

博士論文

直鎖状ポリユビキチン鎖生成酵素 LUBAC の  
阻害剤探索および gliotoxin による  
NF- $\kappa$ B 活性化阻害機構の解明

東京大学 大学院薬学系研究科  
薬科学専攻 薬品代謝化学教室  
坂本 裕樹

## 目次

第1章 序論	p. 3
第2章 LUBAC 阻害剤探索のためのスクリーニング系の構築	p. 13
第3章 LUBAC 阻害剤スクリーニングの実施	p. 34
第4章 Gliotoxin の <i>in vitro</i> における検討	p. 42
第5章 Gliotoxin の細胞への応用	p. 54
第5章 総括と今後の展望	p. 69
実験の部	p. 74
参考文献	p. 85
発表論文	p. 93
謝辞	p. 94

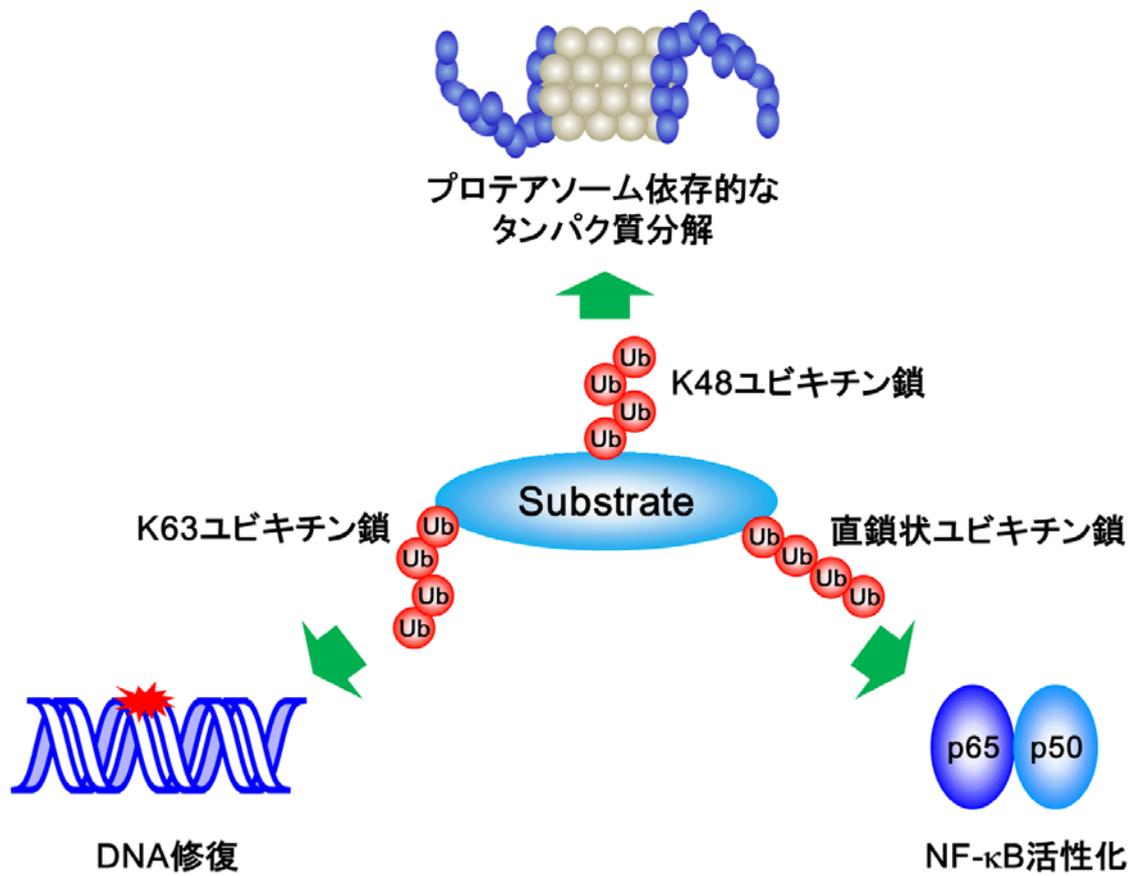
# 第 1 章

## 序論

## 第1節 ユビキチン

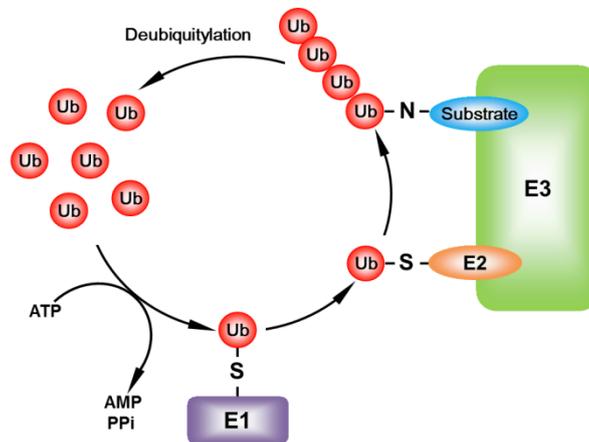
ユビキチンは全ての真核生物に存在する 76 アミノ酸から構成される小球状タンパク質である。ユビキチンは基質タンパク質に結合することでプロテアソーム依存的な分解に導く因子としてよく知られているが<sup>1</sup>、近年の研究より、ユビキチンの機能はタンパク質の分解のみならず、多彩な様式でタンパク質の機能を調節することで、様々な生命現象の制御系として機能を発揮することが示されている<sup>2</sup>。ユビキチンは多くの場合、ユビキチンのポリマーであるポリユビキチン鎖としてタンパク質に結合することでその機能を制御すると考えられている。ユビキチンは分子内に 7 個のリジン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) を有しており、これらのリジン残基のいずれかの $\epsilon$ -アミノ基と、他のユビキチンの C 末端のカルボキシ基とのイソペプチド結合によりポリユビキチン鎖が形成され、いずれのリジン残基を介するかによりタンパク質の制御様式が異なる<sup>3</sup>。先に述べたタンパク質分解に関与するポリユビキチン鎖は主に K48 を介するものであり、このようなユビキチン化を受けたタンパク質はプロテアソームに認識され、その結果として分解に至る (**Figure 1-1-1**)。また、この他に機能がよく知られるポリユビキチン鎖には K63 ユビキチン鎖が挙げられ、K63 鎖は DNA の修復などの様々なシグナル伝達に関与することが報告されている<sup>4</sup>。

このように、ユビキチンの機能はその形態により挙動が異なるということがわかっているが、近年の研究により直鎖状ポリユビキチン鎖と呼ばれる上述の 7 種のポリユビキチン鎖とは一線を画するものが 2006 年に報告された<sup>5</sup>。直鎖状ポリユビキチン鎖は、リジン残基の $\epsilon$ -アミノ基ではなく、N 末端のメチオニン残基の $\alpha$ -アミノ基とのペプチド結合により形成されるポリユビキチン鎖であり、がんやアレルギー等の疾患に関与すると考えられている転写因子 NF- $\kappa$ B の活性を正に制御することが示されている<sup>6</sup>。



**Figure 1-1-1.** Schematic representation of polyubiquitylation of substrate protein. The function of polyubiquitin chain depends on the variety of linkage types of polyubiquitin chains.

ユビキチン鎖形成は E1 (ユビキチン活性化酵素), E2 (ユビキチン結合酵素), E3 (ユビキチンリガーゼ) の 3 種類の酵素により触媒される (Figure 1-1-2)<sup>1)</sup>。まずは ATP のエネルギーを利用して E1 にユビキチンがチオエステル構造を介して結合し、それによって活性化されたユビキチンは引き続き E2 に受け渡される。そして最後に E3 によって E2 上のユビキチンが標的タンパク質に結合することで反応が完結する。ヒトでは 30-50 の E2 が、E3 においては 600 を超える種類が同定されており、これらの組み合わせによりユビキチン鎖の結合様式が規定されることが知られている<sup>7)</sup>。



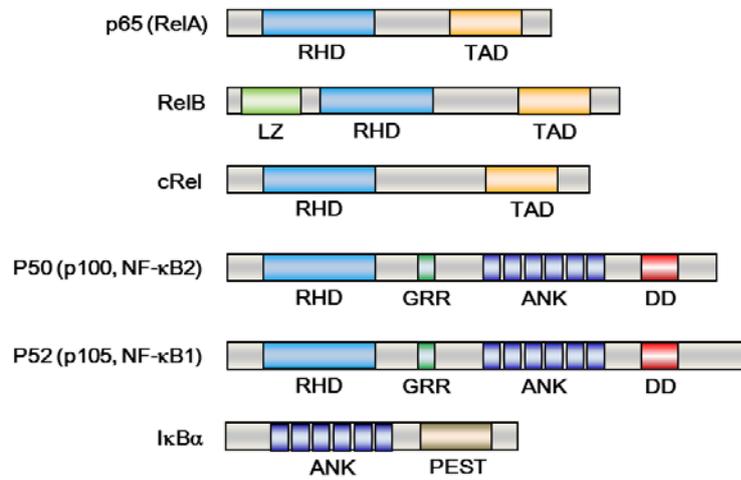
**Figure 1-1-2.** Schematic representation of ubiquitylation reaction catalyzed by 3 enzymes E1, E2 and E3.

## 第2節 転写因子 NF- $\kappa$ B

先にも述べた通り、NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor of  $\kappa$ B) とは転写因子の一種であり、感染、紫外線をはじめとした様々な刺激により活性化され、炎症性サイトカインや細胞増殖、細胞死抑制因子などの遺伝子の転写を促進させる働きを持つ<sup>8</sup>。このように、NF- $\kappa$ B は様々なストレスから体を守る上で欠かせない因子である一方で、その異常活性化はアレルギーやがんの原因となることも知られている<sup>9</sup>。そのため、NF- $\kappa$ B は現在創薬ターゲットとしても多くの研究者の注目を集めている。

### NF- $\kappa$ B の構造

NF- $\kappa$ B は、Rel homology domain (RHD) を N 末端側に共通して持つ Rel ファミリータンパク質がホモあるいはヘテロ二量体を形成して存在する転写因子群の総称であり (Figure 1-2-1)、その Rel ファミリーとしては p65 (RelA), RelB, cRel, p50, p52 の 5 種類が知られている<sup>10</sup>。また、p65, RelB, cRel は DNA と結合して転写を促進することができる TAD (transactivation domain) を有しているが p50, p52 はそれを持たないため、ほとんどの場合において p50, p52 は TAD を有する p65, RelB, c-Rel とヘテロ二量体を形成して存在する。未刺激の状態では、NF- $\kappa$ B は I $\kappa$ B (Inhibitor of  $\kappa$ B) と呼ばれるタンパク質と結合することによって不活性型として細胞質内に局在している。



**Figure 1-2-1.** Members of the NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins. The domains that typify each protein family are indicated. RHD, Rel homology domain; TAD, transactivation domain; LZ, leucine-zipper; GRR, glycine rich region; ANK, ankyrin-repeat; DD death domain; PEST, proline-, glutamic acid-, serine, and threonine rich.

## NF- $\kappa$ Bの活性化機構

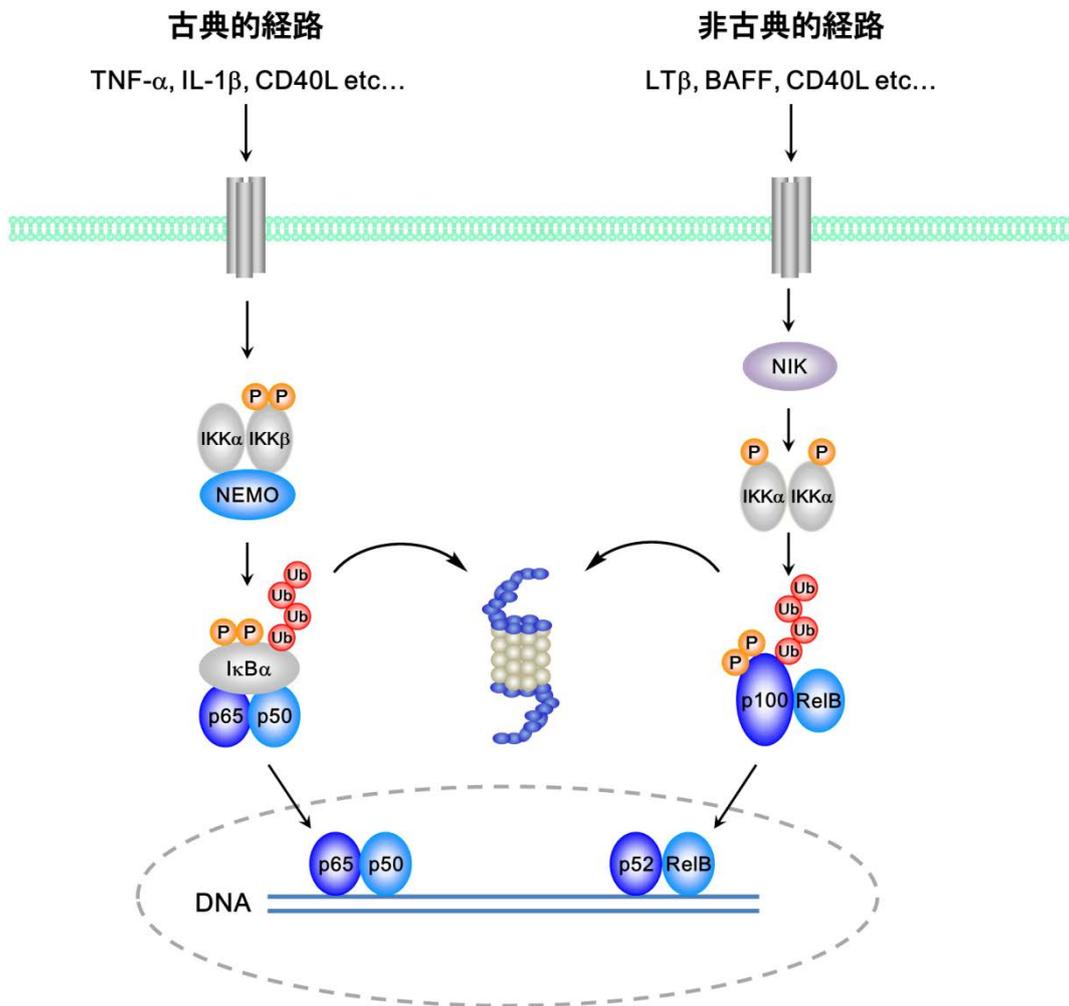
I $\kappa$ Bs と結合することで不活性化されている NF- $\kappa$ B が刺激依存的に活性化される機構は、以下の 2 通りに大別される。(Figure 1-2-2)<sup>11</sup>。

### 1) 古典的経路

種々の刺激により IKK $\alpha$  (I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ ), IKK $\beta$ , NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator, IKK $\gamma$ ) の 3 者のタンパク質から構成される IKK 複合体が活性化され、I $\kappa$ B $\alpha$  をリン酸化する。その結果として、I $\kappa$ B $\alpha$  に K48 を介するポリユビキチン鎖が付加され、26S プロテアソームによって分解される。I $\kappa$ B $\alpha$  から解放された NF- $\kappa$ B は核内へ移行することができるようになり、DNA と結合することで種々の遺伝子の転写を促進する。

### 2) 非古典的経路

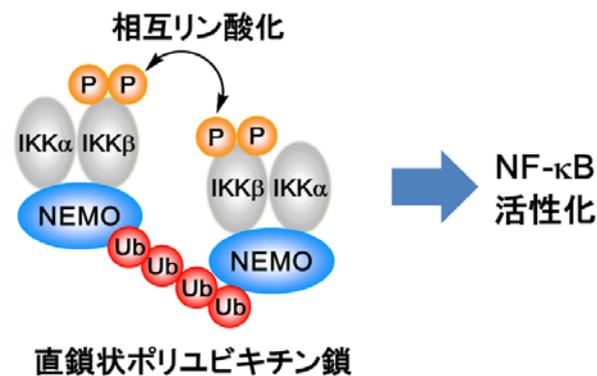
未刺激の状態では恒常的に分解されている NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) が、種々の刺激依存的に安定化することで活性化され、ホモ二量体を形成している IKK $\alpha$  をリン酸化する。その結果、IKK $\alpha$  が活性化され、次いで p100 (NF- $\kappa$ B2), RelB から構成される NF- $\kappa$ B の p100 をリン酸化する。続いて、p100 は K48 ユビキチン化され、プロテアソームにより限定的に分解されることで p52 となる。これにより、活性型となった二量体は核内へ移行し、様々な遺伝子を転写する。



**Figure 1-2-2.** Schematic representation of canonical and non-canonical NF-κB activation pathways. The canonical pathway is activated by a variety of inflammatory signals such as TNF-α, IL-1β and CD40L. The non-canonical pathway is activated by LTβ, BAFF and CD40L. Expression of multiple inflammatory genes is induced by binding of NF-κB to DNA.

### 直鎖状ポリユビキチン鎖の NF- $\kappa$ B 活性化への関与

種々の刺激依存的に、前項で記述した IKK complex の構成因子である NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖が付加されることで、古典的経路を介して NF- $\kappa$ B が活性化される<sup>6</sup>。直鎖状ポリユビキチン鎖による NF- $\kappa$ B 活性化の機構は、**Figure 1-2-3** のように考えられている。NEMO は直鎖状ポリユビキチン化の基質となるばかりでなく、直鎖状ポリユビキチン鎖に高い親和性を有する分子としてもよく知られている<sup>12</sup>。そのため、TNF- $\alpha$  や CD40L などの様々な刺激により NEMO が直鎖状ポリユビキチン化を受けると、NEMO に結合した直鎖状ポリユビキチン鎖は他の IKK 複合体の NEMO に認識される。これにより、IKK complex 同士が近接し、IKK $\beta$  が二量体化することで互いにリン酸化し、活性化に至ると考えられている<sup>13</sup>。そして、活性化された IKK $\beta$  は NF- $\kappa$ B の阻害タンパク質である I $\kappa$ B $\alpha$  にリン酸化を施し、I $\kappa$ B $\alpha$  のプロテアソーム依存的な分解、そしてそれに次ぐ NF- $\kappa$ B の活性化へと導く<sup>8</sup>。



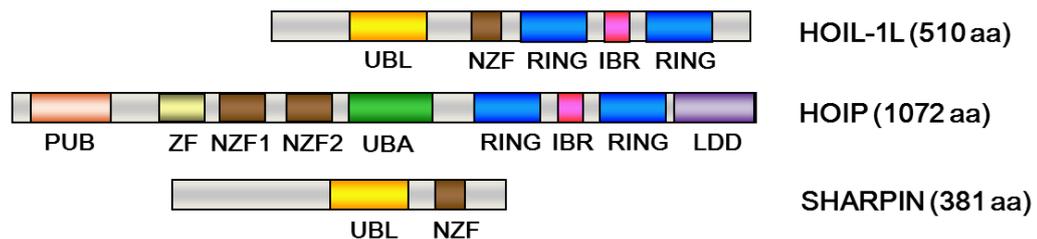
**Figure 1-2-3.** Schematic representation of linear ubiquitin chain-mediated NF- $\kappa$ B activation. Upon ligand stimulation, NEMO is linear ubiquitylated. Linear ubiquitin chains conjugated to NEMO are recognized by NEMO *in trans* on another IKK complex. Then, autophosphorylation of IKK $\beta$  is induced by multimerization of the IKK complexes.

### 第3節 直鎖状ポリユビキチン鎖生成酵素 LUBAC

NF- $\kappa$ B の活性化に重要な役割を果たす直鎖状ポリユビキチン鎖は、ユビキチン E3 の一種である LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) に触媒されることが知られており (Figure 1-3-1)<sup>5</sup>、LUBAC 以外の直鎖状ポリユビキチン鎖を生成する酵素は未だ報告されていない。LUBAC は、HOIP, HOIL-1L, SHARPIN の3者のタンパク質より構成される分子量およそ 600 kDa の複合体であり<sup>14-16</sup>、HOIP の RING-IBR-RING-LDD ドメインが酵素活性中心を担っている<sup>5, 17</sup>。3者は UBA, UBL ドメイン間の相互作用により結合しており、また、HOIP の NZF1 ドメインや HOIL-1L が LUBAC の基質タンパク質である NEMO の認識に必要であると考えられている<sup>5, 13, 14, 18</sup>。

以上のような機能を有することから、LUBAC 活性の亢進は活性化 B 細胞様びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma; ABC-DLBCL) や、転移がんの定着の段階、そして抗がん剤 cisplatin への耐性の獲得など、様々な疾患に関与することを示唆する報告がなされている<sup>19-21</sup>。

## LUBAC



**Figure 1-3-1.** Schematic representation of LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex). The domains that typify each protein family are indicated. UBL, ubiquitin like; NZF, Npl4 zinc finger; RING, really interesting new gene; IBR, in between RING; PUB, peptide N-glycosidase/ubiquitin-associated; ZF, zinc finger; UBA, ubiquitin-associated; LDD, linear ubiquitin chain determining domain.

