The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Suppression of LUBAC-mediated linear ubiquitination by a specific interaction between LUBAC and the deubiquitinases CYLD and OTULIN
Author(s)	瀧内, 剛
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34236
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	瀧内　剛
論文題名 Title	Suppression of LUBAC-mediated linear ubiquitination by a specific interaction between LUBAC and the deubiquitinases CYLD and OTULIN （脱ユビキチン化酵素CYLD, OTULINはLUBACとの結合を介してLUBACによる直鎖状ユビキチン化を抑制する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

ユビキチン修飾系は可逆的な翻訳後修飾系として、様々な生命制御機構を調節している。状況に応じて、ユビキチンリガーゼ(E3)は標的タンパク質にユビキチン鎖を付加し、脱ユビキチン化酵素（DUB）はユビキチン鎖を分解することにより、ユビキチン修飾反応を厳密に制御している。HOIP, HOIL-1L, SHARPINの3者からなるE3であるLUBACは、直鎖状ユビキチン鎖（直鎖）を特異的に生成する、古典的NF-κB活性化経路に必須の分子であり、最近ではWnt経路への関与も報告されている。しかし、直鎖生成を調節する機序については不明であった。LUBACには複数のdomainが存在し、その多くの機能は判明している。LUBACの活性中心をもつHOIPのN末端には、種を越えて広範囲に保存されているPUB domainが存在し、AAA ATPaseであるVCPが結合するdomainとして知られているが、その機能はまだ解明されていない。そこで、本研究においてはHOIPのPUB domainの機能解析を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

脱グリコシル化酵素PNGaseは、代表的なPUB domain含有タンパク質であり、VCPと結合するアミノ酸部位も同定されている。同アミノ酸と相同性のあるHOIPのアミノ酸をアラニンに置換したHOIP N84A/Y93Aを作成しVCPと結合しないことを免疫沈降法で確認した。HEK293T細胞にHOIPまたはHOIP N84A/Y93AとHOIL-1L, SHARPIN（LUBAC WTまたはLUBAC N84A/Y93A）を過剰発現させたところ、LUBAC N84A/Y93Aでは直鎖量が激増していた。質量分析法によってHOIPのPUB domainに、直鎖とK63鎖を分解できるDUBであるCYLDと、直鎖を特異的に分解するDUBであるOTULINが結合していることが判明した。不死化したマウス胎児繊維芽細胞(MEF)にて、HOIPとCYLD, OTULINの内在性の結合を確認した。結合部位を検討するため、CYLD, OTULINのtruncate mutantを作成し、HEK293T細胞にHOIPのPUB domainと共発現させ免疫沈降法を行ったところ、CYLDはC末端(782-952)、OTULINはN末端(1-105)を介してPUB domainと結合していることが判明した。同部位のタンパク質を精製し結合実験を行ったところ、VCP非存在下でも結合は確認された。不死化したHOIPノックアウトMEFに、HOIPまたは、HOIP N84A/Y93Aをレトロウイルスで入れ戻した細胞(MEF WTまたはMEF N84A/Y93A)を作成した。両細胞をコントロール, CYLD, OTULINそれぞれのsiRNAによりノックダウン(KD)したうえで、HOIPで免疫沈降し、*in vitro* Ub assayを行った。MEF N84A/Y93Aでの直鎖生成能はMEF WTより亢進していた。MEF WTではCYLD, OTULIN両方をKDすると、コントロールに比べ直鎖生成能が亢進し、MEF N84A/Y93Aと同程度にまで増加した。MWF N84A/Y93AではCYLD, OTULINをKDしても直鎖生成能に変化はなかった。よって、CYLD, OTULINはPUB domainへの結合を介して、VCP非依存的に、相乗的にLUBACによる直鎖生成を抑制していることが示された。PUB domainへのCYLD, OTULINの結合は、未刺激状態から認められ、TNF-α刺激によっても結合状態は変化しなかった。MEF N84A/Y93Aでは、TNF-α刺激により誘導される、HOIPのTNF受容体へのrecruit、IKK2のリン酸化、NEMOの直鎖化、ＩκＢαの分解、NF-κB標的遺伝子発現の、いずれも亢進しており、NF-κB活性化が促進していることが確認された。以上より、LUBACとCYLD, OTULINの結合は、直鎖生成を調整することにより、TNF-α刺激下のNF-κB活性化を制御していると考えられた。また、ルシフェラーゼアッセイでは、OTULINはHOIPと結合することにより、LUBACによる古典的Wnt経路の抑制を緩和していることも判明した。

〔総　括(Conclusion)〕

HOIPのPUB domainはCYLD, OTULINとの結合を介して、直鎖生成を調整することにより、古典的NF-κB活性化経路や古典的Wnt活性化経路を制御していることを示した。本研究は、E3/DUB結合による直鎖生成を調節する機序を明らかにし、TNF-α誘導性NF-κB活性化経路の分子制御機構の一端を示しただけではなく、LUBACが関与する他のシグナル伝達経路もPUB domainを介して制御されている可能性も示唆している。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

瀧内　剛			
論文審査担当者		（職）	氏　　名
	主　査	大阪大学教授	本庄　正
	副　査	大阪大学教授	菊池章
	副　査	大阪大学教授	吉森　保

論文審査の結果の要旨

ユビキチン修飾系は可逆的な翻訳後修飾系として、様々な生命制御機構を調節している。細胞周囲の状況に応じて、ユビキチンリガーゼ(E3)は標的タンパク質にユビキチン鎖を付加し、脱ユビキチン化酵素（DUB）はユビキチン鎖を分解することにより、ユビキチン修飾反応を厳密に制御している。本論文では、古典的NF-κB活性化経路に必須の分子であり、直鎖状ユビキチン鎖（直鎖）を特異的に生成するE3であるLUBACの構成分子であるHOIPのPUB domainに、DUBであるCYLD, OTULINが結合し、LUBACの直鎖生成を恒常的に抑制し、古典的NF-κB活性化経路を制御していることを示した。古典的NF-κB活性化経路は、様々な生命反応を調節しており、その制御機構の解明は、多くの疾患の治療に寄与する可能性がある。よって、本研究は学位に値するものと認める。