The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Sharpin is a component of the NF-κB activating linear ubiquitin chain assembly complex
Author(s)	中川, 朋子
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58161
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

【37】

氏　　名	中　川　朋　子（なか　がわ　とも　こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４３５９　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学　位　論　文　名	Sharpin is a component of the NF-κB activating linear ubiquitin chain assembly complex （SharpinはNF-κBを活性化する直鎖型ユビキチンリガーゼの構成因子である）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　岩井　一宏 （副査） 教　授　菊池　　章　　教　授　米田　悦啓

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

直鎖状ポリユビキチン鎖はNF-κBの活性化に必須な翻訳後修飾であり、HOIL-1LとHOIPの２つのタンパク質から構成されるユビキチンリガーゼLUBAC(linear ubiquitin chain assembly complex)によって生成されると考えられていた。NF-κBの活性化に必須な分子のノックアウトマウスは胎生致死なのに対し、LUBACの構成成分の1つであるHOIL-1Lの欠損マウスは成獣まで生存する。これはHOIL-1L欠損細胞ではLUBACの活性中心であるHOIPの発現が低下するものの完全には消失しないことに起因すると考えられる。HOIL-1L欠損細胞でHOIPが残存する理由として、HOIPと結合するタンパク質がHOIL-1L以外にも存在する可能性を考え、データベースからHOIL-1LのN末端部と高い相同性もつSharpinを見出した。上記を踏まえ本研究では、SharpinとHOIL-1L、HOIPの相互作用および直鎖状ポリユビキチン鎖を形成への関与、生理学的・病理学的役割について解析を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

SharpinはC末端部にHOIL-1LのN末端部に存在するユビキチン様ドメイン（UBL）と相同なドメインを持つ。HOIL-1LはUBLを介してHOIPと結合することから、SharpinもHOIPと結合するのではないかと考え、HEK293T細胞にSharpinまたはHOIPのドメイン欠損タンパク質を発現させ、免疫沈降で結合ドメインを特定したところ、ShrapinのUBLドメインとHOIPのUBAドメインを介してHOIPと複合体を形成することがわかった。そこで、生体内で同複合体の存在を調べるために、内在性のSharpinタンパク質の免疫沈降を行ったところ、HOIPのみならずHOIL-1Lも共沈降した。Sharpin、HOIL-1L、HOIPを過剰発現させた細胞のライセートの抗HOIL-1L沈降産物を抗HOIP抗体で免疫沈降したところ、Sharpinの共沈降が見られた。したがって、LUBACは生体内でSharpin/HOIP/HOIL-1Lの3者複合体とし存在していることが示唆された。

最近、Sharpinは慢性皮膚炎等の多彩な症状を示す自然変異マウスであるcpdmマウスの責任遺伝子であることが報告された。そこで、cpdmマウス由来のMEF細胞を用いて刺激依存的なNF-κB活性への影響を検討したところ、TNF-α依存的なIκBαのリン酸化、分解の減少、p65の核内移行の遅延が観察され、NF-κBの活性化は減弱しているが完全には消失していなかった。Sharpinが欠損したcpdm由来MEFではHOIP、HOIL-1Lの発現が低下するものの完全には消失していなかった。そこで、cpdm由来MEFにSharpinを発現させたところ、HOIPとHOIL-1Lの発現が増加し，NF-κBの活性化が増強した。さらに、cpdm細胞でHOIL-1Lをノックダウンさせたところ、HOIPの発現もほぼ完全に消失するとともに、IκBαの分解がほぼ完全に抑制された。したがって、Sharpinの欠損によりLUBAC複合体が不安定化し、HOIP、HOIL-1Lの発現が低下することで、NF-κBの活性化能が減弱するが、完全には消失しないことでcpdmマウスの症状が発現することが示唆された。

NF-κBの活性化機構にはIκBαの分解が関与する古典的経路のみならず、NF-κB2(p100)のプロセシングが関与する非古典的経路が知られている。CD40は両方の経路を活性化するので、cpdmマウスの脾臓B細胞を抗CD40抗体で刺激したところ、古典的経路によるNF-κBの活性化は減弱していたが、非古典的なNF-κBの活性化は減弱していなかった。それゆえ、LUBACによる直鎖状ポリユビキチン鎖形成は古典的経路によるNF-κB活性化に選択的に関与することが示唆された。

〔　総　　括　〕

Sharpinは生体内でHOIL-1L/HOIPとともに直鎖状ポリユビキチン鎖を形成するLUBACリガーゼの新たな構成因子であり、古典的経路によるNF-κB活性化に関与すること、Sharpinの欠損によりLUBACの発現が低下することで慢性皮膚炎などのcpdmマウスの多彩な症状が発現すると考えられた。それゆえ、直鎖状ポリユビキチン化はNF-κBの活性化の中核を担う翻訳後修飾系であり、その異常は種々の疾患に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

直鎖状ポリユビキチン化はNF-κBの活性化に必須な翻訳後修飾である。これまで、直鎖状ポリユビキチン鎖はHOIL-1LとHOIPの2つのタンパク質から構成される複合体よって生成されると考えられていたが、新たな構成因子としてSharpinを同定した。このSharpin、HOIL-1L、HOIPから構成されるLUBAC(linear ubiquitin chain assembly complex) ユビキチンリガーゼ複合体が刺激依存的にIKK複合体のNEMOを直鎖状ポリユビキチン化することでNF-κBを活性化することを明らかにした。また、Sharpinは慢性皮膚炎、種々の免疫異常をはじめとして多彩な症状を示すcpdmマウスの責任遺伝子である。Sharpinの欠損により、LUBACの他の構成成分であるHOIL-1L、HOIPの発現は低下するが、完全には消失しないこと、その結果、NF-κBの活性化は減弱するが、完全には抑制されないことで、cpdmマウスの多彩な症状が引き起こされることを明らかにした。

これらの知見はLUBACによる直鎖状ユビキチン鎖の生成は、NF-κBの活性調節を介して種々の疾患の病態と関連する可能性が示唆するものである。

以上より、本研究は学位の授与に値すると考えられる。