#### 第4節 本研究の目的

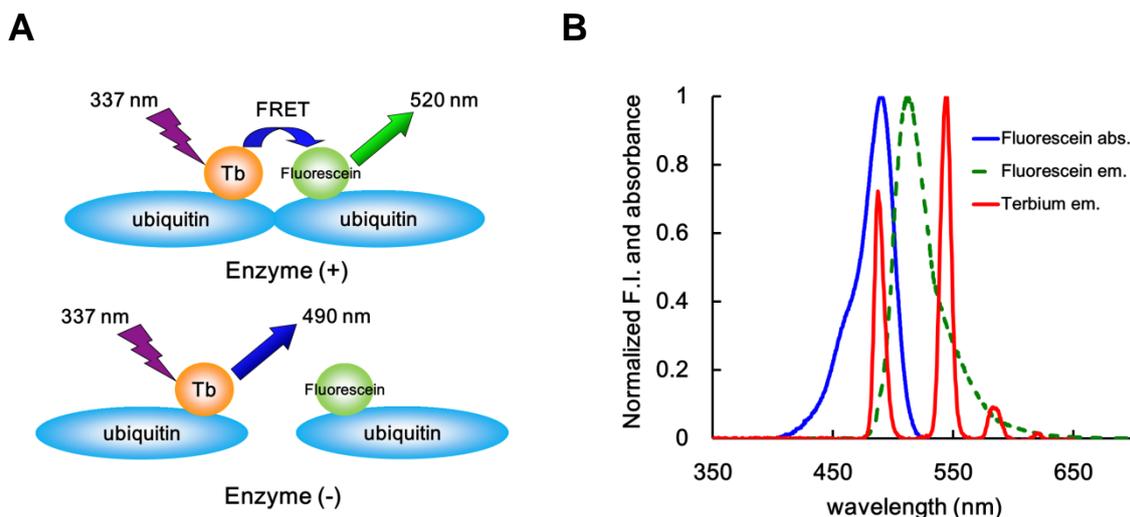
前節までに述べた事実を踏まえると、LUBAC が有する直鎖状ポリユビキチン鎖の生成能はがんやアレルギーなどの様々な疾患と関与していると考えられるため、LUBAC はこれらの疾患の治療のための良好な創薬標的となることが期待される。加えて、LUBAC はその存在が認められてからまだ日も浅く、その機能や生理的な意義についても不明な点が多い。そのため、LUBAC の選択的な阻害剤は、疾患の治療や LUBAC の機能解明のためのツールとしても非常に有用なものとなることが強く期待される。以上より、本研究の目的は LUBAC の阻害剤を開発することとし、本学創薬オープンイノベーションセンターが保有する大規模化合物ライブラリーを利用することにより、目的の化合物を見出すことを目指した。今日までに、未だ LUBAC の選択的な阻害剤の報告はなされていないため、本研究には大きな意義があると考えられる。

## 第 2 章

# LUBAC 阻害剤の探索のための スクリーニング系の構築

## 第1節 阻害剤スクリーニングの戦略

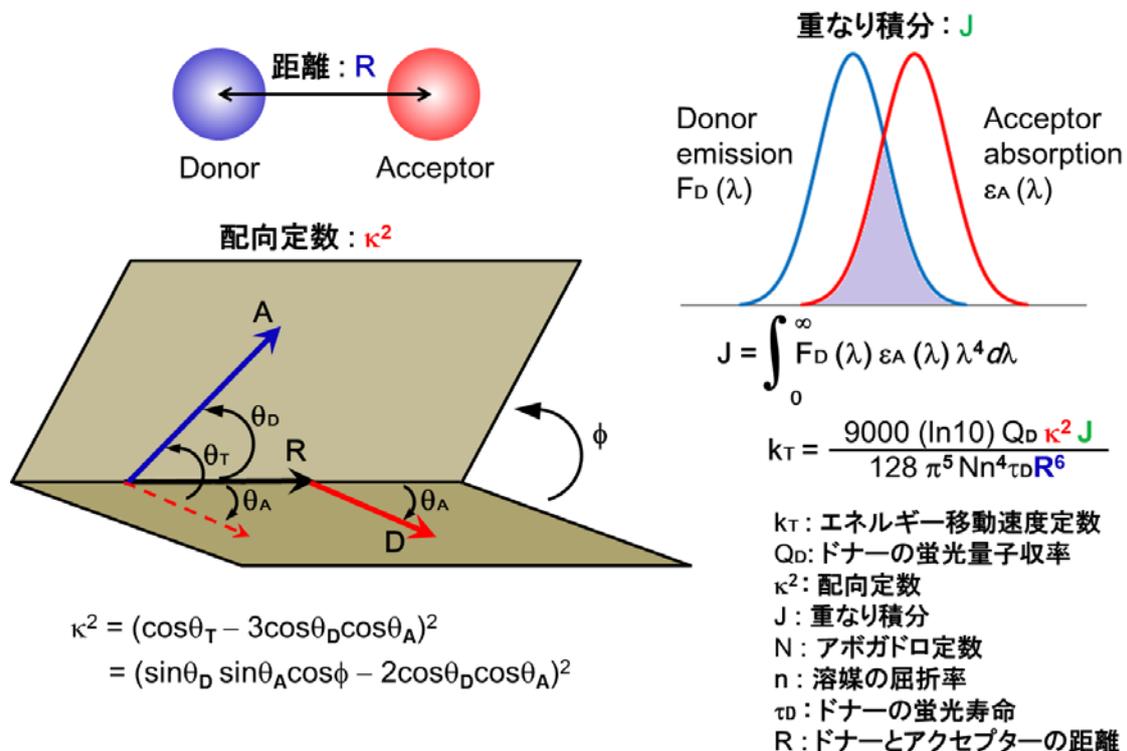
LUBACの阻害剤を見出すべく、FRET (Förster Resonance Energy Transfer) を検出原理とするスクリーニング系の構築を目指した (Figure 2-1-1A)。具体的にはFRET donor と acceptor のそれぞれをラベル化したユビキチンを用いてLUBACの酵素反応を行うものであり、この評価系においては酵素反応によりユビキチン鎖が伸長した際にはdonorの励起光照射後、acceptorの蛍光が強く観測されることが期待され、これによりLUBACの酵素活性を評価することが可能となると考えられる<sup>22,23</sup>。本スクリーニングにおいてはFRET donor, acceptorとしてそれぞれTb<sup>3+</sup>錯体、fluoresceinを用いた。Tb<sup>3+</sup>錯体の発光スペクトルとfluoresceinの吸収スペクトルには良好な重なりがあるばかりでなく (Figure 2-1-1B)、Tb<sup>3+</sup>などの希土類金属錯体から放たれる発光は一般的な蛍光小分子に比して圧倒的に長い発光寿命を有する (蛍光小分子の蛍光寿命がナノ秒オーダーであるのに対し、希土類金属錯体ではミリ秒オーダー) ため、時間分解蛍光法 (後述) を用いることでノイズを低く抑えた精度の高いスクリーニングを行うことができると期待される。



**Figure 2-1-1.** (A) High-throughput screening strategy for identification of LUBAC inhibitor based on time-resolved FRET. (B) Absorption and emission spectra of terbium chelate and fluorescein. There is a large overlap between emission spectrum of terbium chelate and absorption spectrum of fluorescein.

## FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

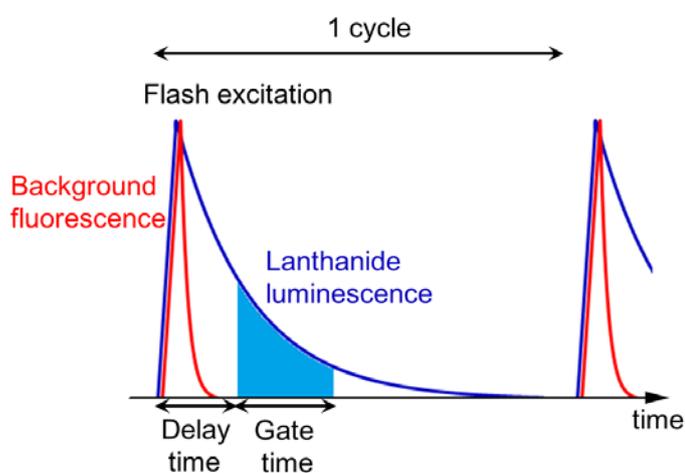
蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster Resonance Energy Transfer: FRET) とは 2 種の (蛍光) 色素が存在し、かつ片方の蛍光色素 (donor) の蛍光スペクトルと他方の色素 (acceptor) の吸収スペクトルに良好な重なりが見られる場合に、励起された donor のエネルギーが無輻射的に acceptor に移動することを指す。このエネルギー移動速度定数  $k_T$  は Förster の式で表されるように donor-acceptor 間の距離、donor の蛍光スペクトルと acceptor の吸収スペクトルの重なり積分、donor と acceptor の双極子モーメントの配向定数等に依存する (Figure 2-1-2)<sup>24</sup>。特に、donor-acceptor 間の距離の変化は FRET 効率の変化として検出しやすく、生化学等の分野で FRET を用いた距離や構造の解析が多くなされている<sup>25</sup>。



**Figure 2-1-2.** Förster theory. Rate constant of energy transfer,  $k_T$  depends on orientation factor, spectral overlap between donor's fluorescence and acceptor's absorption and distance between donor and acceptor.

## 時間分解蛍光法

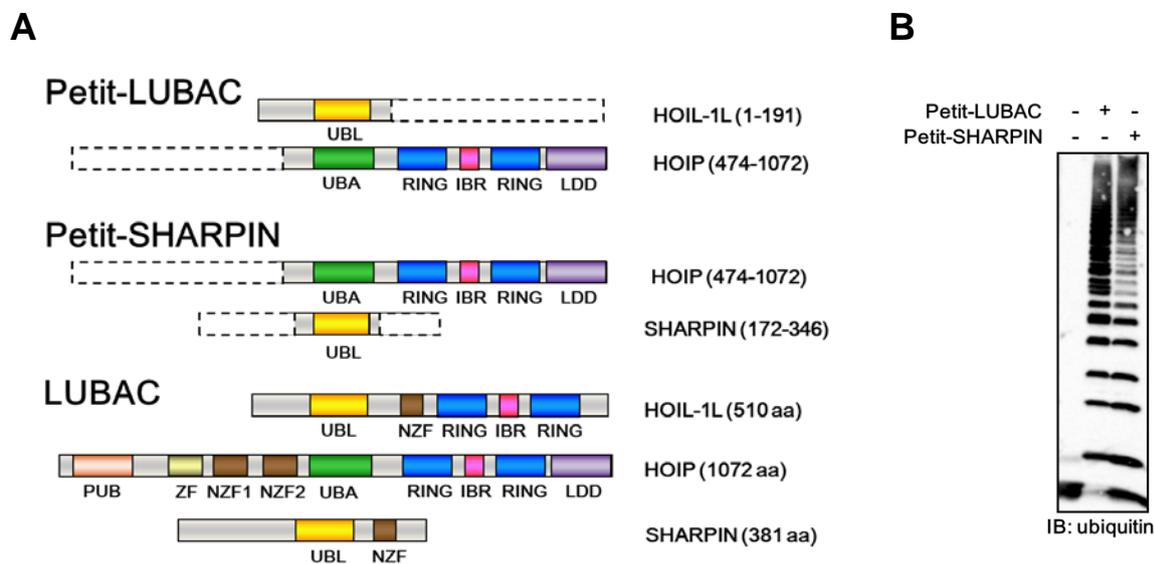
時間分解蛍光法とは、対象の試料にパルス励起光を照射し、一定の **delay time** の経過の後に蛍光測定を開始することで寿命の短い蛍光が排除され、長い寿命を持つ蛍光物質由来のシグナルのみが得られる手法である。これにより、スクリーニング時において被検化合物自身の蛍光や、系中に含まれる他の蛍光物質によるバックグラウンドの排除が可能となり、高い S/N や信頼性などを得られるようになる<sup>26</sup>。



**Figure 2-1-3.** Schematic representation of time-resolved fluorometric measurements. Samples are excited with short light-pulse, and after a delay time, measurements are started so that background fluorescence will be reduced.

## Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN

大規模な化合物スクリーニングを行うためには大量の酵素を必要とするが、LUBACは大腸菌を用いて大量に発現・精製することが困難であったため（昆虫細胞を用いれば、量は少ないが精製は可能）、代替手段として直鎖状ポリユビキチン鎖を生成可能な LUBAC の部分配列から構成される Petit-LUBAC および Petit-SHARPIN を用いることとした (Figure 2-1-4A)。LUBAC は HOIP, HOIL-1L, SHARPIN の 3 者から構成される複合体であるが、ここで用いる Petit-LUBAC は HOIP と HOIL-1L の 2 者、Petit-SHARPIN は HOIP と SHARPIN の 2 者から構成され、さらに酵素活性とは直接的な関係がないドメインを truncate した複合体であり、これらはいずれも直鎖状ポリユビキチン鎖生成能を有している (Figure 2-1-4B)<sup>27</sup>。これに加え、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN は大腸菌を用いて容易に大量に発現・精製することが可能であったため、これらの複合体を用いて high-throughput screening を行うことを目指した。



**Figure 2-1-4.** (A) Schematic representation of domain structure of Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN and LUBAC. (B) Petit-LUBAC- and Petit-SHARPIN-mediated ubiquitin chain elongation. Petit-LUBAC and Petit-SHARPIN were incubated with E1, UbcH5c (E2) and ubiquitin. Samples were probed with anti-ubiquitin antibody.

## 第2節 蛍光標識ユビキチンの作製

前述の通り、化合物スクリーニングを行うためには fluorescein および  $Tb^{3+}$ 錯体で蛍光標識したユビキチンを用いる必要がある。そこで、前者は fluorescein isothiocyanate (FITC) で、後者は FITC に倣い isothiocyanate 基を導入した  $Tb^{3+}$ 錯体 (TbITC) を合成することで標識を試みることとした。Isothiocyanate 基は一級アミンと容易に反応し、チオウレア構造を介して標的分子との共有結合を形成する (Figure 2-2-1)<sup>28</sup>。

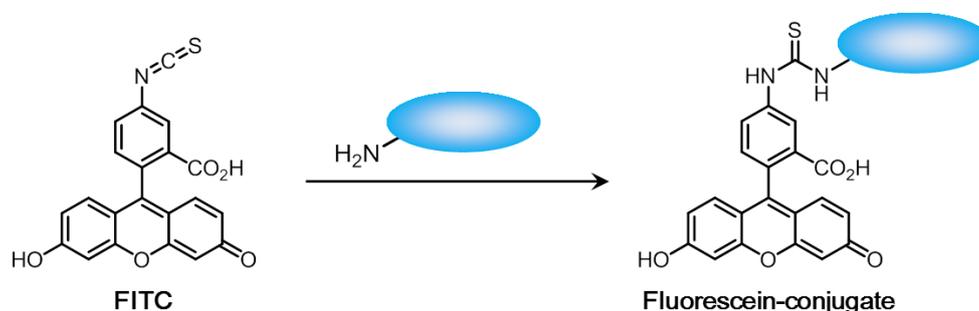


Figure 2-2-1. Scheme for fluorescein-labeling reaction with FITC

$Tb^{3+}$ 錯体ラベル化剤は isothiocyanate を含むタンパク質結合部位 (赤)、carbostyryl 124 (青) からなるアンテナ部位、そして diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) で  $Tb^{3+}$ をキレートした発光部位 (緑) により構成される (Figure 2-2-2A)。希土類金属錯体は、それ自身の吸収が非常に小さいために発光も非常に弱い。しかし、近傍に特定の発色団 (アンテナ) が存在すると、アンテナの光吸収によるエネルギーを受け取ることができるようになり、強い発光を放つようになる (Figure 2-2-2B)<sup>29</sup>。

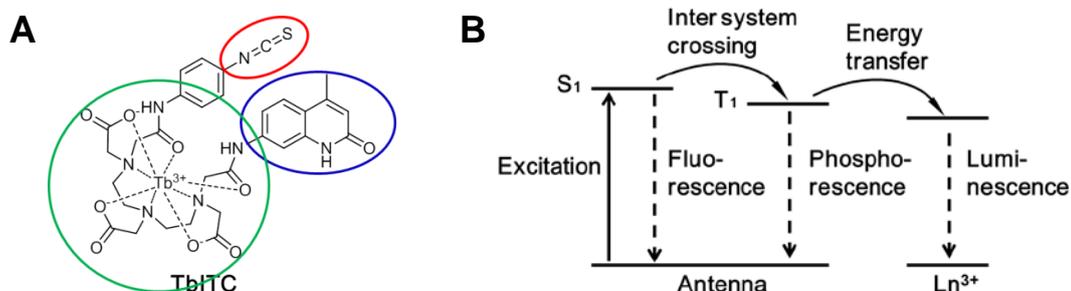
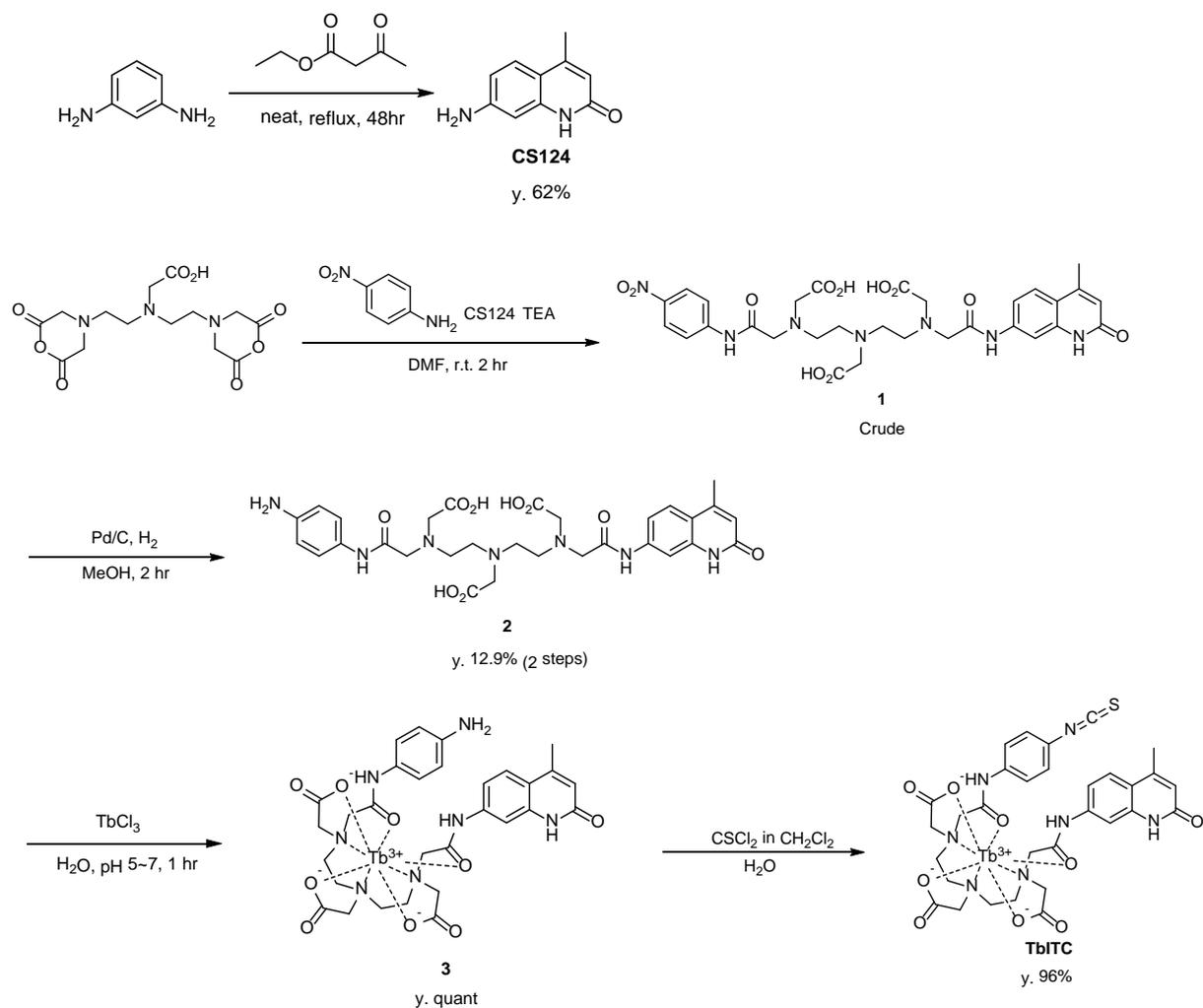


Figure 2-2-2. (A) Chemical structure of terbium chelate-labeling reagent (TbITC). (B) Schematic representation of energy transfer from antenna molecule to lanthanide.

以上のデザインより、 $Tb^{3+}$ 錯体のタンパク質ラベル化剤 **TbITC** を以下の **Scheme 2-2-1**

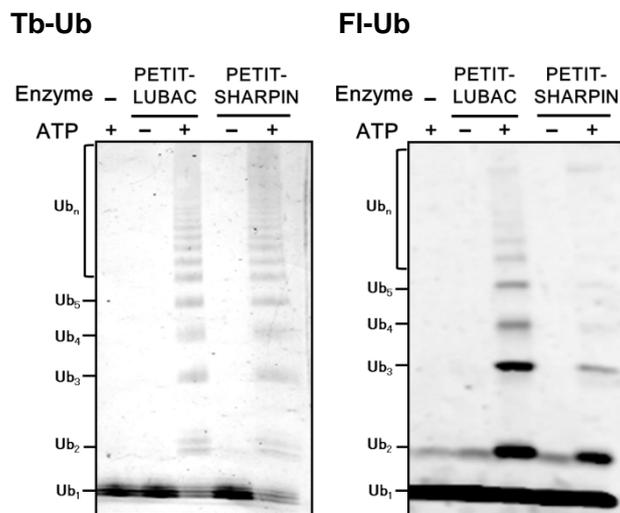
に従い合成した。



**Scheme 2-2-1.** Synthesis of **TbITC**

ここで得られた TbITC および FITC を用いてユビキチンへのラベル化反応を行った。これ以降、TbITC, FITC によりラベル化されたユビキチンをそれぞれ Tb-Ub, Fl-Ub と記載する。作成されたラベル化ユビキチンのタンパク質濃度を BCA 法により、そして Tb<sup>3+</sup>錯体、fluorescein 濃度をそれぞれの吸光度より定量したところ、Tb-Ub, Fl-Ub のユビキチン 1 分子あたりに結合している色素の平均の個数はそれぞれ 0.89, 0.81 と算出された。

ここで、Tb-Ub, Fl-Ub が Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN の基質となり、ユビキチン鎖を生成することを確認した (Figure 2-2-3)。これらの蛍光ラベル化ユビキチンと酵素を加え、インキュベーションした後に SDS-PAGE を行い、蛍光像を取得することで、蛍光ラベル化ユビキチンがこれらの酵素の基質となることが確かめられた。



**Figure 2-2-3.** Petit-LUBAC- and Petit-SHARPIN-mediated elongation of fluorescence-labeled ubiquitins. Reactions were performed at 37 °C in the following conditions: 22.5 μM Tb-Ub, 50 μg/mL E1, 50 μg/mL UbcH5c (E2) and 50 μg/mL each E3 (left), and 3 μM Fl-Ub, 5 μg/mL E1, 10 μg/mL UbcH5c (E2) and 10 μg/mL each E3. And then, reaction products were visualized by acquiring fluorescence image.

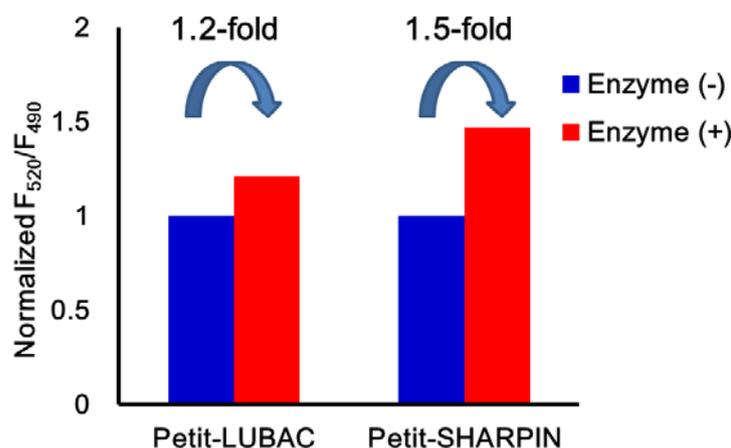
### 第3節 阻害剤スクリーニング系の条件検討

以上までの検討により作成した Tb-Ub、および Fl-Ub を用いることで、Petit-LUBAC と Petit-SHARPIN の阻害剤スクリーニング系を構築できることが期待されるため、以下の検討により適切な反応条件を決定した。なお、以降の酵素反応はアッセイプレート内で反応を進行させる際に生じる誤差を最小限に抑えるべく、全て室温にて行っている。

1. 非標識ユビキチンの必要性
2. 酵素反応時間
3. 酵素反応の律速段階
4. 酵素反応停止液
5. DMSO 添加による酵素反応への影響
6. プレート内における一様性の確認
7. 既知の E1 阻害剤による評価系の positive control の確認

## 1. 非標識ユビキチンの必要性

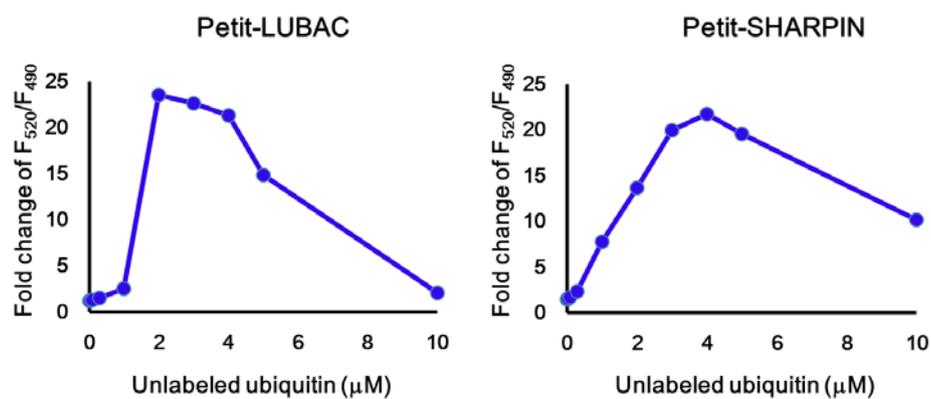
本評価系においては、酵素反応が進行し、ユビキチン鎖が生成されると FRET が起こり、acceptor である fluorescein 由来の 520 nm の蛍光強度が上昇し、donor である Tb<sup>3+</sup>錯体由来の 490 nm の発光強度が減少することが予想されるため、F<sub>520</sub>/F<sub>490</sub> を測定することで、酵素活性を評価することが可能であると考えられる。そこで、まずは Tb-Ub, Fl-Ub を Petit-LUBAC もしくは Petit-SHARPIN を用いて反応させ、その後に蛍光強度を測定したところ、それぞれ 1.2 倍、1.5 倍というわずかなシグナル上昇を示すのみで、期待に反した結果となってしまった (Figure 2-3-1)。



**Figure 2-3-1.** *In vitro* ubiquitylation reactions were performed at room temperature for 6 hr in the following conditions: in the Petit-LUBAC assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.05  $\mu$ M Fl-Ub, 0.38  $\mu$ g/mL E1, 3.8  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and 0.6  $\mu$ g/mL Petit-LUBAC, and in the Petit-SHARPIN assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.05  $\mu$ M Fl-Ub, 3.4  $\mu$ g/mL E1, 3.8  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and 4.2  $\mu$ g/mL Petit-SHARPIN. After the reaction, F<sub>520</sub> and F<sub>490</sub> were measured.

