとなった。一方、MEF においては HEK293 細胞での表現型と異なり、LAP1 の欠損が NF- $\kappa$ B シグナルの亢進を誘導することはなかった。現在、このような組織・細胞間の応答性の差異を決定づける因子を見出しており、詳細なメカニズムについて精査を進めている。

##### B. ネクロプトーシス制御における役割

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 のユビキチン鎖形成は、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トーシス誘導時の RIPK1 のユビキチン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ユビキチン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 はユビキチン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 のユビキチン化部位変異体と 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 M1 鎖を基盤とする複合型ユビキチン鎖を形成していることが示された。そこで次に、LUBAC/LAP1 がユビキチン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 が創出する複合型ユビキチン鎖のネクロ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、本複合型ユビキチン鎖は 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 と協調してリニアユビキチンコードを創出し、ネクロトーシスを抑制していることが明らかとなった。

### C. LAP1-LUBAC が創出するリニアユビキチンコードの病態・生理学的意義

LAP1-LUBAC 依存性複合型ユビキチン鎖が生体内においてもネクロトーシスの制御に関与していることを明らかにすることを目的とし、*Lap1* 欠損マウスの解析を進めた。重要なことに *Lap1* 欠損マウスは生後 3 日以内に消化管を中心とする全身性の出血傾向と炎症を伴う新生仔致死性を示した。現在、*Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスの解析を進めており、致死性が大幅に改善されるという結果が得られつつある。このことから、*Lap1* 欠損マウスの新生仔致死性はネクロトーシスに依存する可能性が極めて高いことが示された。さらに、新生仔致死を免れ、一見正常に生育した *Lap1* 欠損成体マウスはネクロトーシスが病態形成に関与するとされる炎症性腸疾患(IBD)や敗血症モデルに脆弱であることが分かった。また、IBD TaMMA (The Inflammatory Bowel Disease Transcriptome and Metatranscriptome Meta-Analysis)によるデータベース解析を実施したところ、IBD 患者群の腸管上皮において LAP1 の発現が顕著に低下していることが判明し、ヒト疾患因子として LAP1 の臨床医学的重要性が強く示唆された。

## II. ユビキチンコードに基づく次世代細胞機能編集技術の開発と医療応用

本研究の成果より、LAP1 の LUBAC への結合が抗炎症作用を発揮する重要なステップであることが推察される。そこで、ユビキチンコードに基づく細胞機能制御を可能とする化学的アプローチとして LAP1 と LUBAC の結合安定化を作用機序とする抗炎症剤の開発を目指し、AlphaScreen 法を用いた低分子及び中分子化合物のスクリーニングを実施した。一次スクリーニングにて想定以上のヒット化合物(40%以上の安定化効果を有する化合物 32 種、40%以上の阻害効果を有する化合物 34 種)が得られた。そこで、企業化連携サポートにより二次スクリーニングを実施し、化合物の濃度依存性(N=4, 5 濃度(26.6, 13.3, 6.7, 3.3, 1.7 μM))の検証とカウンターアッセイにて偽陽性を排除した。その結果、結合安定化効果を示す化合物の同定には至らなかったが、結合阻害効果を示す化合物を4種同定することに成功した。

### 3. 今後の展開

#### I. LAP1-LUBAC が創出するリニアユビキチンコードの同定と生体防御応答における役割

ヘテロな連結様式を有する複合型ユビキチン鎖は、最近様々な修飾様式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 依存性の複合型ユビキチン鎖に着目し、LAP1 とのクロストークによる複雑なユビキチン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も示唆された。そのため、今後は本研究において見出されたリニア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最も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、*Lap1* 欠損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現に RIPK1 の複合型ユビキチン鎖が機能しているか検証を進める予定である。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計画である。本成果により、複合型ユビキチン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その致死性を決定づけるものと想定される。本成果が新生児敗血症などヒト新生児疾患のメカニズムの解明に繋がることが期待される。

#### II. ユビキチンコードに基づく次世代細胞機能編集技術の開発と医療応用

本研究では、炎症シグナルにより惹起される LAP1 と LUBAC の PPI を安定化することで炎症局所特異的にリニアユビキチンコードを持続生成し、抗炎症効果を発揮する化合物の探索を実施した。現在のところ、当該化合物の取得には至っていないが、両標的分子の三次元構造に基づく化合物の理論設計や進化分子工学を駆使した双極性の人工結合蛋白質(モノボディ)・ペプチドなどを利用することで実現可能となるかもしれない。一方で、LAP1 は LUBAC に結合し、ユビキチン修飾競合にて NF- $\kappa$ B 活性化を抑制する可能性を見出した。従って、同定した PPI 阻害化合物は、NF- $\kappa$ B 活性化を促進することが期待でき、NF- $\kappa$ B 活性化不全に基づく自己炎症性疾患や免疫不全症に対する治療薬として応用できる可能性がある。そこで今後は、培養細胞レベルにてヒット化合物の PPI 阻害効果を確認し、NF- $\kappa$ B 活性化を促進可能であるか多角的に評価することで応用性の適否について検討を進めることが課題である。

### 4. 自己評価

研究課題を推進するにあたり、進捗状況に応じて「選択と集中」を実施し、目的達成への長期・中期・短期的なマイルストーンを立てることで計画的で効果的な研究経費の執行に努めることができた。

本研究課題の当初の目的に則り、リニアユビキチンコードの生体防御応答における役割として、特にネクロプトーシス制御における複合型ユビキチン鎖の機能と動作原理を明らかにすることができ、さらに疾患との連関も明らかになりつつある。特に、今後 LAP1 の IBD における

病態生理学的意義が明確になれば、基礎生命科学・臨床医学分野への高い波及効果が期待できる。

本成果について、日本 Cell Death 学会(2023 年 7 月)でベストプレゼンテーション賞を、Japan and Australia Meeting on Cell Death (2023 年 8 月)で最優秀ポスター発表賞を受賞しており、日本分子生物学会シンポジウム(2023 年 12 月)では本課題が指定講演に選定された。対外的な評価も鑑み、特に細胞死研究領域において新規性とインパクトが高く評価されていると考えている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のは件数にのみ含む)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会発表

1. 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 Lin, 小迫 英尊, 高橋 宏隆, 澤崎 達也, 徳永 文稔. 第 45 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)
2. 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)
3. 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(口頭発表)
4. 新規 LUBAC 結合タンパク質による細胞死制御機構の解析. 清水 康平, 魏 民, Tran Thi Thuy Lin, 及川 大輔, 小迫 英尊, 高橋 宏隆, 澤崎 達也, 徳永 文稔. 第 45 回 日本分子生物学会年会 2022 年 11 月 30 日(ワークショップオーガナイザー、口頭発表)
5. 第 44 回 日本分子生物学会年会 2021 年 12 月 3 日. A novel LUBAC-associated protein regulates NF- $\kappa$ B activation, apoptosis and necroptosis pathways. 清水 康平, Tran Thi Thuy Linh, 及川 大輔, 小迫 英尊, 高橋 宏隆, 澤崎 達也, 徳永 文稔(ポスター発表)

#### 受賞

1. The 3rd Japan and Australia Meeting on Cell Death (JAM2023) 1st Prize Poster Presentation. 演題「LUBAC and its associated ubiquitin ligase generate heterotypic ubiquitin chains to inhibit necroptosis」(メルボルン、2023 年 8 月 17 日)
2. 第 31 回日本 Cell Death 学会 ベストプレゼンテーション賞. 演題「新規 LUBAC 結合 E3 に

公開

よる複合型ユビキチン鎖形成を介したネクロトーシスの制御」(東京、2023年7月16日)