シグナルの上昇がほとんど見られないのは Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN による酵素反応が十分に進行せず、ユビキチン鎖が生成していないことが原因であると考えられる。ここで用いている蛍光ラベル化ユビキチンは **Figure 2-2-3** に記すように基質として認識されることは確認されているものの、非標識のユビキチンに比較して基質認識能が低下していると考えられる。そこで、反応系中に非標識ユビキチンを加えることで、ユビキチン鎖の生成が促進され、その結果として FRET 効率が上昇することを期待し、以下の検討を行った (**Figure 2-3-2**)。この結果、反応系中に非標識ユビキチンを加えることで、Petit-LUBAC Petit-SHARPIN のいずれにおいても大きなシグナル上昇が認められた。また、これよりも大量の非標識ユビキチンを系中に加えると今度はシグナルの低下が見られるが、これは、ユビキチン鎖の中に含まれる非標識ユビキチンの比率が高まり過ぎるために、Tb<sup>3+</sup>錯体と fluorescein との距離が遠ざかり、FRET が起こらなくなってしまったものと考えられる。

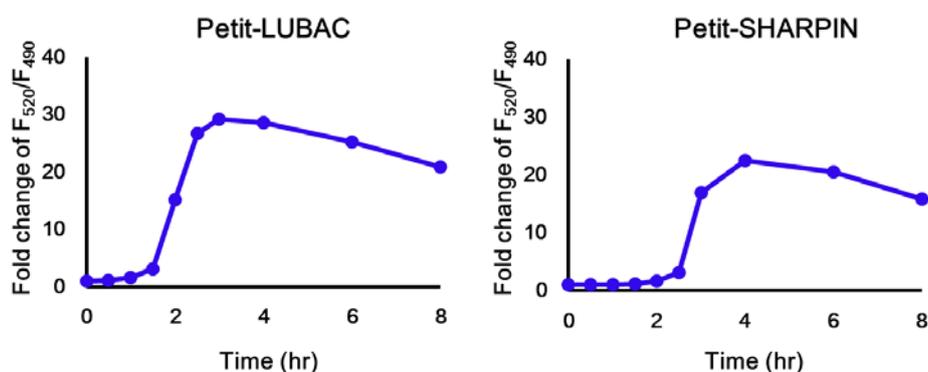
ただし、通常 FRET 効率が 50%となる donor-acceptor 間の距離、すなわち  $R_0$  は数 nm 程度と言われている。Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のいずれにおいても、 $F_{520}/F_{490}$  が最大の値となる際の非標識ユビキチン濃度は、蛍光標識ユビキチンに対して 40-160 倍であり、ユビキチン 1 分子の N 末端と C 末端の距離がおよそ 3 nm であることを考慮すると、この酵素反応により生成されるユビキチン鎖において、Tb<sup>3+</sup>錯体と fluorescein との距離は、FRET が起こるためには遠くなり過ぎてしまうとされる。そのため、このような状況においても FRET が起こっているという事実は、直鎖状ポリユビキチン鎖の立体的な構造により FRET donor と acceptor の距離が近接していることを示唆するものと考えられる。



**Figure 2-3-2.** *In vitro* ubiquitylation reactions were performed at room temperature for 6 hr in the following conditions: in the Petit-LUBAC assay system, 0.025 μM Tb-Ub, 0.05 μM F1-Ub, various concentrations of ubiquitin, 0.38 μg/mL E1, 3.8 μg/mL UbcH5c (E2) and 0.6 μg/mL Petit-LUBAC, and in the Petit-SHARPIN assay system, 0.025 μM Tb-Ub, 0.05 μM F1-Ub, various concentrations of ubiquitin, 3.4 μg/mL E1, 3.8 μg/mL UbcH5c (E2) and 4.2 μg/mL Petit-SHARPIN. After the reaction, F<sub>520</sub> and F<sub>490</sub> were measured.

## 2. 酵素反応時間

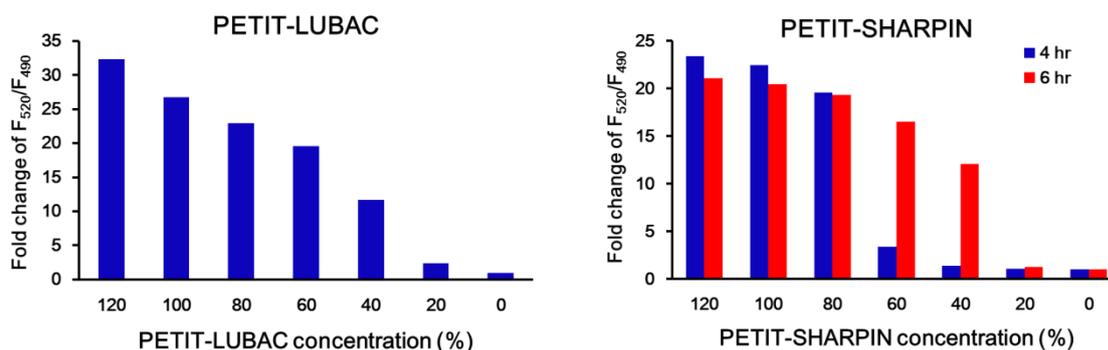
阻害剤を加えることでその酵素反応を遅延させることができたとしても、長時間にわたり反応をさせれば基質は全て消費され、見かけ上酵素が阻害されていることがわからなくなってしまう可能性が想定されるため、反応時間はその酵素反応が完結するよりも前に設定することが望ましい。そこで、酵素反応により得られるシグナルの経時変化を追跡し、適切な反応時間を定めることを目指した。この検討の結果、Petit-LUBAC, Petit-SHARPINのいずれの反応系においても、反応直後はほとんどシグナルの変化は観測されず、一定の時間が経過してから初めて値が上昇することが確認された (Figure 2-3-3)。これは、基質認識能が低い 2 種類の蛍光標識ユビキチンが同一のユビキチン鎖に組み込まれるまでに一定の時間を要するためであると考えられる。以上の結果より、十分に高いシグナル上昇が得られ、かつ反応が飽和に至る前後の反応時間として Petit-LUBAC においては 2.5 hr, Petit-SHARPIN においては 4 hr もしくは 6 hr とした。



**Figure 2-3-3.** *In vitro* ubiquitylation reactions were performed at room temperature for each time in the following conditions: in the Petit-LUBAC assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.05  $\mu$ M Fl-Ub, 0.4  $\mu$ g/mL E1, 3.5  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and 0.6  $\mu$ g/mL Petit-LUBAC, and in the Petit-SHARPIN assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.1  $\mu$ M Fl-Ub, 3.8  $\mu$ g/mL E1, 5.0  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and 3.4  $\mu$ g/mL Petit-SHARPIN. After the reaction, F<sub>520</sub> and F<sub>490</sub> were measured.

### 3. 酵素反応の律速段階

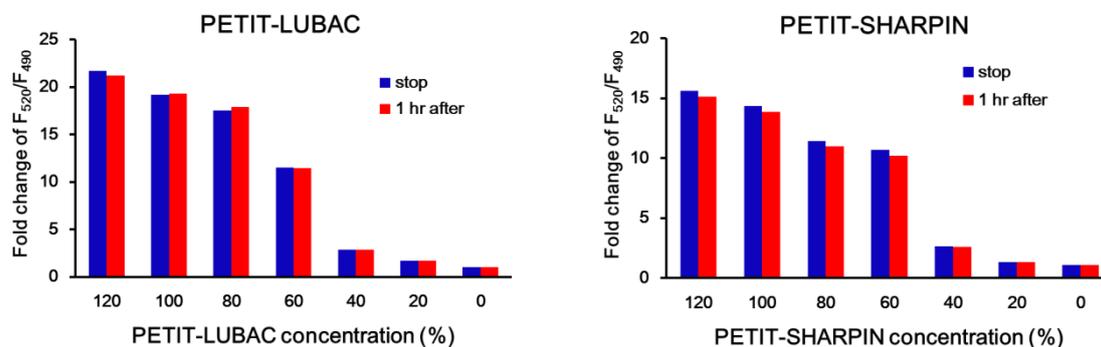
ユビキチン鎖伸長反応は E1, E2 および E3 の 3 種の酵素群により触媒されるため、E3 に属する Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN の阻害剤を取得するためには E3 が反応の律速段階となることが好ましい。そこで、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のそれぞれにおいて E3 量を変化させた際にシグナルもこれに伴って変化するか確認を行った (Figure 2-3-4)。この結果、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のいずれにおいても加える E3 量に伴うシグナル変化が観察されたため、本評価系を用いることで E3 阻害剤を検出しやすくなることが期待される。なお、Petit-SHARPIN においては 4, 6 hr のいずれにおいても酵素量に伴うシグナルの変化が見られたものの、ある濃度を境にシグナルが大きく減少することが確認された。以上より、4, 6 hr の中間となる 5 hr ではこのような変化が緩やかになることを期待し、これを反応時間として設定した。恐らく、5 hr 反応させてもある酵素濃度を境に大きなシグナルの減少が起こり、正確な inhibition % の算出が困難となることが予想されるが、Petit-SHARPPIN を阻害するという事実は検出可能であろうと考え、以降の検討を行った。



**Figure 2-3-4.** *In vitro* ubiquitylation reactions were performed at room temperature for each time in the following conditions: in the Petit-LUBAC assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.05  $\mu$ M Fl-Ub, 0.4  $\mu$ g/mL E1, 3.5  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and each concentration of Petit-LUBAC, and in the Petit-SHARPIN assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.1  $\mu$ M Fl-Ub, 3.8  $\mu$ g/mL E1, 5.0  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and each concentration of Petit-SHARPIN. After the reaction, F<sub>520</sub> and F<sub>490</sub> were measured. The concentrations of 100% Petit-LUBAC and Petit-SHARPIN are 0.57  $\mu$ g/mL and 3.4  $\mu$ g/mL, respectively.

#### 4. 酵素反応停止液

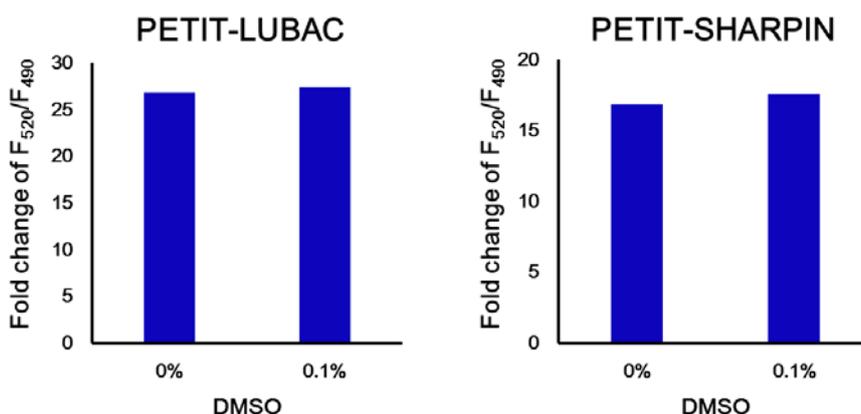
スクリーニングを実施する際、一度におよそ 30 枚のプレートを実験に用いることを計画した。プレートリーダーで測定を行う際、プレート 1 枚あたり約 2 分の時間を要するため、全てのプレートで同時に酵素反応を開始すると、測定の際に最初と最後のプレートの間で反応時間がおよそ 1 時間異なってしまい、正しく評価が行えなくなる。そのため、酵素反応を停止させるための適切な処理を施す必要がある。酵素反応を停止させる手段には、trichloroacetic acid (TCA) などの酸や、guanidine-HCl などのタンパク質変性剤などにより酵素活性を失活させる方法が考えられるが<sup>30, 31</sup>、酸を加えることで Tb<sup>3+</sup>錯体のキレートが外れてしまう、fluorescein 由来の蛍光強度が低下してしまうということが起こると予想されるため、同手法は望ましくない<sup>32</sup>。そこで、タンパク質変性剤として guanidine-HCl を用いることを選択し、一定時間の酵素反応の後に guanidine-HCl を加え、反応を停止させることが可能であるか検討した (Figure 2-3-5)。一定の時間の酵素反応の後に蛍光強度を測定し、その後 guanidine-HCl を加えて 1 hr 経過後に再度測定を行ったところ、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のいずれのアッセイ系においても反応が停止していることが確認された。以上より、guanidine-HCl を反応停止液として用いることで、測定の際の最初と最後のプレートの間における反応の進行度の違いは生じなくなると考えられる。



**Figure 2-3-5.** *In vitro* ubiquitylation reactions were performed at room temperature for each time in the following conditions: in the Petit-LUBAC assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.05  $\mu$ M Fl-Ub, 0.4  $\mu$ g/mL E1, 3.5  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and each concentration of Petit-LUBAC, and in the Petit-SHARPIN assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.1  $\mu$ M Fl-Ub, 3.8  $\mu$ g/mL E1, 5.0  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and each concentration of Petit-SHARPIN. After the reaction, 5  $\mu$ L of 8 M guanidine-HCl aqueous was added to 15  $\mu$ L of reaction solution to stop the reaction, and then F<sub>520</sub> and F<sub>490</sub> were measured. The concentrations of 100% Petit-LUBAC and Petit-SHARPIN are 0.57  $\mu$ g/mL and 3.4  $\mu$ g/mL, respectively. -28-

## 5. DMSO 添加によるの酵素反応への影響

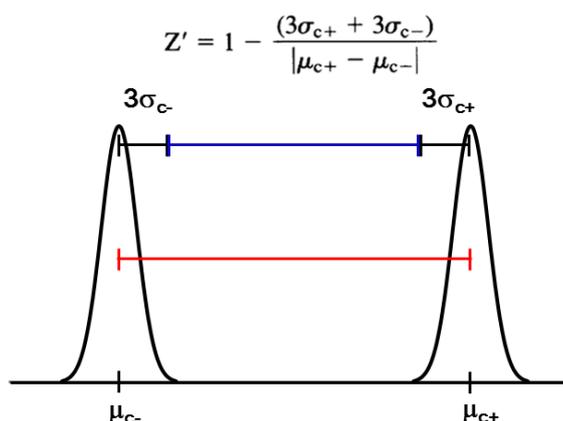
化合物スクリーニングを行う際にはDMSOに溶解している化合物を反応系中に加えるため、DMSO 添加によりシグナルの変化が影響を受けないことを確認する必要がある。そこで、系中に 0.1% DMSO を加えて酵素反応を行ったところ、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のいずれの評価系においても DMSO 添加によるシグナルの有意な変化は観察されなかった (Figure 2-3-6)。化合物ライブラリーに保管されている化合物は DMSO 中に 2 mM の濃度で溶解しているため、1000 倍希釈 (0.1% DMSO) してアッセイに用いることで 2  $\mu$ M の濃度で化合物スクリーニングを行うことができる。



**Figure 2-3-6.** *In vitro* ubiquitylation reactions were performed at room temperature for each time in the following conditions: in the Petit-LUBAC assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.05  $\mu$ M Fl-Ub, 0.4  $\mu$ g/mL E1, 3.5  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and 0.6  $\mu$ g/mL Petit-LUBAC, and in the Petit-SHARPIN assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.1  $\mu$ M Fl-Ub, 3.8  $\mu$ g/mL E1, 5.0  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and 3.4  $\mu$ g/mL Petit-SHARPIN in the presence or absence of 0.1% DMSO. After the reaction,  $F_{520}$  and  $F_{490}$  were measured.

## 6. プレート内における一様性の確認

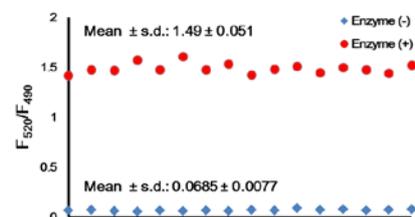
化合物スクリーニングを行うためには、アッセイプレート全体に試薬が均一に加えられ、反応が進行することが望まれるため、プレート内における一様性試験を行った。384-well プレートの右端には酵素活性 0%のコントロールとして酵素無添加のウェルを用意し、それ以外のウェルには全て酵素を加えている。実際にスクリーニングを行う際には、左端のウェルを酵素活性 100%のコントロールとして用いるため、左右両端のコントロールより  $Z'$  を算出し、どの程度のばらつきが生じるか検討を行った。なお、 $Z'$  とはスクリーニング系の信頼度を評価するためのパラメータであり、**Figure 2-3-7** で表す式に定義され、この値が 0.5 以上ならば充分であると考えられている<sup>33</sup>。検討の結果、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のいずれの系においても大きな値の  $Z'$  が得られ、ばらつきの小さいアッセイが行えることが期待される結果となった (**Figure 2-3-8**)。また、プレートの内側に進むにつれてシグナルが大きな値をとる傾向が見られるが、これは inhibition % に換算すると大きくても 10% 程度の誤差にしかならないため、アッセイを行う上で大きな支障をきたすものではないと判断した。



**Figure 2-3-7.**  $Z'$ -factor, which is an indicator of screening system reliability.  $Z'$ -factor is estimated by indicated equation.

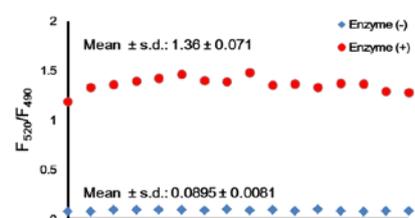
### Petit-LUBAC

1.42	1.39	1.42	1.44	1.44	1.48	1.49	1.49	1.52	1.44	1.45	1.43	1.44	1.50	1.42	1.49	1.43	1.48	1.48	1.46	1.48	0.07
1.48	1.49	1.56	1.56	1.57	1.56	1.51	1.59	1.59	1.53	1.58	1.58	1.54	1.61	1.52	1.52	1.59	1.51	1.60	1.48	1.48	0.07
1.47	1.44	1.50	1.47	1.52	1.49	1.52	1.47	1.50	1.48	1.55	1.58	1.54	1.50	1.58	1.51	1.53	1.53	1.51	1.56	1.51	0.06
1.57	1.63	1.61	1.58	1.59	1.58	1.63	1.64	1.61	1.58	1.63	1.65	1.62	1.64	1.54	1.61	1.57	1.62	1.58	1.56	1.52	0.06
1.48	1.49	1.46	1.51	1.56	1.56	1.49	1.54	1.52	1.55	1.58	1.58	1.56	1.52	1.59	1.51	1.52	1.47	1.52	1.54	1.52	0.06
1.61	1.58	1.51	1.61	1.59	1.59	1.59	1.63	1.59	1.67	1.59	1.62	1.62	1.63	1.61	1.59	1.58	1.59	1.58	1.54	1.54	0.06
1.48	1.45	1.46	1.56	1.62	1.50	1.51	1.56	1.48	1.47	1.52	1.56	1.57	1.50	1.62	1.52	1.53	1.52	1.54	1.58	1.56	0.07
1.53	1.55	1.65	1.61	1.65	1.64	1.60	1.60	1.57	1.59	1.62	1.60	1.61	1.64	1.62	1.63	1.64	1.60	1.66	1.60	1.56	0.06
1.43	1.40	1.38	1.43	1.45	1.47	1.47	1.43	1.42	1.47	1.45	1.47	1.48	1.49	1.50	1.43	1.52	1.56	1.52	1.47	1.65	0.07
1.48	1.47	1.51	1.54	1.58	1.54	1.55	1.53	1.51	1.58	1.56	1.59	1.51	1.55	1.54	1.53	1.50	1.53	1.60	1.60	1.45	0.06
1.51	1.40	1.43	1.50	1.51	1.51	1.50	1.52	1.43	1.52	1.26	1.53	1.52	1.51	1.52	1.51	1.51	1.42	1.52	1.48	1.50	0.08
1.45	1.55	1.57	1.56	1.54	1.58	1.56	1.51	1.52	1.59	1.55	1.58	1.54	1.54	1.55	1.54	1.53	1.55	1.45	1.47	1.49	0.07
1.50	1.46	1.44	1.45	1.54	1.50	1.48	1.52	1.54	1.57	1.54	1.56	1.56	1.55	1.56	1.53	1.50	1.54	1.57	1.57	1.54	0.06
1.48	1.56	1.59	1.53	1.58	1.54	1.54	1.57	1.57	1.55	1.58	1.65	1.58	1.58	1.61	1.61	1.54	1.27	1.50	1.48	1.53	0.07
1.44	1.38	1.38	1.42	1.49	1.49	1.55	1.47	1.57	1.50	1.53	1.53	1.50	1.51	1.49	1.54	1.52	1.52	1.53	1.49	1.49	0.06
1.52	1.49	1.55	1.48	1.56	1.55	1.54	1.61	1.50	1.57	1.57	1.52	1.55	1.53	1.59	1.53	1.56	1.57	1.53	1.51	1.54	0.08



### Petit-SHARPIN

1.18	1.26	1.29	1.33	1.32	1.35	1.32	1.39	1.33	1.36	1.41	1.33	1.38	1.27	1.35	1.33	1.33	1.34	1.33	1.32	1.28	0.08
1.33	1.39	1.41	1.45	1.43	1.50	1.44	1.52	1.42	1.43	1.50	1.52	1.44	1.44	1.44	1.39	1.39	1.42	1.47	1.42	1.41	0.08
1.36	1.49	1.43	1.48	1.50	1.46	1.45	1.44	1.42	1.49	1.50	1.48	1.46	1.50	1.52	1.49	1.47	1.50	1.46	1.47	1.41	0.09
1.39	1.44	1.47	1.51	1.54	1.52	1.54	1.50	1.58	1.53	1.57	1.57	1.53	1.57	1.57	1.55	1.57	1.50	1.53	1.54	1.47	0.10
1.42	1.40	1.40	1.43	1.44	1.45	1.47	1.49	1.49	1.49	1.50	1.49	1.50	1.55	1.43	1.52	1.49	1.45	1.50	1.47	1.46	0.10
1.46	1.55	1.47	1.49	1.50	1.52	1.50	1.52	1.49	1.51	1.52	1.54	1.54	1.54	1.46	1.50	1.48	1.54	1.47	1.49	1.50	0.10
1.40	1.43	1.44	1.42	1.49	1.45	1.47	1.53	1.40	1.48	1.49	1.48	1.48	1.40	1.49	1.41	1.47	1.48	1.52	1.50	1.48	0.09
1.39	1.46	1.55	1.51	1.50	1.54	1.55	1.55	1.51	1.53	1.55	1.56	1.52	1.52	1.52	1.48	1.51	1.49	1.49	1.48	1.46	0.10
1.48	1.43	1.45	1.42	1.46	1.46	1.46	1.46	1.40	1.50	1.46	1.45	1.44	1.44	1.45	1.41	1.47	1.47	1.55	1.49	1.43	0.08
1.36	1.42	1.49	1.47	1.49	1.44	1.50	1.51	1.47	1.49	1.53	1.52	1.49	1.48	1.47	1.45	1.44	1.46	1.50	1.46	1.40	0.10
1.37	1.40	1.38	1.45	1.49	1.48	1.47	1.48	1.43	1.44	1.50	1.45	1.47	1.52	1.44	1.46	1.48	1.48	1.47	1.43	1.50	0.08
1.33	1.42	1.43	1.47	1.45	1.45	1.54	1.50	1.47	1.49	1.45	1.44	1.50	1.42	1.47	1.50	1.47	1.44	1.50	1.46	1.46	0.10
1.37	1.40	1.33	1.33	1.44	1.46	1.48	1.44	1.43	1.46	1.48	1.48	1.49	1.43	1.49	1.43	1.44	1.48	1.47	1.46	1.46	0.08
1.36	1.39	1.42	1.43	1.44	1.45	1.55	1.49	1.52	1.51	1.45	1.51	1.51	1.54	1.52	1.47	1.43	1.49	1.42	1.48	1.35	0.08
1.29	1.36	1.33	1.33	1.43	1.39	1.43	1.38	1.43	1.42	1.48	1.46	1.38	1.38	1.41	1.41	1.41	1.51	1.42	1.45	1.40	0.08
1.26	1.37	1.40	1.39	1.41	1.45	1.45	1.44	1.43	1.39	1.46	1.47	1.47	1.45	1.44	1.43	1.48	1.46	1.40	1.41	1.42	0.08

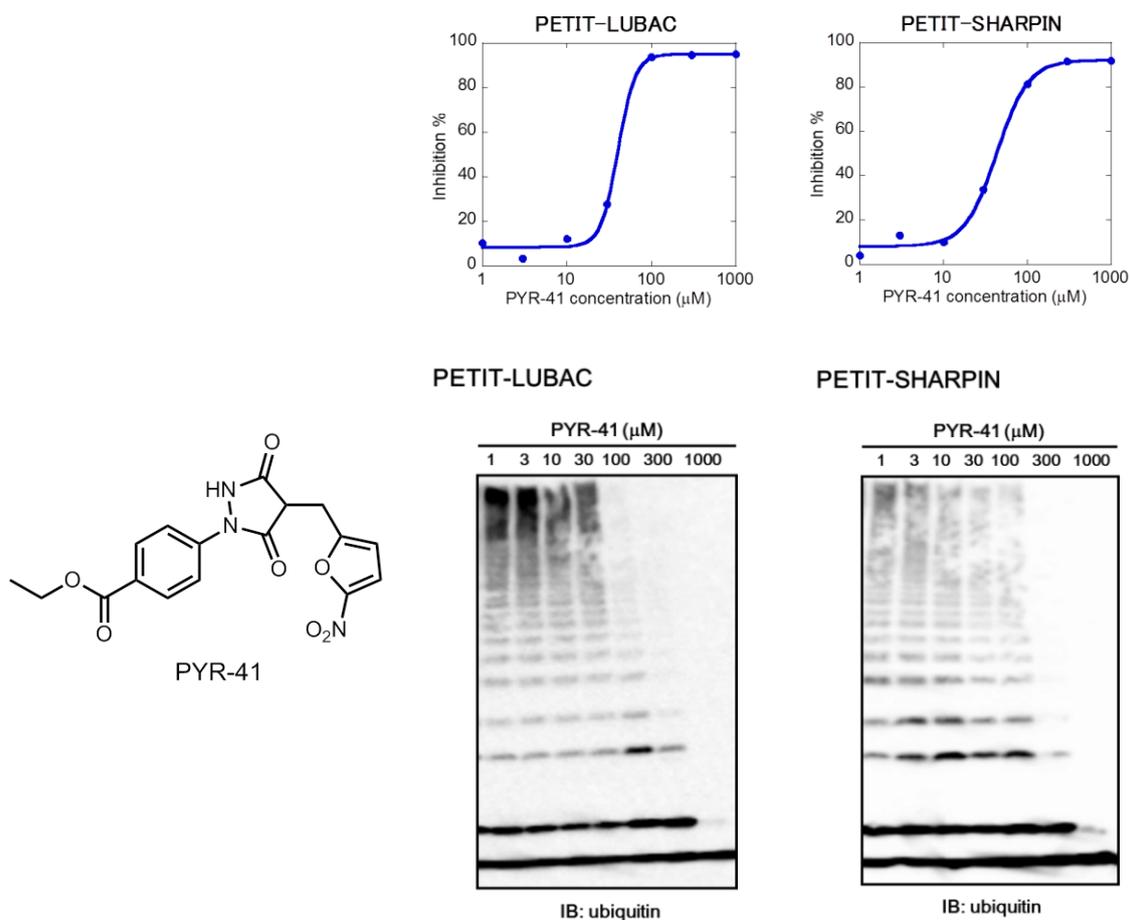


	Fold change	Z'
Petit-LUBAC	21.7	0.88
Petit-SHARPIN	15.2	0.81

**Figure 2-3-8.** *In vitro* ubiquitylation reactions were performed at room temperature for each time in the following conditions: in the Petit-LUBAC assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.05  $\mu$ M Fl-Ub, 0.4  $\mu$ g/mL E1, 3.5  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and 0.6  $\mu$ g/mL Petit-LUBAC, and in the Petit-SHARPIN assay system, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.1  $\mu$ M Fl-Ub, 3.8  $\mu$ g/mL E1, 5.0  $\mu$ g/mL UbcH5c (E2) and 3.4  $\mu$ g/mL Petit-SHARPIN in the presence of 0.1% DMSO. After the reaction,  $F_{520}$  and  $F_{490}$  were measured and  $Z'$  values were calculated.

## 7. 既知の E1 阻害剤による評価系の **positive control** の確認

これまでの検討により、化合物スクリーニングを行うに足る評価系を構築することができたと判断されたため、実際にユビキチン鎖の伸長反応を阻害する化合物を検出可能であるか評価を行った (**Figure 2-3-9**)。この時点において選択的な LUBAC 阻害剤の報告例はないため、ユビキチン鎖の伸長反応に必須である酵素 E1 の阻害剤である PYR-41 を用いている<sup>34</sup>。この結果、PYR-41 の添加により Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のいずれの系においてもシグナルが減少することが確認され、さらにこれらのサンプルを western blot に供し、ユビキチンを検出することで実際にユビキチン鎖の伸長反応が阻害されていることが確認された。なお、western blot での評価ではユビキチン鎖が十分に伸長しつつも、FRET の評価では強く阻害されてしまうという評価結果の乖離が生じてしまっているが (特に両評価系に 100  $\mu$ M PYR-41 を加えたサンプル)、この結果は、**Figure 2-3-3** に示した酵素反応の経時変化の項にも述べたように、FRET が起こるために必要な 2 種の蛍光標識ユビキチンが同一のユビキチン鎖に取り込まれる確率の低さを反映したものと考えられる。



**Figure 2-3-9.** *In vitro* ubiquitylation reaction was performed at room temperature for each time in the following conditions: in the Petit-LUBAC assay system, 0.025 μM Tb-Ub, 0.05 μM Fl-Ub, 0.4 μg/mL E1, 3.5 μg/mL UbcH5c (E2) and 0.6 μg/mL Petit-LUBAC, and in the Petit-SHARPIN assay system, 0.025 μM Tb-Ub, 0.1 μM Fl-Ub, 3.8 μg/mL E1, 5.0 μg/mL UbcH5c (E2) and 3.4 μg/mL Petit-SHARPIN in the presence of various concentrations of PYR-41. After the reaction, F<sub>520</sub> and F<sub>490</sub> were measured and immunoblotting of the ubiquitin was performed to confirm the ubiquitin chain elongation is abolished by addition of PYR-41.

## 第 3 章

### LUBAC 阻害剤スクリーニングの実施

## 第1節 1st スクリーニング

前章にて構築した評価系を用いて、創薬オープンイノベーションセンターの保有する141,147化合物の1stスクリーニングを行った結果を以下に記す (Figure 3-1-1)。このヒストグラムでは Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のそれぞれに対する阻害活性と、その阻害活性を有する化合物の個数の分布を記している。Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のいずれの系においても平均値がやや負の方向に偏っているが、これは前章のプレート一様性試験の項にて示したように、プレートの中心部においてシグナルが高く出やすく、inhibition %が負の値を記録することに起因していると考えられる。

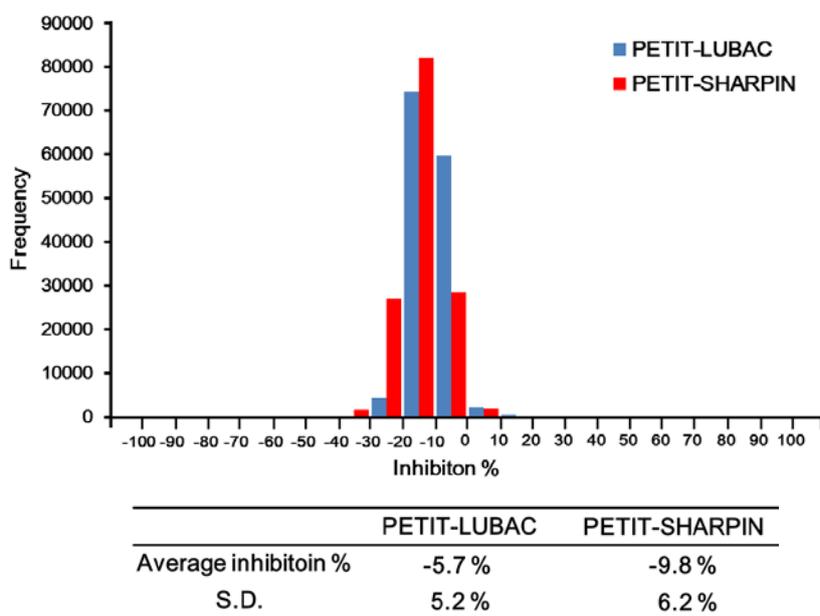
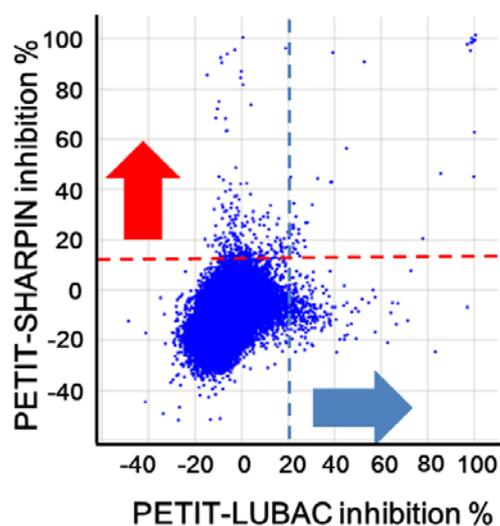


Figure 3-1-1. High-throughput screening of 141,117 compounds was performed.

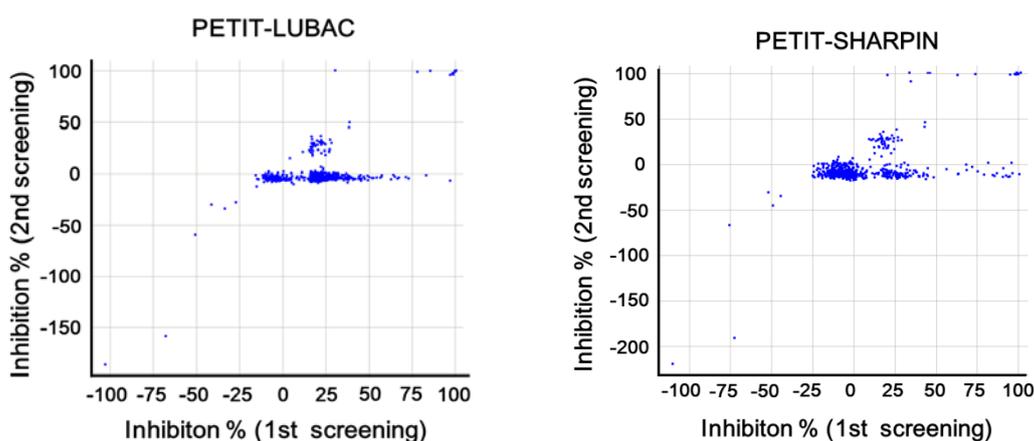
1st スクリーニングにおいては、average + 4 S.D.以上の inhibition %を示した化合物を有意差があるものと判断し、以降の検討にて更なる評価を行うこととした。以下に、被験化合物の Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN に対する阻害活性を示している (Figure 3-1-2)。Average + 4 S.D.の値を Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN のそれぞれについて青、赤の破線で示しており、この基準を満たす化合物数は 530 であった。



**Figure 3-1-2.** Scatter plot of tested compounds. Vertical axis and horizontal axis stand for inhibition % against Petit-LUBAC and Petit-SHARPIN, respectively. Red and blue broken lines show the criteria of 1st screening (average + 4 S.D.)

## 第2節 再現性試験

1st スクリーニングでは、それぞれの化合物につき1回ずつアッセイを行っていたのみであるため、分注のミスなどにより偽陽性を生じてしまう可能性が十分に考えられる。そこで、1st スクリーニングにて選んだ530化合物をそれぞれ  $n = 4$  で再度アッセイすることで偽陽性の化合物を排除することを目指した。以下に、被験化合物の1st スクリーニング時における inhibition % と、今回の再現性試験時における inhibition % の平均値を示した (Figure 3-2-1)。理想的には、1st スクリーニング、再現性試験のいずれにおいても同様の結果が得られ、下記のプロットにおいても  $y = x$  の直線上に乗ることが望まれるが、多くの化合物において、1st スクリーニングにおいては有意な阻害活性があると判断されたにも関わらず、再現性試験においてはそれが一切見られないという結果が得られたため、以降の評価においては今回の試験で再現を示さなかった化合物を除くこととした。加えて本評価系に影響を与える蛍光性の化合物や、あらゆるスクリーニングにてヒット化合物として検出されてしまう非特異的な阻害剤を除外したところ、Petit-LUBAC もしくは Petit-SHARPIN 依存的なユビキチン鎖の伸長を阻害する候補として13化合物が得られた。



**Figure 3-2-1.** Scatter plots of tested compounds. Each dot indicates inhibition % against Petit-LUBAC or Petit-SHARPIN. Horizontal axis and vertical axis stand for the results of 1st screening and average values of 2nd assays, respectively.

### 第3節 ヒット化合物の精査

阻害剤スクリーニングの結果、ヒットと判定された 13 化合物は 4 種の骨格に分けることができ、この内訳は 1 の骨格において 6 化合物、2 の骨格においては 5 化合物、そして 3 および 4 の骨格ではそれぞれ 1 化合物のみとなっている (Figure 3-3-1)。

このスクリーニングにおいては、用いられる化合物濃度は 2  $\mu\text{M}$  の 1 点のみであったため、それぞれの骨格の代表的な化合物について様々な濃度で改めて評価を行い、その  $\text{IC}_{50}$  を算出した (Figure 3-3-2)。また、ここで見られている阻害が FRET を用いた評価系に影響を与えることにより生じた偽陽性であるという可能性を排除するべく、western blot 法により実際にユビキチン鎖の伸長を阻害していることも確認している。

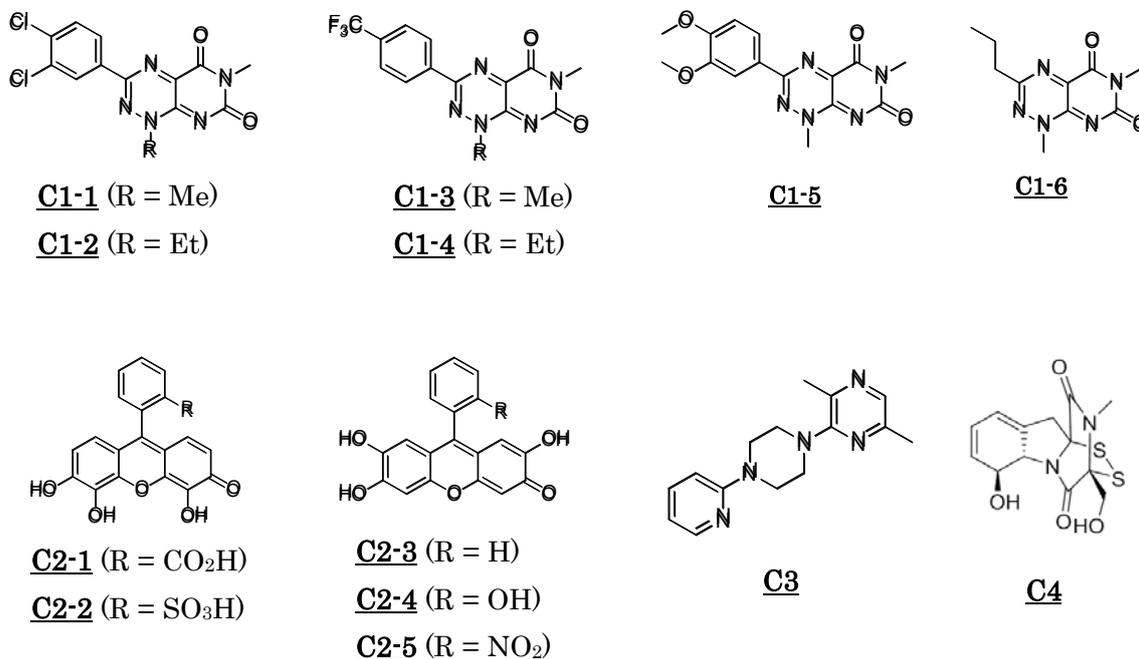
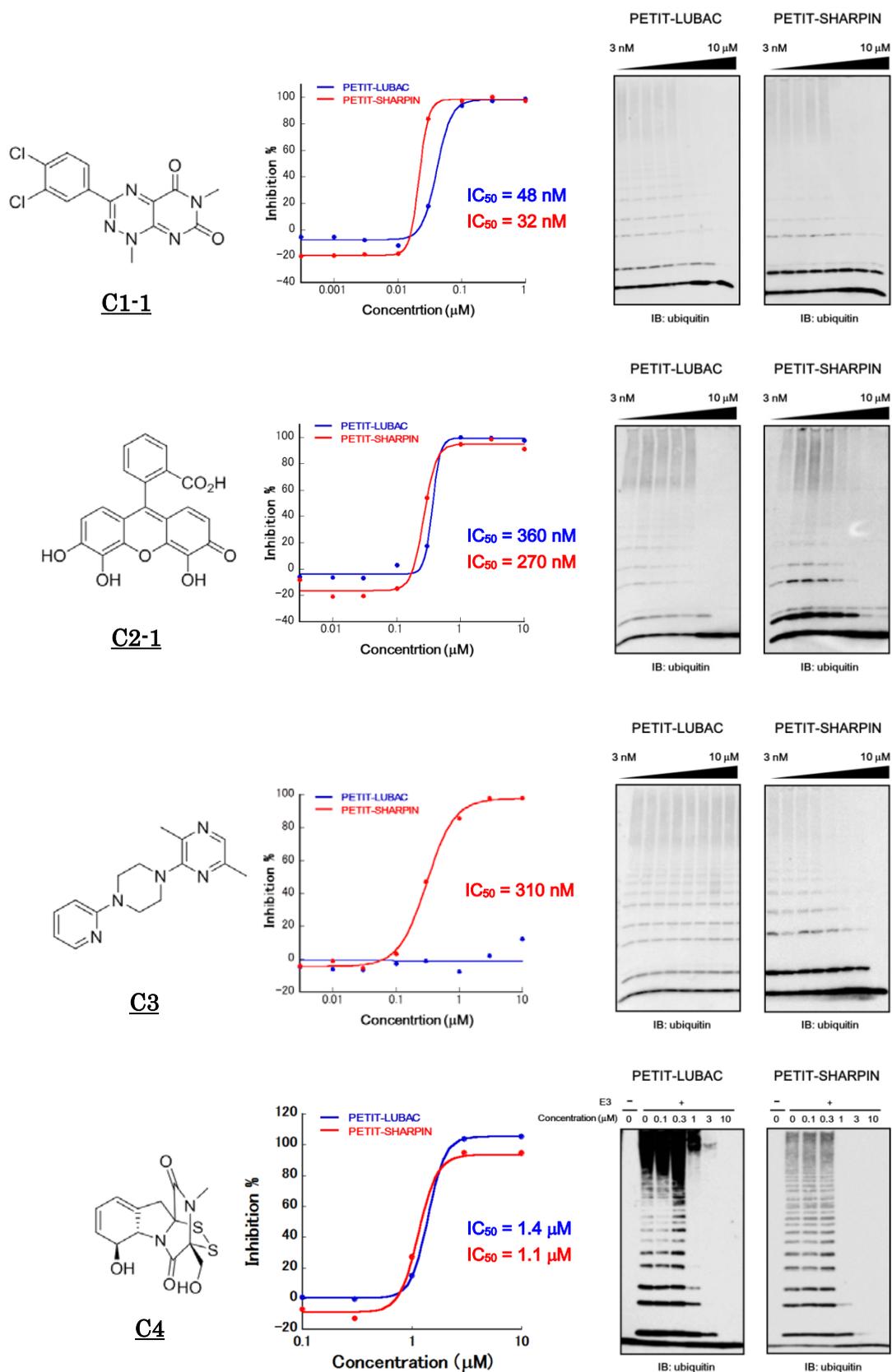


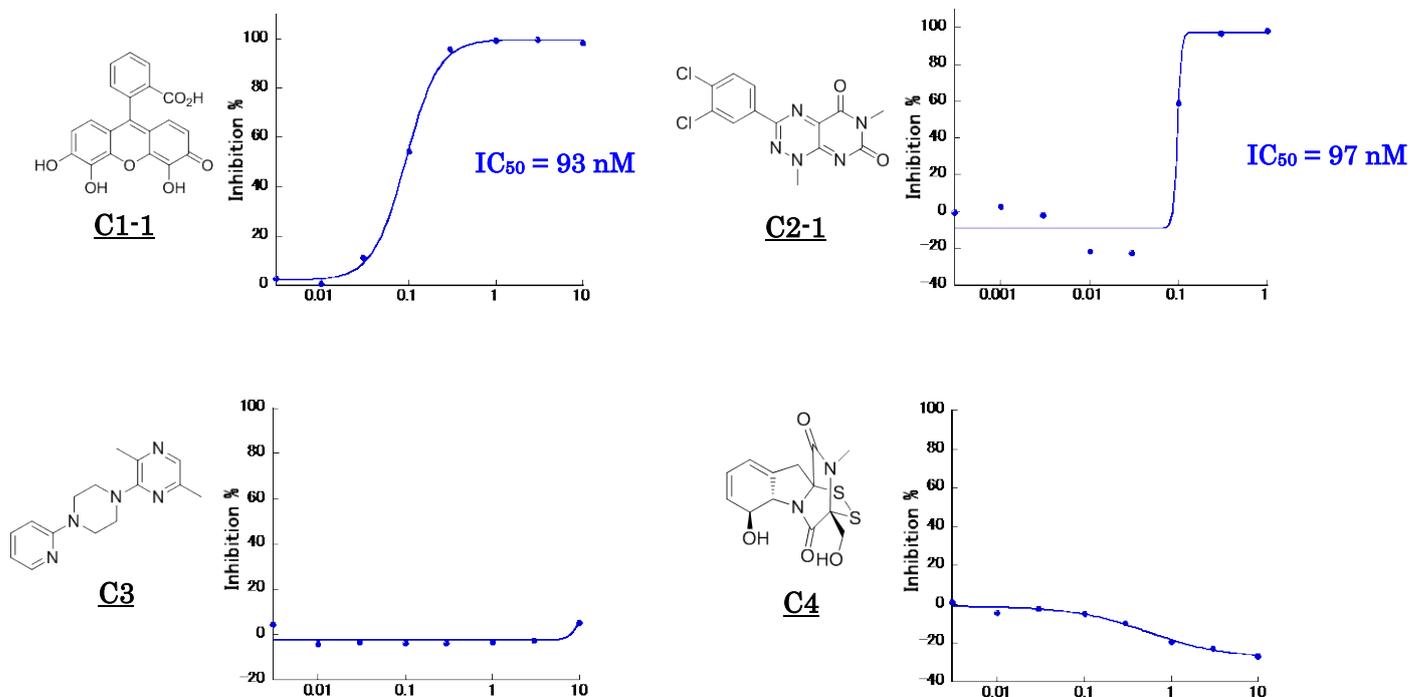
Figure 3-3-1. Chemical structure of hit compounds.



**Figure 3-3-2.** Hit compounds inhibited Petit-LUBAC- and Petit-SHARPIN-mediated ubiquitin chain elongation dose-dependently.

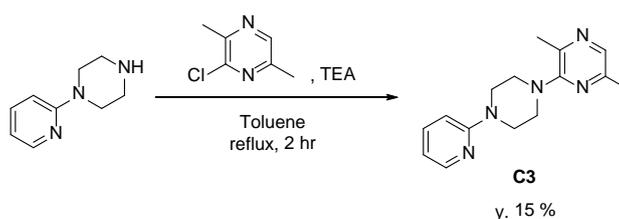
### E1-E3 間の選択性の評価

以上までの検討より、化合物群 **C1-C4** がユビキチン鎖の伸長反応の阻害剤として見出されたが、ユビキチン鎖の伸長反応は E1, E2 および E3 の 3 種の酵素群により触媒されるため、E3 である Petit-LUBAC や Petit-SHARPIN ではなく E1 や E2 に対する阻害剤も本評価系においてはヒット化合物として検出されてしまう。そこで、本スクリーニングにて得られたヒット化合物が E1, E2 を阻害するか否かを評価することとした (**Figure 3-3-3**)。この評価においては E1, E2 はこれまでと同一のものを、E3 のみを別の酵素である NEDD4 に置き換えた系を用いている<sup>35</sup>。この評価系にて阻害が見られた場合には、その化合物は E1, E2 に作用するものと考えられる。もしくは、E1, E2 ではなく標的酵素である Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN を阻害しつつも、NEDD4 にも同様に作用しているという可能性も否定することはできないが、この場合にもその化合物の標的酵素への選択性が低いという事を意味する結果となるため、いずれにしても今後の検討の優先順位は低くなる。

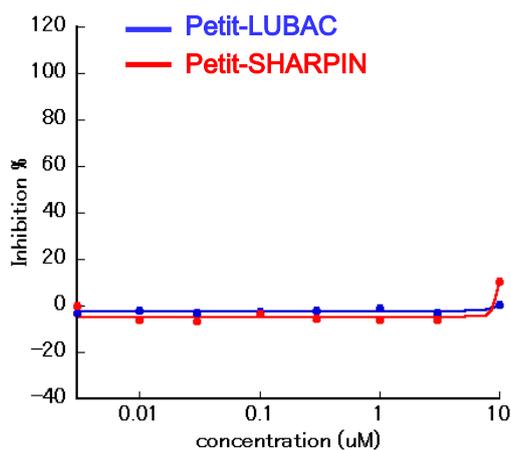


**Figure 3-3-3.** Inhibition assay of NEDD4-mediated ubiquitin chain elongation. Compounds **C1-1** and **C2-1** inhibited the reaction while **C3** and **C4** did not inhibit.

これらの化合物を NEDD4 阻害剤スクリーニング系の評価に供したところ、**C1-1**, **C2-1** は阻害活性を示したため、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN に対する選択的な阻害剤ではないと考え、ここで検討を中断することとした。その一方で、**C3**, **C4** の化合物は NEDD4 に対して一切の阻害活性を示さなかったため、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN の選択的な阻害剤であることが期待される。しかし、化合物 **C3** は自身で合成を行った結果、スクリーニングの際に見られていた Petit-SHARPIN に対する阻害活性が認められなかった (**Scheme 3-3-1**, **Figure 3-3-4**)。保管されていた化合物の中に含まれていた不純物はその阻害能の活性本体であると疑われるが、この不純物を同定することができなかったため、この化合物の検討を中止し、**C4** の化合物「gliotoxin」のみについて今後の更なる高次な検討を行うこととした<sup>36</sup>。



**Scheme 3-3-1.** Synthesis of **C3**.



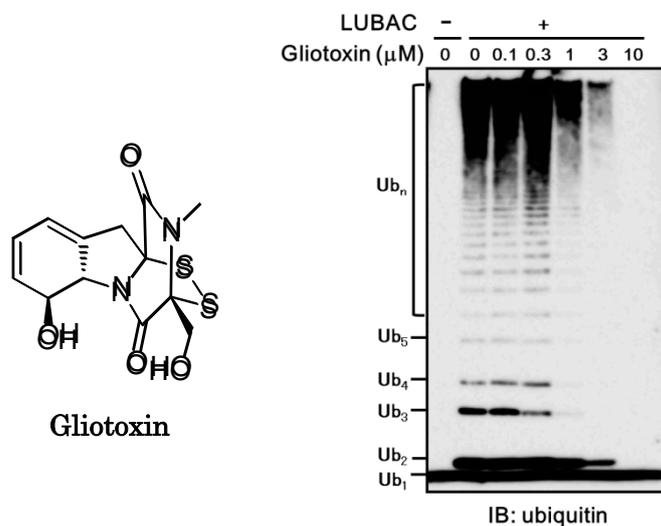
**Figure 3-3-4.** Synthesized compound **C3** did not inhibit Petit-LUBAC- or Petit-SHARPIN-mediated ubiquitin chain elongation at all.

## 第 4 章

### Gliotoxin の *in vitro* における検討

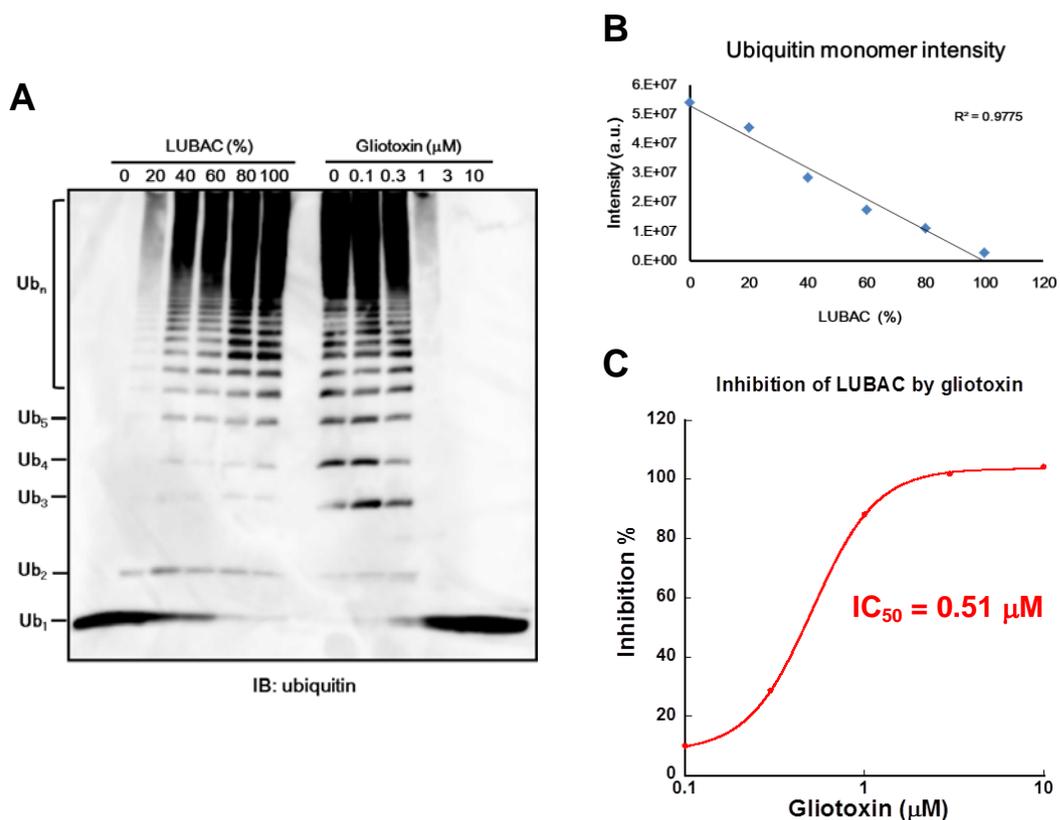
## 第1節 Gliotoxin による LUBAC 阻害

前章の阻害剤スクリーニングにより、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN に対する阻害剤として gliotoxin を見出したため、同化合物の *in vitro* における特性をより詳細に検討することを目指した。これまでのスクリーニングでは、標的酵素として様々なドメインが truncate された HOIP, HOIL-1L から構成される複合体である Petit-LUBAC と、HOIP, SHARPIN から構成される複合体である Petit-SHARPIN を用いていたが、LUBAC は生体内においては full-length の HOIP, HOIL-1L, SHARPIN から構成されているため、この 3 者複合体の酵素活性も同様に阻害可能であるか評価を行った (Figure 4-1-1)。この結果、gliotoxin は濃度依存的に LUBAC によるユビキチン鎖の伸長反応を阻害することが確認された。



**Figure 4-1-1.** Inhibition assay of LUBAC-mediated ubiquitin chain elongation. Gliotoxin inhibited LUBAC enzymatic activity dose-dependently.

ここで、さらに gliotoxin の LUBAC 阻害における  $IC_{50}$  の算出を試みた。LUBAC の酵素反応生成物はユビキチンポリマーであり、単一な物質ではないために、LUBAC の酵素活性を反応生成物から算出することは難しい。以上より、酵素活性を定量するためには反応の基質となるユビキチンモノマーの減少を追跡する方法が望ましいと考えられるため、様々な濃度の LUBAC によりユビキチン鎖の伸長反応を行った後に残存するユビキチンモノマーを定量することで検量線を描き、これを基に gliotoxin の阻害活性を見積もることとした (Figure 4-1-2)。この結果、ユビキチンモノマーの消費量は LUBAC の酵素量に非常によく相関することがわかり、ここで得られた検量線を用いることで gliotoxin の LUBAC 阻害における  $IC_{50} = 0.51 \mu\text{M}$  と算出された。

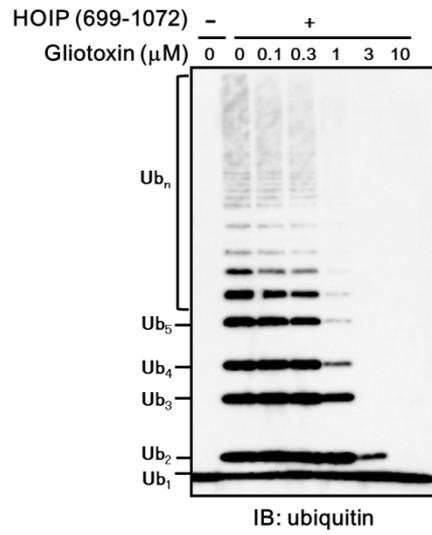


**Figure 4-1-2.** (A) Linear ubiquitylation assay was performed at various concentrations of LUBAC and gliotoxin. The concentration of 100% LUBAC is  $25 \mu\text{g/mL}$ . (B) The standard curve was drawn by plotting the ubiquitin monomer intensity against LUBAC (%). (C) Inhibition (%) was quantified by the standard curve and  $IC_{50}$  of gliotoxin against LUBAC was estimated.

## 第2節 Gliotoxin と LUBAC の結合評価

### Human HOIP (699-1072 aa) 依存的なユビキチン鎖伸長反応の阻害

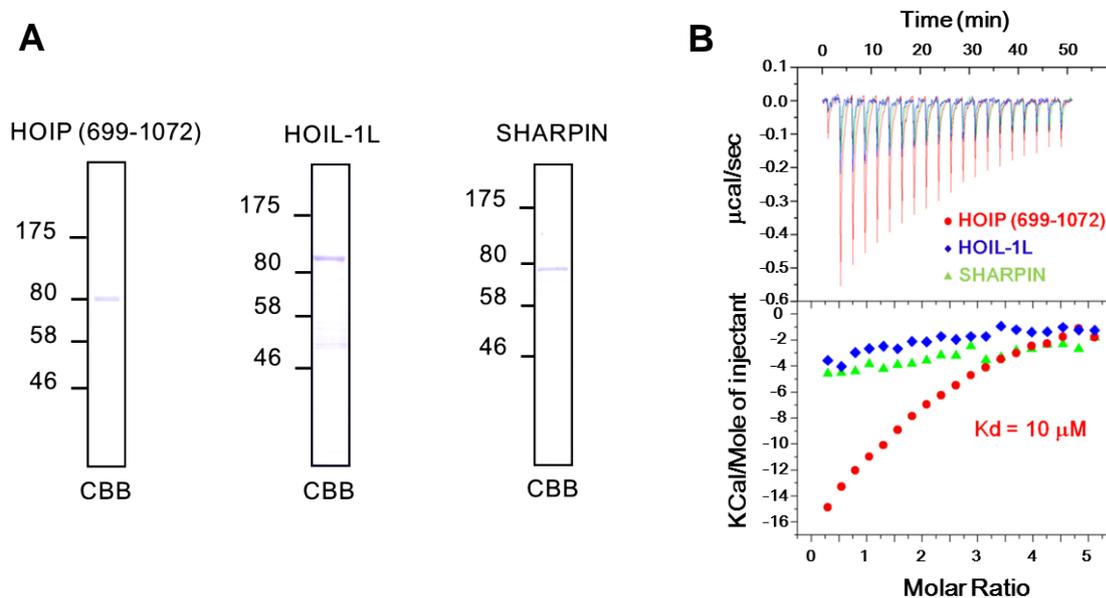
Gliotoxin を用いることで LUBAC を阻害可能であることが示されたため、続いて gliotoxin が LUBAC とどのように相互作用するか評価することを目指した。LUBAC は HOIP, HOIL-1L および SHARPIN の 3 者から構成される複合体であるが、gliotoxin が Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN, LUBAC の全ての酵素活性を同程度の強さで阻害することを考慮すると、その全てに共通に含まれている HOIP が gliotoxin の標的部位となることが予想される。以上を踏まえて、酵素複合体ではなく、HOIP 単独に触媒される直鎖状ポリユビキチン鎖伸長反応も阻害可能であるか評価した。しかし、通常、HOIP は単独では自身の N 末端の領域が C 末端の酵素活性中心と結合することにより、その酵素活性が阻害されており、HOIL-1L や SHARPIN と複合体を形成することにより、初めてその阻害から解放されるものと推測されている<sup>37</sup>。そのため、HOIP のみを用いた酵素反応を行うことは困難であると考えられるが、その阻害に関与するであろう N 末端領域を切除し、C 末端の酵素活性中心のみを残した human HOIP (699-1072 aa) ではユビキチン鎖の伸長が可能となるため<sup>17, 38</sup>、これを用いて評価を行った (**Figure 4-2-1**)。この結果、Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN, LUBAC と同様に、human HOIP (699-1072 aa) によるユビキチン鎖生成能も gliotoxin の添加により阻害されることが示された。この結果は、gliotoxin が LUBAC の酵素活性中心である HOIP の RING-IBR-RING-LDD ドメインに結合することで直鎖状ポリユビキチン鎖の生成能を阻害するということを強く示唆している。



**Figure 4-2-1.** Inhibition assay of HOIP (699-1072)-mediated ubiquitin chain elongation. Gliotoxin inhibited HOIP (699-1072) enzymatic activity dose-dependently.

### Isothermal Titration Calorimetry (ITC) 法による結合解析

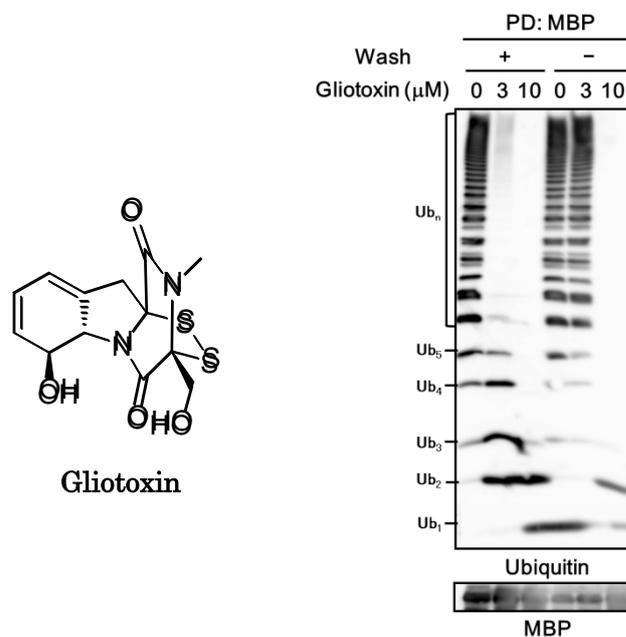
続いて、isothermal titration calorimetry (ITC) 法により gliotoxin と HOIP との相互作用を評価した。ITC 法とは 2 分子間の相互作用を評価する手法であり、2 者が結合し、安定化した際に放出される熱量を計測することでその結合の強さを見積もるというものである<sup>39</sup>。ITC の測定では、微小な熱量を計測するために夾雑物の影響を受けやすく、可能な限り高い純度で試料を調製する必要がある。そこで、HOIP (699-1072 aa), HOIL-1L, SHARPIN の N 末端、C 末端にそれぞれ MBP, His<sub>6</sub> タグを融合させたタンパク質を大腸菌で発現・精製し、これらのタグを用いて 2 段階のアフィニティ精製を行うことで、高純度なタンパク質を取得した (Figure 4-2-2A)。さらに、これらの精製タンパク質を用いて結合評価を行ったところ、LUBAC を構成する 3 者のタンパク質の内、HOIP (699-1072 aa) が gliotoxin と混合した際に熱の放出が確認された一方で、HOIL-1L や SHARPIN ではそれが認められなかったことから、gliotoxin は LUBAC の酵素活性中心に選択的に結合することで直鎖状ポリユビキチン鎖生成能を阻害していることが改めて強く示唆された (Figure 4-2-2B)。



**Figure 4-2-2.** (A) CBB staining of purified HOIP (699-1072), HOIL-1L and SHARPIN. (B) Evaluation of interaction between gliotoxin and each component of LUBAC by isothermal titration calorimetry (ITC). It was demonstrated that gliotoxin binds to HOIP but not to HOIL-1L or SHARPIN.

### Gliotoxin による不可逆的な酵素活性阻害

以上までの検討より、gliotoxin が LUBAC の酵素活性中心である HOIP (699-1072 aa) に結合することが示された。しかし、gliotoxin に含まれるジスルフィド構造や LUBAC の酵素活性中心がシステイン残基であることを考えると、この結合は非共有結合的な相互作用によるものではなく、システイン残基と gliotoxin との間でジスルフィド結合を形成していることが予想される<sup>40</sup>。HOIP と gliotoxin との間に共有結合が形成されるのであれば、その酵素活性阻害は不可逆的なものとなると考えられる。そこで、gliotoxin を作用させた HOIP (699-1072 aa) を幾度もバッファーで洗浄し、その後に改めて酵素アッセイを行い、酵素活性の回復が見られるか否か評価した (Figure 4-2-3)。この結果、一度 gliotoxin で処理した HOIP (699-1072 aa) では、gliotoxin を洗浄した後においてもその酵素活性は回復しなかったため、gliotoxin は不可逆的に酵素活性を阻害していることが示された。この結果は、これら 2 者の間で共有結合が形成されていることを示唆するものであるため、これを支持するためのより詳細な検討を行うこととした。

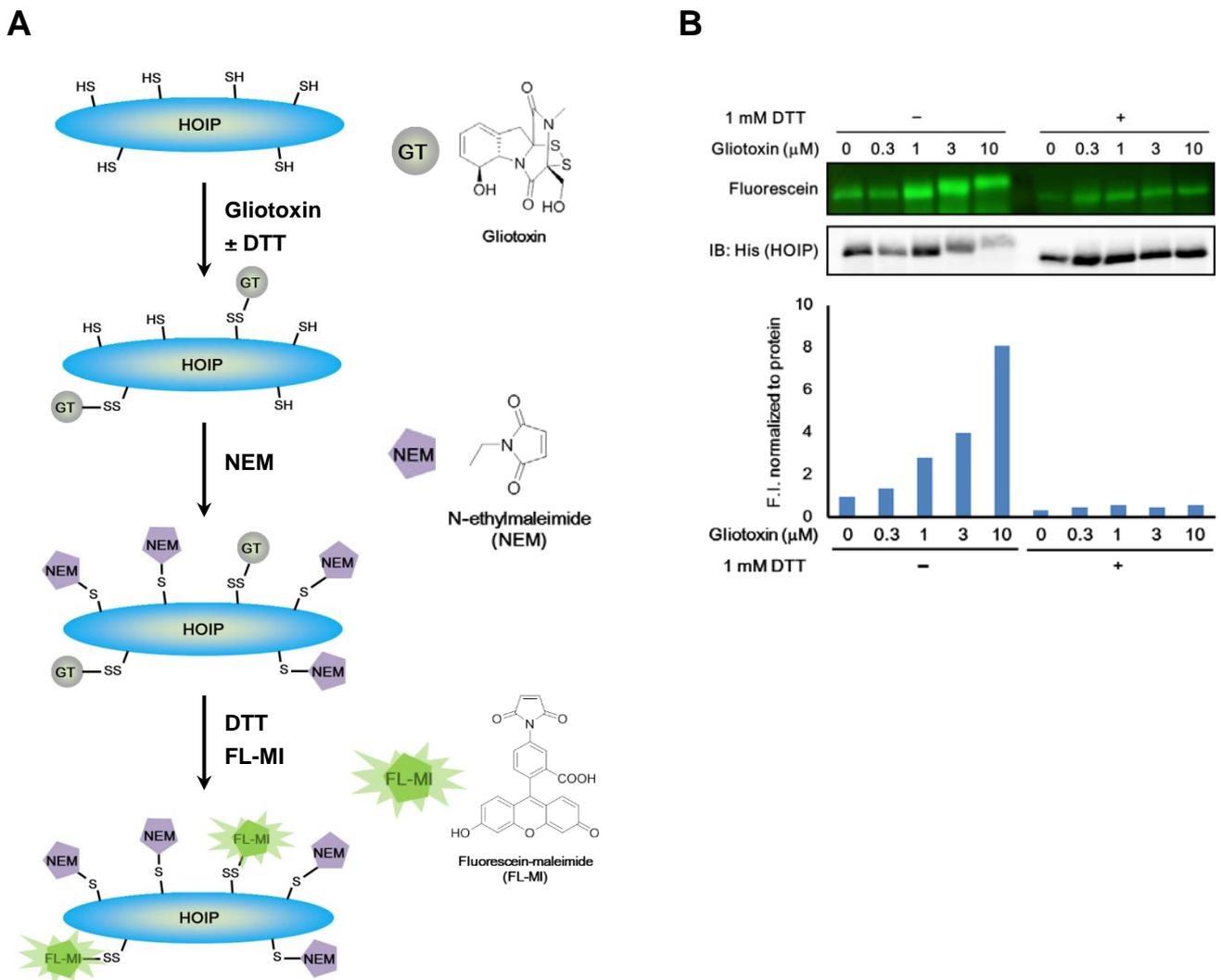


**Figure 4-2-3.** Inhibition assay of HOIP (699-1072)-mediated ubiquitin chain elongation. Enzymatic activity of HOIP (699-1072) was not rescued by washing gliotoxin.

### Gliotoxin と HOIP (699-1072) の共有結合評価

Gliotoxin がタンパク質と共有結合する際には、システイン残基のチオール基を介してジスルフィド結合を形成することが予想される。実際、gliotoxin と結合することが示されている HOIP (699-1072 aa) の領域には合計 28 ものシステイン残基が含まれており、gliotoxin と反応しうる箇所は非常に多い。そこで、gliotoxin がこれらのシステイン残基と共有結合を形成する可能性を以下の実験系により評価した (Figure 4-2-4A)。本評価系では、maleimide がチオール基と特異的に結合する性質を利用する<sup>41</sup>。はじめに、HOIP (699-1072 aa) と gliotoxin とを混合し、そこで gliotoxin と反応していない HOIP (699-1072 aa) のシステイン残基のチオール基を N-ethylmaleimide (NEM) で標識する。Gliotoxin と HOIP との共有結合は、ジスルフィド結合を介していると考えられるため、DTT の添加によりジスルフィド結合を還元して切断し、そこで露出したチオール基に fluorescein maleimide (FL-MI) を結合させる。そのため、gliotoxin が HOIP との間に共有結合を形成した際には、その数に応じて HOIP に標識される蛍光色素の量が増加するため、その蛍光強度を比較することでジスルフィド結合の形成を評価可能と考えられる。本実験系を用いて解析を行ったところ、gliotoxin の濃度依存的に蛍光強度の上昇および分子量の増加が見られた (Figure 4-2-4B)。分子量の変化は標識された FL-MI の個数に応じたものであると考えられ、この結果より gliotoxin が複数 HOIP (699-1072 aa) に共有結合していることが示唆される。しかし、HOIP (699-1072) と gliotoxin を反応させる際に、1 mM DTT も同時に加えておいた系においては蛍光強度や分子量の変化は特に見受けられなかった。また、これまでの *in vitro* における LUBAC の阻害アッセイにおいては、常に系中に 1 mM DTT を加えていた。以上を踏まえると、gliotoxin は HOIP (699-1072 aa) と共有結合を形成し得るものの、共有結合を形成せずとも LUBAC の酵素活性を抑制しているという可能性も想定される。ただし、DTT 非存在下における複数の gliotoxin の共有結合形成は非特異的に起こっており、多数の分子が結合しているために明確な蛍光強度や

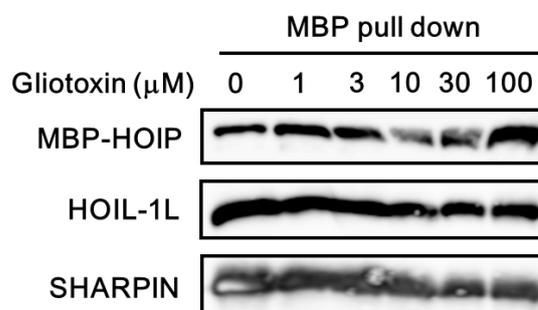
分子量の変化が観察されたものと考えられる。それ故に、1 mM DTT 存在下においては蛍光強度や分子量の変化がほとんど認められずとも、実は酵素活性を阻害するために十分な共有結合が1か所形成されているという可能性も否定できない。以上より、gliotoxinがHOIPと共有結合を形成することにより阻害しているか否かをより深く議論するためには質量分析などの手法により評価を行う必要があると考えられる。



**Figure 4-2-4.** (A) Strategy for evaluation of covalent bond formation between HOIP (699-1072) and gliotoxin. (B) The number of fluorescein conjugated to HOIP (699-1072) was increased by addition of gliotoxin dose-dependently. However, in the presence of 1 mM DTT, conjugation of gliotoxin to HOIP (699-1072) was strongly decreased.

### Gliotoxin による LUBAC の複合体形成への影響

先述のように、HOIP は HOIL-1L や SHARPIN と複合体を形成することで安定な LUBAC として複合体を形成して酵素活性を発揮できるようになる。これまでの検討より、gliotoxin は LUBAC の酵素活性中心である HOIP (699-1072 aa) の領域に結合することで、その酵素活性を阻害することが示唆されているが、gliotoxin が LUBAC の複合体形成にも影響を与える可能性も否定できない。そこで、full-length の HOIP, HOIL-1L, SHARPIN から構成される LUBAC に種々の濃度の gliotoxin を添加した後に、HOIP の N 末端に融合している MBP タグを用いて pull down アッセイを行うことで複合体の形成を評価した (Figure 4-2-5)。この結果、100  $\mu$ M の gliotoxin を加えても複合体の解離が見られなかったことから、gliotoxin による LUBAC の酵素活性阻害は複合体の形成阻害に因るものではないと考えられる。



**Figure 4-2-5.** Evaluation of LUBAC complex formation. LUBAC composed of MBP-tagged HOIP, HOIL-1L and SHARPIN was incubated with gliotoxin at 37 °C for 10 minutes, followed by MBP pull down and immunoblotting of HOIP, HOIL-1L and SHARPIN. Gliotoxin did not inhibit LUBAC complex formation.

### 第3節 他の E3 との選択性の評価

これまで、*in vitro*における gliotoxin の LUBAC に対する作用について詳細な検討を行ってきたが、ここで gliotoxin が LUBAC 以外の酵素に対して影響を与えるか否か評価を行った。先の検討により、ユビキチン化反応を担う E1, E2 および E3 の中において gliotoxin は E1 や E2 ではなく E3 である LUBAC を選択的に阻害することを示したため、続いて、gliotoxin の E3 間における選択性を評価することを目指した。E3 はユビキチン化される基質タンパク質を決定づける酵素であり、現在報告されているだけでもその数は 600 を超え、非常に多様であるが、これらを大別するとその酵素活性中心の構造から HECT 型、RING 型、RING-IBR-RING (RBR) 型の 3 種類に分けられ (Figure 4-3-1)<sup>42</sup>、RING-IBR-RING ドメインを有している LUBAC は RBR 型に分類される。それぞれの性質について概説すると、HECT 型は E2 からユビキチンを受け取り、一時的に自身のシステイン残基にチオエステル構造を介して結合させ、その後改めてそのユビキチンを基質タンパク質へと付加する<sup>43</sup>。RING 型は RING ドメインに E2 を、そして基質認識部位に基質タンパク質をリクルートさせ、E2 から基質タンパク質へと直接ユビキチンの受け渡しをさせるための反応の場として機能する<sup>44</sup>。そして、RBR 型は HECT 型と RING 型の性質を併せ持ったものであり、RING1 ドメインに E2 をリクルートしてから、自身のシステイン残基にユビキチンを結合させ、その後、基質タンパク質へとユビキチンを結合させる<sup>45</sup>。

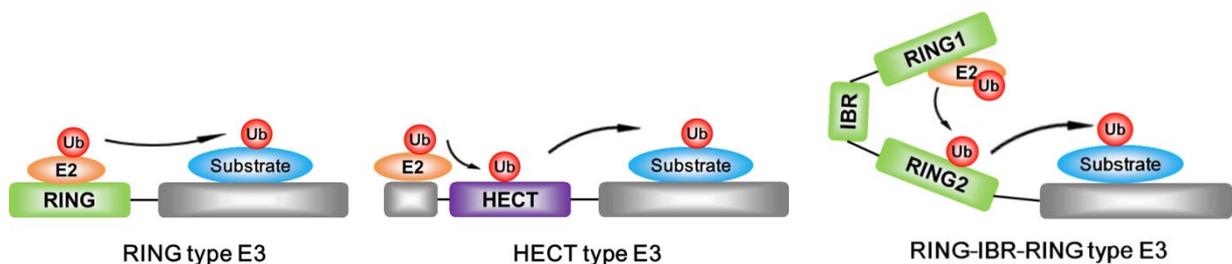
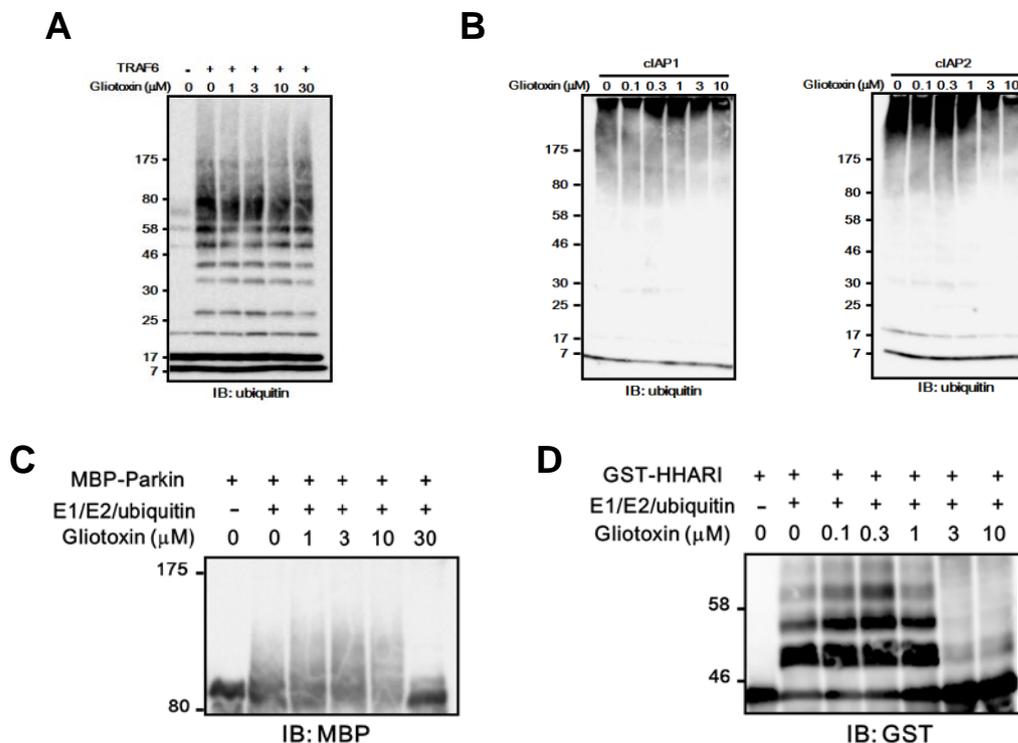


Figure 4-3-1. Schematic representation of ubiquitylation reaction catalyzed by each type of E3.

以上を踏まえ、gliotoxin の各タイプの E3 に対する阻害活性を評価した (Figure 4-3-2)。HECT 型には先の検討に用いた NEDD4 が含まれており、同酵素に対しては gliotoxin を 10  $\mu\text{M}$  まで加えても一切阻害しないことがすでに確認されている。また、RING 型には NF- $\kappa\text{B}$  活性化経路に關与する TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)<sup>46</sup>, cellular inhibitor of apoptosis 1/2 (cIAP1/2)<sup>47</sup> を選択し、gliotoxin による阻害効果を検討したところ、TRAF6 では 30  $\mu\text{M}$  まで gliotoxin を加えても一切阻害が見られず、また cIAP1/2 においても 10  $\mu\text{M}$  gliotoxin を加えてもほとんど阻害が見られなかった。最後に、LUBAC と類似の酵素活性中心を有する RBR 型の E3 である Parkin, HHARI に対する阻害活性を評価した<sup>45, 48</sup>。Gliotoxin は Parkin, HHARI のいずれに対しても阻害能を有していたが、その阻害に必要な濃度は LUBAC 阻害時に比べて高いため、gliotoxin は RBR 型 E3 を広範に阻害するものの、その中でも LUBAC を選択的に阻害する可能性が示唆された。



**Figure 4-3-2.** (A-D) Inhibition assay of TRAF6 (A), cIAP1/2 (B), Parkin (C) and HHARI (D). Gliotoxin did not inhibit RING type E3 non-specifically, and inhibited Parkin and HHARI weakly.

## 第 5 章

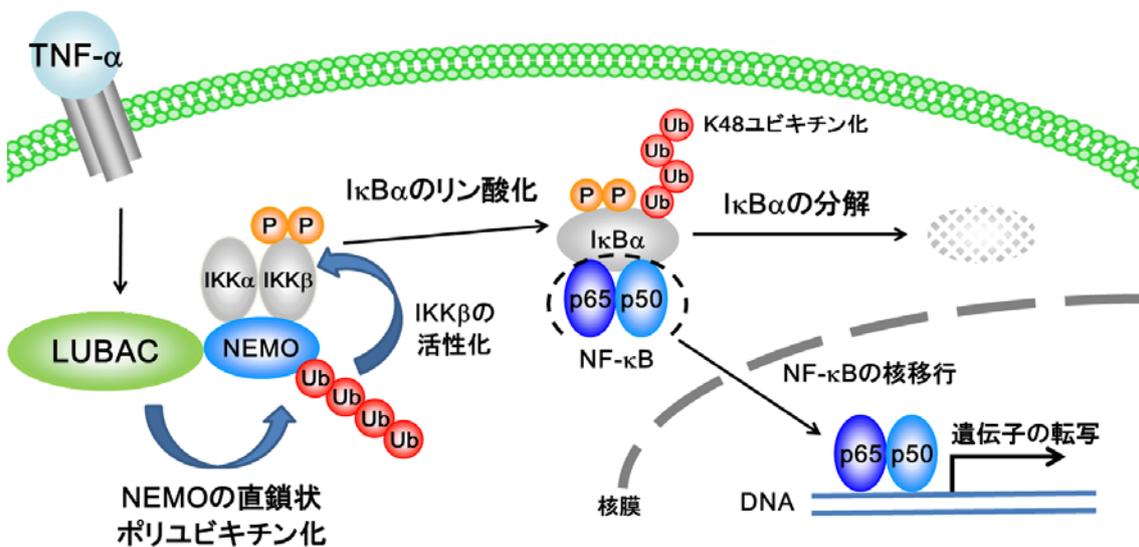
### Gliotoxin の細胞への応用

## 第1節 Gliotoxin による細胞内での LUBAC および NF- $\kappa$ B 活性化阻害

これまでの検討により、LUBAC 阻害剤として見出した gliotoxin は、アスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus fumigatus* などの真菌により産生される二次代謝産物であり、その病原性に関与することが報告されている<sup>49,50</sup>。また、面白いことに、gliotoxin は以前より NF- $\kappa$ B の活性化を阻害する化合物として報告されていたが<sup>51</sup>、同化合物が NF- $\kappa$ B の活性化抑制を惹起する標的分子はこれまで明確にされていなかった。以上より、gliotoxin は LUBAC の阻害を通じて NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが予想されるため、この仮説を証明すべく、まずは gliotoxin が *in vitro* のみならず、細胞内においても LUBAC の酵素活性を阻害することを確認した。

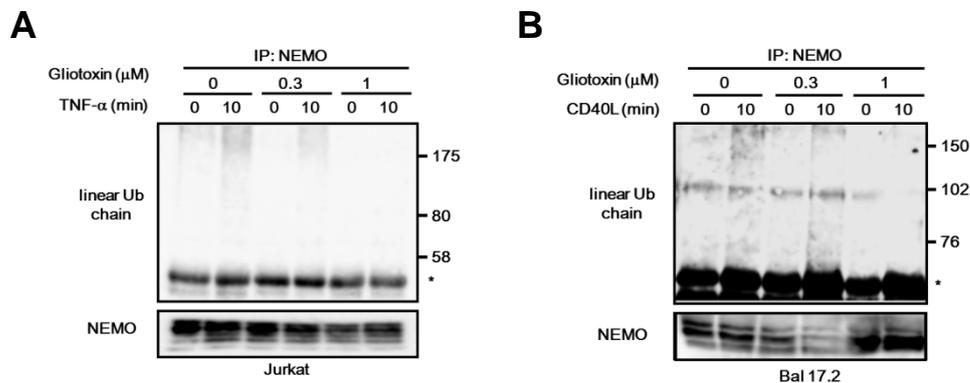
### Glitoxin による LUBAC の酵素活性阻害

以下に、LUBAC を介した古典的な NF- $\kappa$ B の活性化経路を記載する (Figure 5-1-1)<sup>13, 52-54</sup>。未刺激の細胞では、転写因子 NF- $\kappa$ B はその阻害タンパク質である I $\kappa$ B $\alpha$  と結合することで細胞質内に留められているが、細胞に TNF- $\alpha$  や CD40L などの刺激を与えると LUBAC がその基質タンパク質であり、IKK complex の活性調節因子である NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を結合させる。その結果、NF- $\kappa$ B の活性化に重要なキナーゼである IKK complex 中の IKK $\beta$  が活性化される。続いて、I $\kappa$ B $\alpha$  が IKK $\beta$  によりリン酸化され、K48 を介したポリユビキチン化を受けた後にプロテアソームに分解される。そして、I $\kappa$ B $\alpha$  から解放された NF- $\kappa$ B は核内へ移行することができるようになり、DNA と結合することで様々な遺伝子の転写を促進させる。



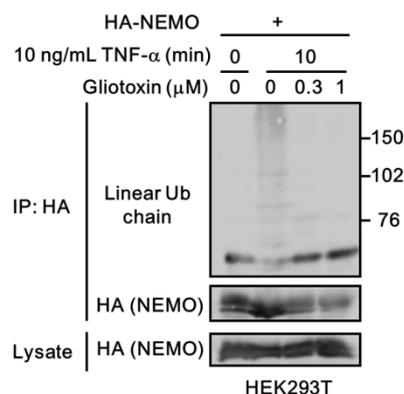
**Figure 5-1-1.** Schematic representation of canonical NF- $\kappa$ B activation pathway induced by TNF- $\alpha$  stimulation.

上記の直鎖状ポリユビキチン鎖が関与する NF- $\kappa$ B 活性化経路を踏まえると、NEMO の直鎖状ポリユビキチン化が細胞内における LUBAC の酵素活性の評価に最適であると考えられるため、これを指標として gliotoxin による LUBAC の阻害を検討した (Figure 5-1-2)。ここでは、まず、ヒト T 細胞株の一種である Jurkat 細胞に TNF- $\alpha$  刺激を加え、その後に NEMO を免疫沈降し、直鎖状ユビキチン鎖を特異的に認識する抗体を用いてイムノブロットティングを行っている。細胞に 10 分間の TNF- $\alpha$  刺激を与えると、NEMO に結合する直鎖状ポリユビキチン鎖の増加が見られるが、gliotoxin 処理によって、これが大きく減少することが確認された。また、マウス B 細胞株の一種である Bal17.2 細胞に、CD40L 刺激を加えた際に見られる NEMO に結合する直鎖状ポリユビキチン鎖も gliotoxin 添加により減少することから、gliotoxin は細胞内においても LUBAC の酵素活性を阻害することが強く示唆された。



**Figure 5-1-2.** (A, B) The amount of linear polyubiquitin chain co-immunoprecipitated with NEMO was strongly decreased by gliotoxin treatment in TNF- $\alpha$ -stimulated Jurkat (A) and CD40L-stimulated Bal17.2 cells.

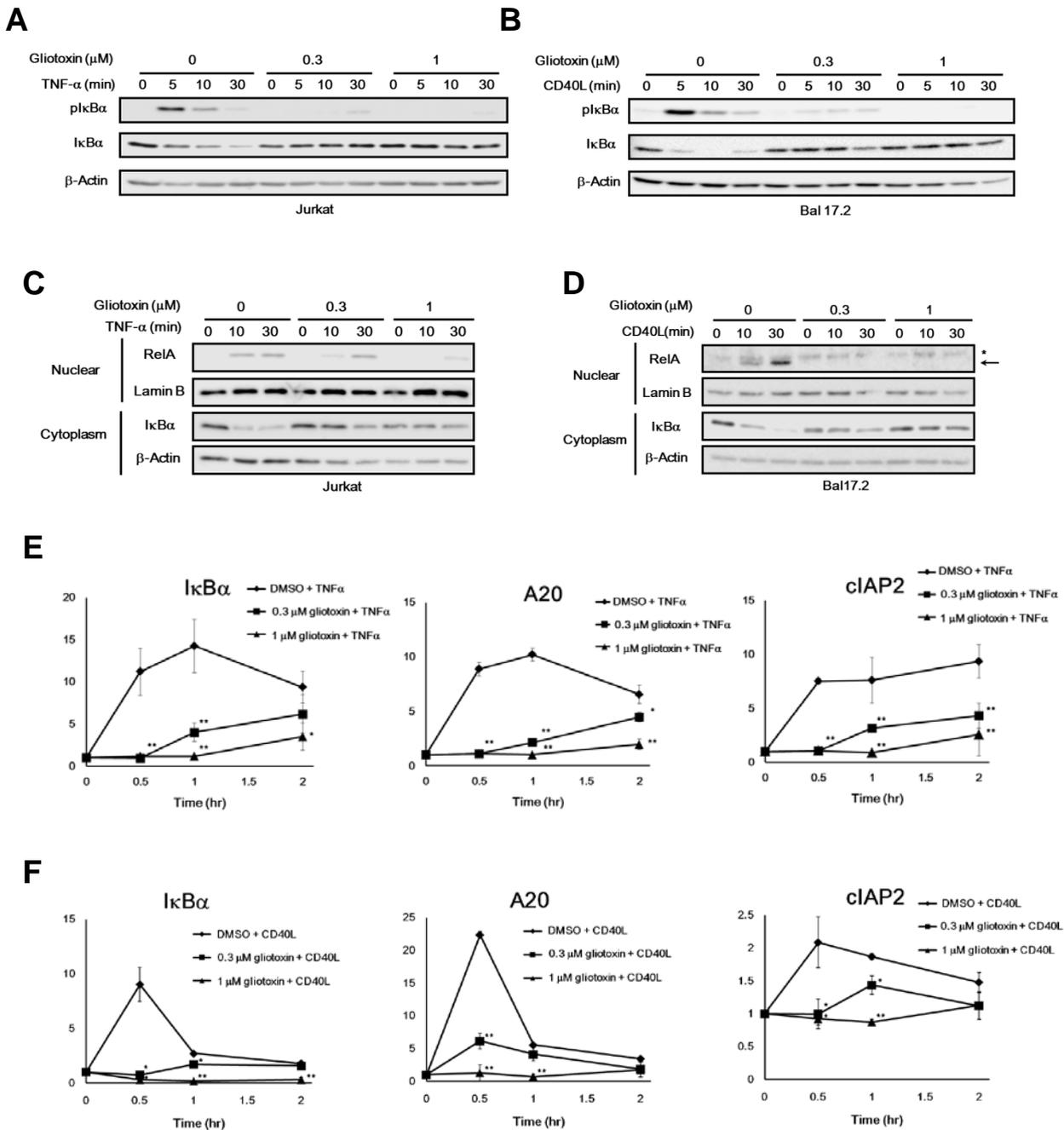
ただし、NEMO は直鎖状ポリユビキチン鎖に高い親和性を有しているため<sup>12</sup>、NEMO の免疫沈降を行った後に検出した直鎖状ポリユビキチン鎖は NEMO に直接共有結合されているものか、それとも NEMO と非共有結合的に相互作用しているものであるのかを区別することができない。そこで、後者の可能性を否定すべく、変性条件下での免疫沈降を行った。具体的には、1% SDS を含むバッファーで細胞を溶解し、さらに 95 °C で熱することにより、ライセート中のタンパク質を変性、そして非共有結合的に相互作用しているタンパク質を解離させた。その後、改めて免疫沈降することにより NEMO に共有結合している直鎖状ポリユビキチン鎖のみを検出した (Figure 5-1-3)<sup>55</sup>。ただし、この検討においてはタンパク質を変性させてしまうために、免疫沈降に用いる抗体が内在性の NEMO を認識できなくなる恐れがあるため、HEK293T 細胞に HA-human NEMO を発現させ、TNF- $\alpha$  で刺激した後に抗 HA タグ抗体を用いて免疫沈降を行っている。この検討の結果、変性条件下で NEMO の免疫沈降を行っても直鎖状ポリユビキチン鎖のシグナルが見られたことから、刺激依存的に NEMO が直鎖状ポリユビキチン化されることが確認された。また、gliotoxin の添加によりそのユビキチン鎖が消失することから、gliotoxin が細胞内においても LUBAC を阻害することがより強く支持された。



**Figure 5-1-3.** Gliotoxin inhibited conjugation of linear polyubiquitin chain to NEMO in TNF- $\alpha$ -stimulated HEK293T cells.

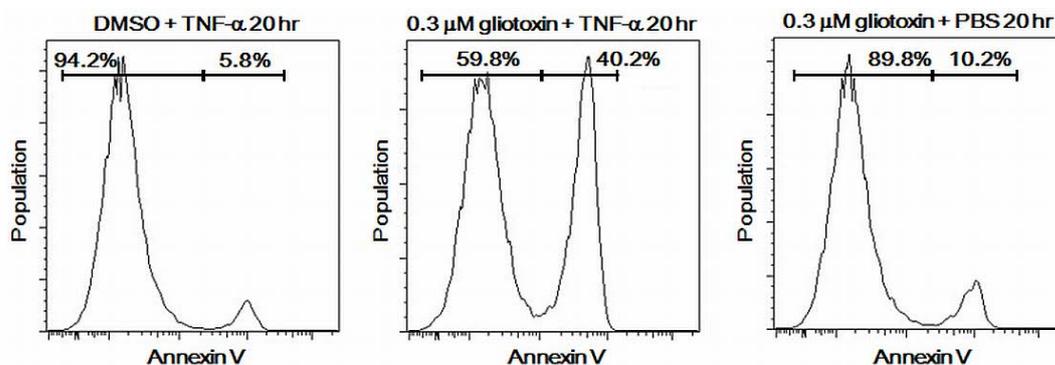
### Gliotoxin による NF- $\kappa$ B 活性化阻害

続いて、gliotoxin による NF- $\kappa$ B の活性化阻害能を検討した。先にも記した通り、NF- $\kappa$ B は未刺激の細胞においては、その阻害タンパク質である I $\kappa$ B $\alpha$ などと結合することで細胞質内に留められ、その転写活性が抑制されている。しかし、細胞が TNF- $\alpha$ や CD40L などの特定の刺激を受けると I $\kappa$ B $\alpha$ が IKK $\beta$ にリン酸化され、続いて K48 ユビキチン鎖を結合された後に、プロテアソームによる分解を受ける。これにより、NF- $\kappa$ B は核内へ移行して、様々な遺伝子の転写を活性化する。以上を踏まえ、以下の3点、「I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化・分解」、「NF- $\kappa$ B の核内移行」、「標的遺伝子の mRNA の定量」を指標として NF- $\kappa$ B の活性化を評価した (Figure 5-1-4)。この検討の結果、TNF- $\alpha$ で刺激した Jurkat 細胞、CD40L で刺激した Bal17.2 細胞のいずれにおいても、gliotoxin の前処理によって I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化・分解、p65 の核内移行、そして NF- $\kappa$ B の標的遺伝子である I $\kappa$ B $\alpha$ , A20, cIAP2 の転写が抑制されたことから、先行研究の報告の通り gliotoxin が NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが改めて確認された。



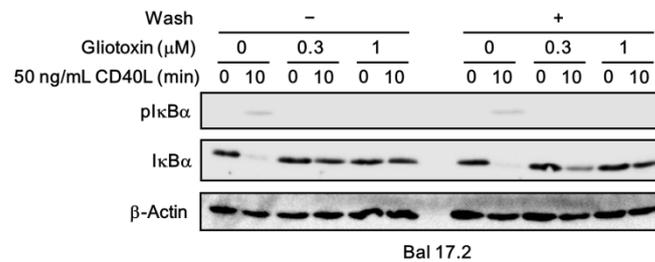
**Figure 5-1-4.** Inhibition assay of NF- $\kappa$ B activation by gliotoxin. (A, B) Gliotoxin inhibited phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  in TNF- $\alpha$ -stimulated Jurkat (A) and CD40L-stimulated Bal17.2 cells (B). (C, D) Gliotoxin inhibited nuclear translocation of RelA in TNF- $\alpha$ -stimulated Jurkat (C) and CD40L-stimulated Bal17.2 cells (D). (E, F) Gliotoxin inhibited transcription of I $\kappa$ B $\alpha$ , A20 and cIAP2 in TNF- $\alpha$ -stimulated Jurkat (E) and CD40L-stimulated Bal17.2 cells (F).

ここで、gliotoxin を用いて NF- $\kappa$ B の活性化を減弱させることにより、細胞の生存を妨げることが可能であるか検討を行った。細胞を TNF- $\alpha$  で刺激すると、先述のような NF- $\kappa$ B 活性化経路と caspase-8 の活性化に至るアポトーシスの経路が同時に進行する<sup>56</sup>。しかし、NF- $\kappa$ B が活性化されると、その細胞死を抑制する機能により通常はアポトーシスがほとんど起こらない。そこで、gliotoxin で細胞を処理した後に、TNF- $\alpha$  で刺激することによりアポトーシスが誘導されるか評価した。細胞死の評価は、アポトーシス時に細胞表面に露出する phosphatidylserine (PS) と高い親和性を有する Annexin V-FITC を用いて、フローサイトメトリーにより行った (Figure 5-1-5)<sup>57</sup>。この結果、TNF- $\alpha$  および 0.3  $\mu$ M gliotoxin を単独で加えてもアポトーシスは起こらないが、gliotoxin を加え、NF- $\kappa$ B を阻害した条件下で TNF- $\alpha$  刺激を加えることで、一部の細胞でアポトーシスが惹起されることが確認された。これは、gliotoxin が NF- $\kappa$ B を阻害し、細胞死抑制の機能を低下させていることを強く支持するものである。



**Figure 5-1-5.** TNF- $\alpha$  induces apoptosis of Jurkat cells in the presence of gliotoxin, whereas apoptosis did not occur when cells were treated with TNF- $\alpha$  or gliotoxin alone.

これまでの検討により、gliotoxin が LUBAC による NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、および NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することが確認された。また、*in vitro* の検討により、gliotoxin は LUBAC を不可逆的に阻害することが示されているため、細胞内においても同様に不可逆的な阻害を示すか NF- $\kappa$ B の活性化を指標に評価した (Figure 5-1-6)。Gliotoxin を加えた Bal17.2 細胞においては、外液を幾度も洗浄しても CD40L 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化は見られなかった。この結果は、gliotoxin が細胞内においても LUBAC を不可逆的に阻害していることを強く示唆するものである。

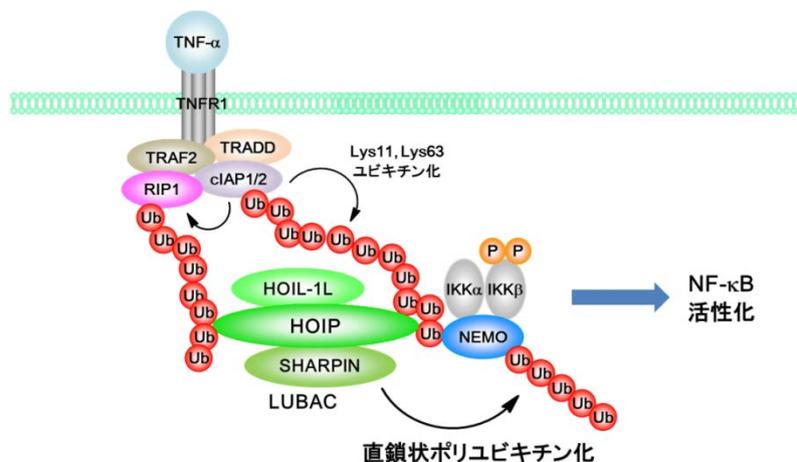


**Figure 5-1-6.** Inhibition assay of NF- $\kappa$ B activation in CD40L-stimulated Bal17.2 cells. Phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  did not occur in gliotoxin-treated cells although cells were washed intensively after the treatment of gliotoxin.

## 第2節 細胞内における gliotoxin の LUBAC に対する選択性の評価

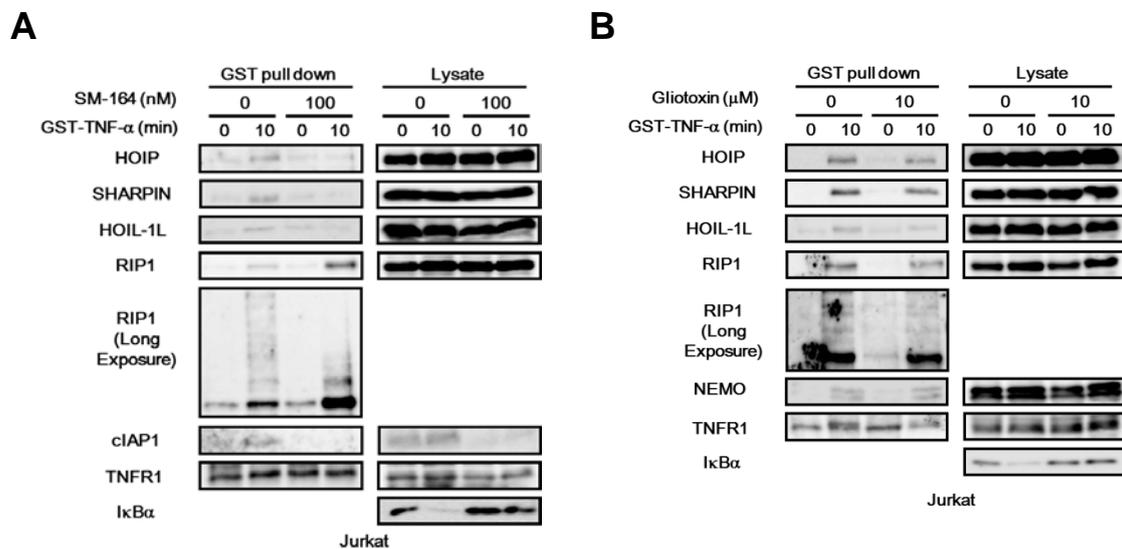
前節にて、gliotoxin を添加することで LUBAC による NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、およびその後の NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されることを示したが、gliotoxin が LUBAC ではなく、LUBAC の活性化に至るまでの上流のシグナル因子も阻害している可能性も否定できない。そこで、gliotoxin が LUBAC の酵素活性を選択的に阻害することで NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することを示すべく、LUBAC の酵素活性化に至るまでのシグナル因子に対する gliotoxin の影響を評価した。

細胞を TNF- $\alpha$  で刺激すると、TRAF2/5, TRADD, cIAP1/2, RIP1 などの様々なタンパク質が TNF receptor 1 (TNFR1) へとリクルートされ、TNF receptor signaling complex (TNFRSC) を形成する (Figure 5-2-1)<sup>56, 58</sup>。すると、この複合体中においてユビキチン E3 である cIAP1/2 が cIAP1/2 自身や RIP1 などのタンパク質に K11, K63 を介するポリユビキチン鎖を付加し<sup>59</sup>、このユビキチン鎖に親和性を有する NEMO や HOIP (LUBAC) がリクルートされる<sup>58</sup>。このようにして、複合体中に取り込まれることで互いの距離が近づき、LUBAC が NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を結合させ、この結果として IKK $\beta$  の活性化が起こり、引き続き NF- $\kappa$ B の活性化に至ると考えられている。



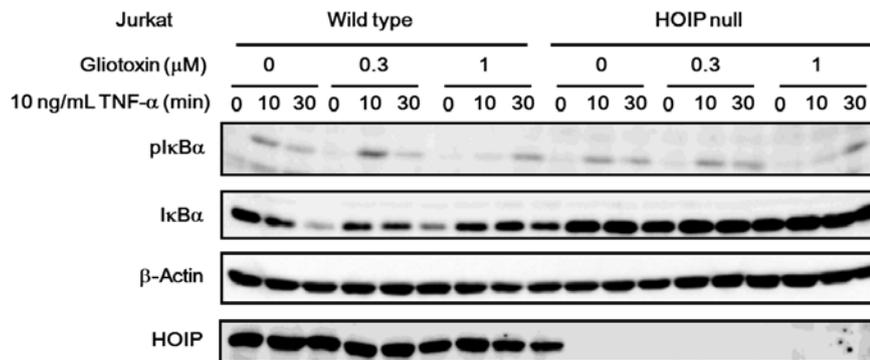
**Figure 5-2-1.** Schematic representation of signaling pathway of LUBAC-mediated linear polyubiquitylation of NEMO induced by TNF- $\alpha$  stimulation.

以上のシグナル経路より、LUBAC が NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を結合させるまでの直前のステップである「TNFRSC への LUBAC と NEMO のリクルート」に、gliotoxin が影響を与えないことが確認されれば、gliotoxin は LUBAC を選択的に阻害していることが間接的に示されると考えられる。そこで、Jurkat 細胞を GST-TNF- $\alpha$  で刺激し、これにより形成される TNFRSC を GST pull down 法により単離した (Figure 5-2-2)。既知の cIAP1/2 の阻害剤である SM-164 (cIAP1/2 の自己ユビキチン化を促し、プロテアソーム依存的な分解へと導くことでその機能を欠失させる<sup>60)</sup> を加えた系においては、LUBAC の TNFRSC へのリクルートが阻害されているのに対し、LUBAC や NF- $\kappa$ B の活性化を阻害するために十分な濃度である 10  $\mu$ M の gliotoxin は TNFRSC の形成には影響を与えないことが確認された。以上の結果より、gliotoxin は LUBAC 活性化に至る上流のシグナル経路には作用せず、LUBAC そのものに対して阻害能を発揮していることが示された。



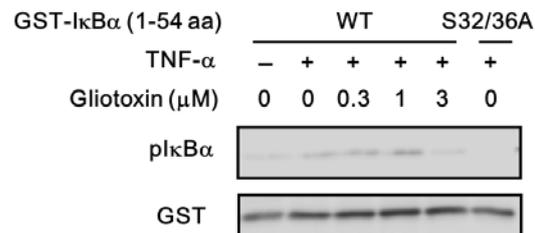
**Figure 5-2-2.** (A, B) Inhibition assay of TNF receptor signaling complex (TNFRSC) formation. HOIP, HOIL-1L and SHARPIN were not recruited to TNFRSC in SM164-treated Jurkat cells (A), whereas 10  $\mu$ M gliotoxin did not affect TNFRSC formation (B).

以上のように、gliotoxin は細胞内において LUBAC を選択的に阻害することで NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが強く示唆されたが、その選択性についてさらに精査すべく、HOIP-null Jurkat 細胞において gliotoxin による NF- $\kappa$ B の活性化がどのように影響を受けるか検討した (Figure 5-2-3)。HOIP-null Jurkat 細胞においては TNF- $\alpha$  刺激依存的な NF- $\kappa$ B の活性化が強く抑制されており、LUBAC の NF- $\kappa$ B 活性化における重要性が改めて強く支持されている。しかし、1  $\mu$ M の gliotoxin で事前に処理することで HOIP-null Jurkat 細胞においても NF- $\kappa$ B の活性化が減弱してしまうことが確認された。



**Figure 5-2-3.** Inhibition assay of TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation in wild-type and HOIP-null Jurkat cells. Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  was slightly diminished by addition of 1  $\mu$ M gliotoxin in HOIP-null Jurkat cells.

以上の検討より、gliotoxin による NF- $\kappa$ B の活性化阻害は LUBAC 以外のシグナル因子の阻害にも起因していることが予想される。そこで、I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を担う IKK $\beta$  が阻害されるか評価すべく、TNF- $\alpha$  刺激によって活性化された IKK $\beta$  を免疫沈降法により単離し、*in vitro* においてキナーゼアッセイを行った (Figure 5-2-4)<sup>13</sup>。この検討の結果、3  $\mu$ M gliotoxin を加えることで、IKK $\beta$  のキナーゼ活性が阻害されることが確認された。そのため、gliotoxin による NF- $\kappa$ B の活性化抑制は IKK $\beta$  の阻害も寄与している可能性が示唆されるが、*in vitro* における LUBAC 阻害の IC<sub>50</sub> = 0.51  $\mu$ M であり、IKK 阻害時よりも低濃度であることから、LUBAC の活性阻害の方が NF- $\kappa$ B の活性化抑制において大きな寄与を果たしていることが示唆される。

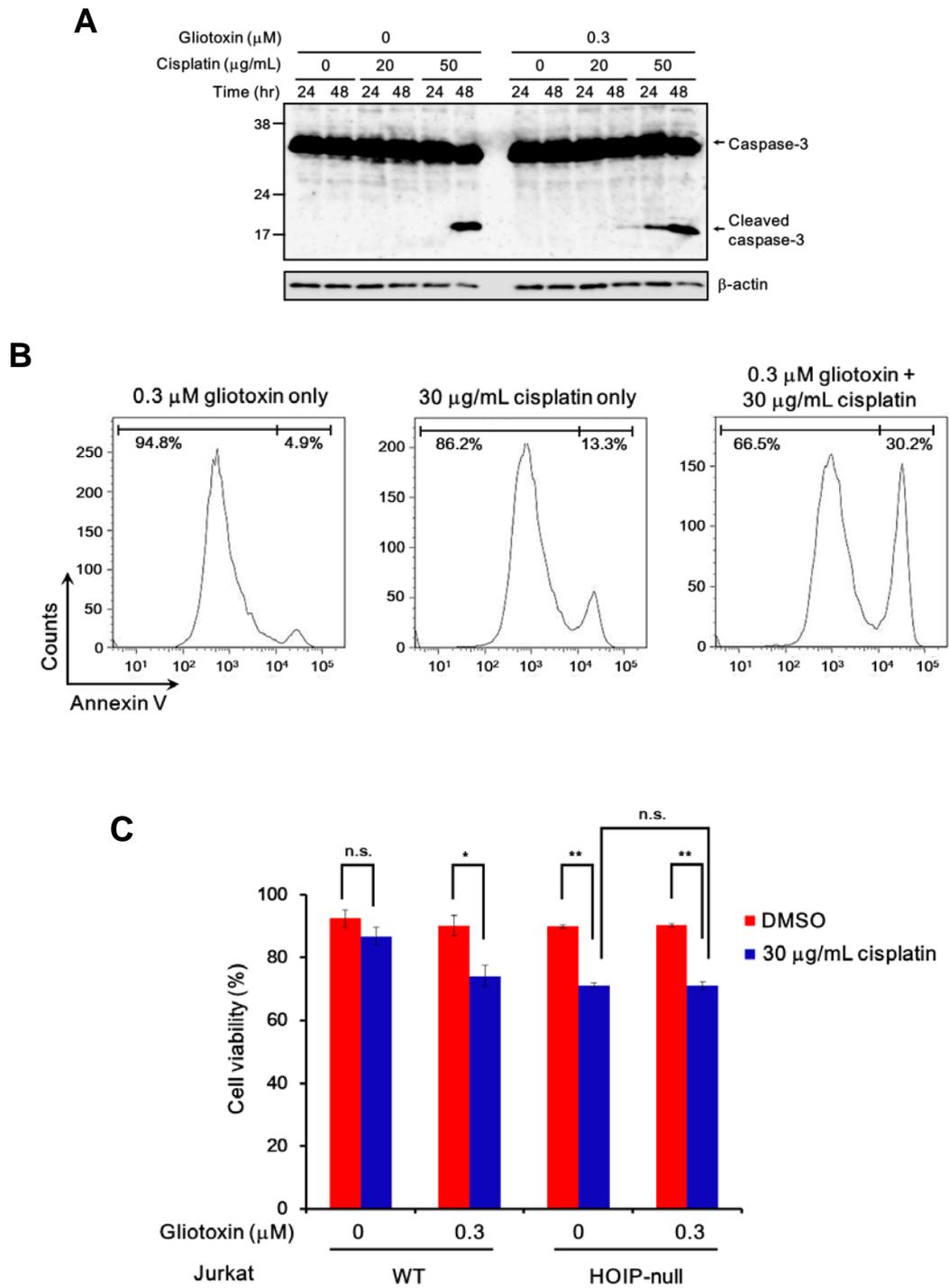


**Figure 5-2-4.** Inhibition assay of IKK $\beta$ -mediated phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ . IKK $\beta$  isolated from TNF- $\alpha$ -stimulated Jurkat cells were inhibited by treatment of 3  $\mu$ M gliotoxin. S32/36A I $\kappa$ B $\alpha$  is a mutant which is not phosphorylated by IKK $\beta$ .

### 第3節 LUBAC 阻害剤を用いた疾患治療への応用

第1章にも述べたように、LUBAC 酵素活性の過剰亢進は様々な疾患に関与することが報告されているため、本研究にて見出した LUBAC 阻害剤 gliotoxin を用いることで疾患治療へと応用可能であるか検討を行った。近年の研究により、LUBAC の酵素活性が抗がん剤 cisplatin に引き起こされる細胞死を抑制することが報告されている<sup>21</sup>。そこで、gliotoxin を用いて LUBAC の酵素活性を抑制することで、cisplatin 依存的なアポトーシス誘導活性を高められるか検討した (**Figure 5-3-1A, B**)。ここでは、caspase-3 の切断および、細胞の Annexin V-FITC の染色によりアポトーシスの評価を行っている。この結果、いずれの評価系においても 0.3  $\mu$ M gliotoxin を単独で加えた群においてはほとんど細胞死は起こらないが、cisplatin と共に加えることでアポトーシスを起こす細胞数の大きな上昇が確認された。

ただし、gliotoxin は高濃度で加えることで細胞毒性を発揮することが知られているため<sup>61, 62</sup>、本検討により導かれた細胞死は LUBAC を阻害したことによる相乗効果ではなく、むしろ gliotoxin と cisplatin の毒性を重ね合わせたことにより起こってしまったものではないかと疑われる。そこで、この可能性を排除すべく、HOIP-null Jurkat 細胞を用いて同様の検討を行った (**Figure 5-3-1C**)。HOIP-null Jurkat 細胞では cisplatin の単独投与時に多くのアポトーシスが認められたことから、LUBAC が cisplatin 耐性の獲得に関与することが改めて示唆された。そして、gliotoxin と cisplatin を併用した群では、cisplatin 単独投与の群と比較して有意な差が見られなかったことから、gliotoxin + cisplatin により導かれるアポトーシスは LUBAC 阻害に起因するものであることが強く示唆された。本結果は、LUBAC の酵素活性阻害が cisplatin との併用によりがんの殺傷能力を高められることを示唆するものであり、LUBAC の創薬標的としての意義を改めて強く支持するものである。



**Figure 5-3-1.** Apoptosis induction in Jurkat cells. (A) Cisplatin-induced cleavage of caspase-3 was increased by gliotoxin co-treatment. (B) The number of Annexin V-binding Jurkat cells (wild type) was increased by co-treatment of gliotoxin and cisplatin. (C) In HOIP-null Jurkat cells, cisplatin-induced apoptosis was not increased by gliotoxin co-treatment. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , error bars show standard deviation ( $n = 3$  each).

## 第6章

### 総括と今後の展望

## 第1節 総括

本研究においては、過剰亢進することにより、がんやアレルギー等の原因となる転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を司る直鎖状ポリユビキチン鎖生成酵素 LUBAC の阻害剤を探索することを目的とし、Tb<sup>3+</sup>錯体および fluorescein で標識したユビキチンを用いて、LUBAC の阻害剤である gliotoxin を見出した。

Gliotoxin は LUBAC の酵素活性中心である human HOIP の 699-1072 aa の領域 (RING-IBR-RING-LDD ドメイン) に結合することでその酵素活性を阻害することが示された。このような特性ゆえに、gliotoxin は LUBAC 以外の RING-IBR-RING 型の E3 である HHARI や Parkin などにも阻害してしまうことが認められ、RBR 型 E3 を広範に阻害する可能性が示唆されたが、他の RBR 型 E3 と比較して低濃度で LUBAC の酵素活性を阻害したことから、gliotoxin は LUBAC に対して選択性を有していると考えられる。また、RBR 型以外の HECT 型や RING 型の E3 に対しては非特異的な阻害活性を有していないことが強く示唆されたことから、同化合物は選択的な LUBAC 阻害剤として十分に有用なツールとなることが期待される。

Gliotoxin は *in vitro* のみならず、細胞内においても LUBAC の酵素活性を選択的に阻害することが認められ、これまでに知られていた gliotoxin の有する NF- $\kappa$ B の活性化阻害能も LUBAC の酵素活性の抑制に起因していることが強く示唆された。以前までの研究により、gliotoxin はプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害することが報告されているため、これが NF- $\kappa$ B の活性化抑制の原因とも疑われていたが、その阻害に必要な濃度が数 10  $\mu$ M と非常に高く<sup>63</sup>、NF- $\kappa$ B 活性化阻害に必要な濃度との一致が見られないことや、プロテアソームによる分解よりも上流のシグナルである I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が阻害されているということを鑑みると、gliotoxin による NF- $\kappa$ B の活性化抑制はプロテアソームの阻害で説明をすることは非常に困難なものと考えられる。

加えて、gliotoxin を LUBAC 阻害剤として用いることで、cisplatin 依存的なアポトーシス誘導活性を高められることが示され、LUBAC の創薬標的としての意義がこれまでより強く示唆される結果となった。

## 第2節 今後の展望

本研究にて作製した Tb-Ub および Fl-Ub は、リジン残基、もしくは N 末端のアミノ基のいずれかにランダムに標識されたものであるため、理論上では、直鎖状ポリユビキチンのみならず、他のリジン残基を介する全ての型のユビキチン鎖を生成することができる。そのため、これらの標識ユビキチンを用いることで、LUBAC に限らず、あらゆるユビキチン鎖生成酵素の阻害剤を探索することが可能であると考えられる。ユビキチンは、本研究にて紹介したプロテアソーム依存的なタンパク質の分解や、NF- $\kappa$ B の活性化などの機能に加え、DNA 修復や膜輸送、そしてオートファジーなど非常に多岐にわたる生理現象に関与するタンパク質であるため、このようなユビキチン化反応を阻害する化合物を探索することで、生命現象の解明や創薬研究の発展などに大きく貢献できることが期待される。

本研究にて、LUBAC 阻害剤と cisplatin との併用により細胞のアポトーシス誘導活性を高められることを示した。また、LUBAC は cisplatin のみならず、etoposide や doxorubicin などの抗がん剤で処理した後も NF- $\kappa$ B の活性化を促し、細胞の生存を助けることが示されていることから、LUBAC 阻害剤と様々な抗がん剤との併用により、その効果を高められることが期待される<sup>64</sup>。これに加え、序論にも記述した通り、LUBAC の酵素活性は転移がんの定着や、特定の B 細胞リンパ腫と関与していることが示唆されているため<sup>19, 20</sup>、これらの疾患にも治療効果が認められるか検討を行っていきたい。

第5章の冒頭にも記した通り、gliotoxin はアスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus fumigatus* などが産生する主要な二次代謝産物で、それらの微生物の主たる病原性因子であることが知られている<sup>36</sup>。NF- $\kappa$ B は宿主の免疫応答の中核を担う転写因子の一つであり、本研究により gliotoxin が LUBAC の酵素活性を阻害することで NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが強く支持されたことから、gliotoxin は LUBAC の活性阻害を通じて宿主の免疫力を減退させ、感染性を向上させている可能性が示唆される。また、LUBAC は細胞死の抑制にも関与しているため、gliotoxin は宿主の細胞死を亢進させることで病原性を発揮している可能性も考えられる。本結果は、*Aspergillus fumigatus* などの真菌感染に対する防御機構において、LUBAC が重要な役割を果たしていることを示唆するものであり、生命における LUBAC の重要性が支持される結果である。また、これまでの研究により、LUBAC の構成因子である HOIP や SHARPIN、HOIL-1L が欠損することで、それぞれ胎生致死<sup>65</sup> や慢性的な全身性皮膚炎<sup>14-16</sup>、そして自己炎症疾患<sup>66</sup> などが惹起されることが報告されており、これらの事実からも LUBAC の生体における重要性が示されている。以上より、LUBAC は魅力的な創薬標的である傍ら、生命の維持において欠かせない因子でもあると言えるため、LUBAC 阻害剤の疾患治療薬への応用研究は慎重に行わなければならないだろう。

## 実験の部

## Materials

Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN, GST-TNF- $\alpha$  (77-233 aa), GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-54 aa), GST-HHARI (177-393 aa), His<sub>6</sub>-Ubc13, His<sub>6</sub>-Uev1a, MBP-Parkin and MBP-HOIP (699-1072 aa)-His<sub>6</sub> were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and purified with appropriate affinity resins, such as Ni-NTA Agarose (Qiagen), Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) or Amylose Resin (New England Biolabs). The vectors for expression of His<sub>6</sub>-TRAF6 and LUBAC, which is composed of HOIL-1L, SHARPIN and His<sub>6</sub>-tagged HOIP, were constructed with BacPAK6 baculovirus expression system (BD Biosciences), and these proteins were expressed in Hi5 insect cells and purified with Ni-NTA Agarose. Antibodies were purchased or supplied as indicated below: anti-ubiquitin (Santa Cruz sc-8017), anti-NEMO for immunoprecipitation (Santa Cruz sc-8310) and for immunoblotting (BIOZOL MBL-K0159-3), anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (Cell Signaling Technology #9246), anti-pI $\kappa$ B $\alpha$  (Cell Signaling Technology #4812), anti- $\beta$ -actin (Santa Cruz sc-47778), anti-RelA (Santa Cruz sc-109), anti-LaminB (Abcam 16048), anti-RIP1 (BD Biosciences 610458), anti-TNFR1 (Santa Cruz sc-8436), anti-HA (Santa Cruz sc-805), anti-MBP (Santa Cruz sc-13564), anti-GST (Santa Cruz sc-459) and anti-caspase-3 (CST #9662). Anti-HOIP, anti-HOIL-1L, anti-SHARPIN and anti-linear ubiquitin chain antibodies were described previously<sup>14, 67</sup>.

## Preparation of Tb-Ub and Fl-Ub

In preparation of Tb-Ub, 3 mM ubiquitin and 3 mM TbITC were mixed in 100 mM NaHCO<sub>3</sub> aqueous, and in preparation of Fl-Ub, 1 mM ubiquitin and 1 mM FITC were mixed in 100 mM NaHCO<sub>3</sub> aqueous and those samples were incubated at 37 °C for 8 hr. Then, labeling reagents those were not conjugated to ubiquitin were removed by gel filtration column chromatography.

## High-throughput screening

In the Petit-LUBAC screening system, enzymes and ubiquitins were mixed on the 384-well plate. The reaction components were: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 2 mM ATP, 0.5% Tween 20 (w/v), 0.1% DMSO (v/v), 2  $\mu$ M each compound, 0.025  $\mu$ M Tb-Ub, 0.05  $\mu$ M Fl-Ub, 1.2  $\mu$ M ubiquitin, 0.4  $\mu$ g/mL E1, 3.5  $\mu$ g/mL UbcH5c

and 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Petit-LUBAC. In the Petit-SHARPIN screening system: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM DTT, 2 mM ATP, 0.5% Tween 20 (w/v), 0.1% DMSO (v/v), 2  $\mu\text{M}$  each compound, 0.025  $\mu\text{M}$  Tb-Ub, 0.1  $\mu\text{M}$  Fl-Ub, 2.8  $\mu\text{M}$  ubiquitin, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  E1, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  UbcH5c and 3.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Petit-SHARPIN. In the NEDD4 screening system: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM DTT, 2 mM ATP, 0.5% Tween 20 (w/v), 0.1% DMSO (v/v), various concentrations of compounds, 0.025  $\mu\text{M}$  Tb-Ub, 0.05  $\mu\text{M}$  Fl-Ub, 0.3  $\mu\text{M}$  ubiquitin, 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  E1, 3.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  UbcH5c and 3.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NEDD4. These reaction solutions were prepared in a volume of 15  $\mu\text{L}$ . Enzymatic reactions were performed at room temperature for 2.5 hr, 5 hr and 3 hr in Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN and NEDD4, respectively. After the enzymatic reaction, 10  $\mu\text{L}$  of 5 M guanidine-HCl aqueous was added to stop the reaction, and then  $F_{520}$  and  $F_{490}$  were measured by time-resolved detection (excitation wavelength; 340 nm, delay time; 50  $\mu\text{s}$ , gate time; 450  $\mu\text{s}$  and flash times; 300 cycles) to evaluate ubiquitin chain elongation. Small chemicals used in this screening were provided by the Open Innovation Center for Drug Discovery, The University of Tokyo. The small molecule library used in this screening is composed of structurally diverse compounds, including natural products. The integrity of these compounds were assessed by LC-MS.

### ***In vitro* ubiquitylation assay**

*In vitro* ubiquitylation reactions were performed as described below, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  E1, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  UbcH5c, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  each E3 and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ubiquitin (SIGMA) were incubated in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 2 mM ATP at 37  $^\circ\text{C}$ , together with cIAP1/2 for 1 hr, Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN, HOIP (699-1072 aa), Parkin, HHARI (177-393 aa) for 2 hr. In TRAF6-mediated ubiquitylation assay, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  E1, 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ubc13 and Uev1a as an E2, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TRAF6 and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ubiquitin were incubated in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 2 mM ATP at 37  $^\circ\text{C}$  for 1 hr. Ubiquitylation reaction products were probed with anti-ubiquitin antibody.

### **Isothermal titration calorimetry**

ITC measurements were performed using an ITC 200 MicroCalorimeter (GE Healthcare). All assays were performed in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% DMSO (v/v) at 25 °C. In the sample cell, 20 µM of proteins were loaded and 500 µM of gliotoxin was filled into syringe. Data were analyzed with the Origin7 software (MicroCal) supplied by the manufacturer.

### **Evaluation of gliotoxin conjugation to HOIP (699-1072)**

HOIP (699-1072) was mixed with various concentrations of gliotoxin in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) in the presence or absence of 1 mM DTT at 37 °C for 30 minutes. Then, gliotoxin which was not conjugated to HOIP (699-1072) was removed by ultrafiltration. To cap free thiol groups, 10 mM N-ethylmaleimide and 1% SDS in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) was added to HOIP (699-1072) and they were incubated at 37 °C for 1 hr, followed by ultrafiltration to remove residual NEM. To cleave disulfide bond between HOIP (699-1072) and gliotoxin, 100 mM DTT in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) was added and they were incubated at 37 °C for 60 min. Residual DTT was removed by ultrafiltration and free thiol groups were capped with 1 mM fluorescein-maleimide. Finally, fluorescence and immunoblotting images were acquired after SDS-PAGE and PVDF membrane transfer.

### **Cell culture**

HOIP-null Jurkat cells were prepared and kindly gifted by Yoshiteru Sasaki and Tadahiko Matsumoto. Jurkat and Bal17.2 cells were cultured in RPMI-1640 (SIGMA) containing 10% fetal bovine serum (v/v), 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin and 60 µM 2-mercaptoethanol at 37 °C in humidified air containing 5% CO<sub>2</sub> (v/v). HEK293T cells were cultured in DMEM (GIBCO) containing 10% fetal bovine serum (v/v), 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin and at 37 °C in humidified air containing 5% CO<sub>2</sub> (v/v)

### **NF- $\kappa$ B activation assay**

Jurkat and Bal17.2 cells treated with DMSO or gliotoxin for 10 minutes were stimulated with 10 ng/mL of recombinant human TNF- $\alpha$  (Promega) or 100 ng/mL of recombinant mouse CD40L (R&D Systems) for the indicated times, respectively. Cells were lysed with buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (w/v), protease inhibitor cocktail (SIGMA), 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) and then pI $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\alpha$  were probed by means of western blot.  $\beta$ -actin was detected as an internal control. For fractionation of nucleus and cytoplasm, cells were separated using NE-PER<sup>®</sup> Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo) and nuclear translocation of RelA was evaluated by immunoblotting. LaminB was used as a loading control for nuclear fraction.

### **NEMO linear ubiquitylation assay in cells**

Jurkat and Bal17.2 cells treated with DMSO or gliotoxin for 10 minutes were stimulated with 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  or CD40L for 10 minutes, respectively. Cells were lysed with buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (w/v), protease inhibitor cocktail, 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, phosphatase inhibitor cocktail. Then, lysates were incubated with anti-NEMO antibody on ice for 1 hr, followed by incubation with rmp Protein A Sepharose<sup>™</sup> Fast Flow (GE Healthcare) at 4 °C for 1 hr. After intensive washing of the beads with buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (w/v), proteins conjugated to the beads were eluted with 2x SDS-PAGE sample buffer and probed with anti-linear ubiquitin chain and anti-NEMO antibodies. To confirm the linear ubiquitin chain is conjugated to NEMO covalently, HEK293T cells were transfected with HA-human NEMO-expressing vector and then stimulated with 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  for 10 minutes in the presence or absence of gliotoxin. After the stimulation, cells were lysed with PBS containing 1% SDS (w/v) and heated at 95 °C for 10 minutes. Lysates were sheared with a 25-gauge needle and centrifuged at 15,000 rpm. The supernatant was collected and incubated with anti-HA tag antibody on ice for 1 hr, followed by incubation with rmp Protein A Sepharose<sup>™</sup> at 4 °C for 1 hr. After intensive washing of the beads, proteins conjugated to beads were eluted with 2x SDS-PAGE sample buffer and probed with anti-linear ubiquitin chain and anti-HA tag antibodies.

## Real-time RT-PCR

Jurkat and Bal17.2 cells treated with DMSO or gliotoxin were stimulated with 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  or 100 ng/mL of CD40L for the indicated times, respectively. Then, total RNA was isolated with an RNeasy Minikit (Qiagen) and cDNA was generated by using a High Capacity RNA-to cDNA Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed in the presence of SYBR® Green (Applied Biosystems) and relative abundance of cDNA was calculated by the comparative Ct method ( $\Delta\Delta Ct$ ).  $\beta$ -actin was used as an internal control. Primers used for real-time PCR were listed below.

Primer	Sequence, 5'-3'
Human I $\kappa$ B $\alpha$ F	TCCACTCCATCCTGAAGGCTAC
Human I $\kappa$ B $\alpha$ R	CAAGGACACCAAAAGCTCCACG
Human A20 F	CTCAACTGGTGTGCGAGAAGTCC
Human A20 R	TTCCTTGAGCGTGCTGAACAGC
Human cIAP2 F	GCTTTTGCTGTGATGGTGGACTC
Human cIAP2 R	CTTGACGGATGAACTCCTGTCC
Human $\beta$ -actin F	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
Human $\beta$ -actin R	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
Mouse I $\kappa$ B $\alpha$ F	GCCAGGAATTGCTGAGGCACTT
Mouse I $\kappa$ B $\alpha$ R	GTCTGCGTCAAGACTGCTACAC
Mouse A20 F	AGCAAGTGCAGGAAAGCTGGCT
Mouse A20 R	GCTTTCGCAGAGGCAGTAACAG
Mouse cIAP2 F	GGACATTAGGAGTCTTCCCACAG
Mouse cIAP2 R	GAACACGATGGATACTCTCGG
Mouse $\beta$ -actin F	CATTGCTGACAGGATGCAGAAG
Mouse $\beta$ -actin R	TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

### **TNF receptor signaling complex (TNFRSC) isolation**

Jurkat cells treated with DMSO or gliotoxin (10 minutes) or SM-164 (1 hr) were stimulated with GST-TNF- $\alpha$  for 10 minutes, followed by lysis with buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 0.2% NP-40 (w/v). Then, the lysates were incubated with glutathione Sepharose<sup>TM</sup> at 4 °C for 30 minutes. Beads were washed intensively with buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (w/v) and the TNFRSC were eluted with 2x SDS-PAGE sample buffer and probed with the indicated antibodies.

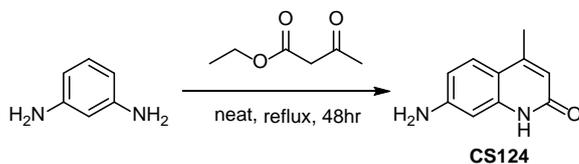
### **In vitro IKK assay**

Jurkat cells stimulated with 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  for 10 minutes in the presence or absence of gliotoxin were lysed with buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (w/v) and then NEMO was immunoprecipitated with anti-NEMO antibody and rmp protein A Sepharose<sup>TM</sup>. After intensive washing, beads were suspended in the buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>. The anti-NEMO immunoprecipitates were incubated with 5 mg/mL of wild-type or S32/36A GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-54 aa) in 20  $\mu$ L of reaction buffer composed of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP at 30 °C for 30 minutes in the presence or absence of gliotoxin, followed by immunoblotting with anti-pI $\kappa$ B $\alpha$  antibody.

### **Apoptosis induction assay**

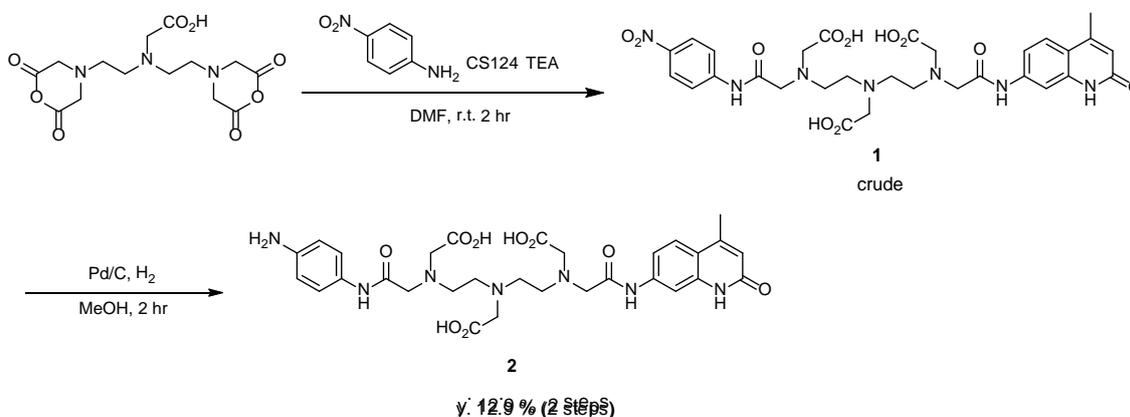
Jurkat cells were treated with DMSO or 0.3  $\mu$ M gliotoxin for 10 minutes, and then DMSO or cisplatin or TNF- $\alpha$  were added to the cells and incubated for 48 hr. Cells were stained with FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol, cells were analyzed with a BD FACSCanto<sup>TM</sup> II (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo version 9.5.3. Also, apoptosis of Jurkat cells were detected by cleavage of caspase-3. After the treatment of DMSO or gliotoxin or cisplatin, cells were lysed with buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (w/v), and then, caspase-3 was probed by means of western blot.

## Synthesis of CS124



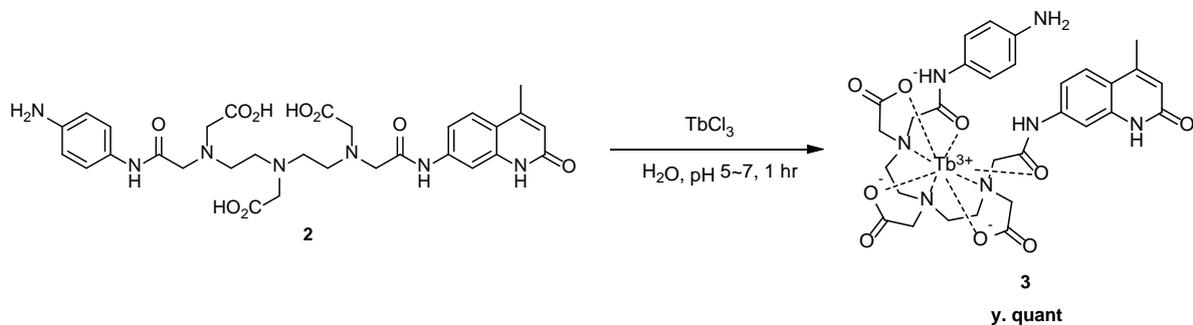
m-phenylenediamine (2.44 g, 22.6 mmol) was dissolved in ethyl acetoacetate (2.88 mL, 226 mmol) and the solution was refluxed for 12 hr. After the reaction, there was deep brown solid in flask. Washing the solid with dichloromethane gave 2.44 g of light brown solid (y. 62%). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2.28 (s, 3H), 5.75 (s, 2H), 5.94 (s, 1H), 6.36 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 6.46 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, 8.6 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 11.14 (s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 18.5, 96.8, 110.4, 114.7, 125.5, 140.8, 147.9, 151.5, 162.3. LRMS (ESI<sup>+</sup>): 197 [M+Na]<sup>+</sup>

## Synthesis of 2



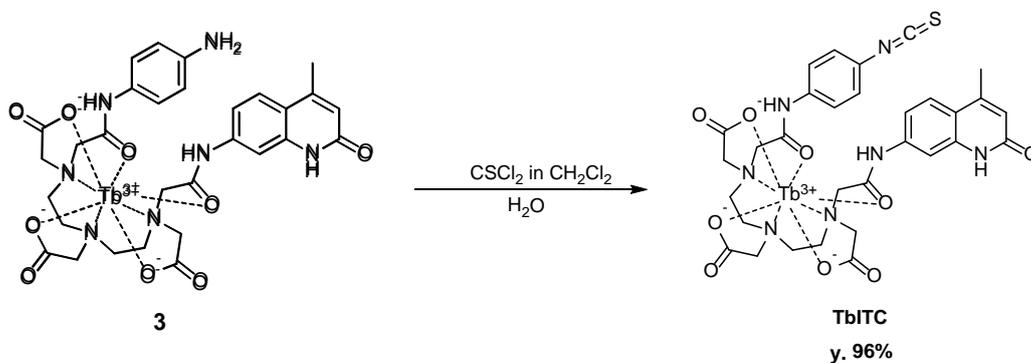
Diethylene triamine pentaacetic acid dianhydride (1.4 g, 3.9 mmol) was dissolved in DMF and triethylamine (catalytic quantity) was added. To the solution, CS124 (680 mg, 3.9 mmol) and p-nitroaniline (640 mg, 4.6 mmol) in DMF were added dropwise, then the resulting mixture was stirred at room temperature for 2 hr. After the reaction, the solution was concentrated *in vacuo* and the residue was purified to some extent by HPLC (A:B = 90:10 to 60:40 in 60 minutes) and crude compound **1** was afforded. The crude **1** was dissolved in MeOH and Pd/C was added to the solution. Then, the flask was filled up with hydrogen gas and the solution was stirred at room temperature for 12 hr. Pd/C was removed by filtration and the filtrate was concentrated under reduced pressure. Purification by HPLC (A:B = 99:1 to 70:30 in 60 minutes) gave 325 mg of white solid (y. 12.9 %, 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 2.21 (s, 3H), 3.28 (s, 8H), 3.59 (d, 6H, *J* = 17.6 Hz), 3.80 (d, 4H, *J* = 15.4 Hz), 6.17 (s, 1H), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.07 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.12 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.33 (s, 1H), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 18.7, 43.2, 52.1, 52.2, 52.8, 54.9, 56.2, 56.4, 57.7, 58.3, 107.1, 116.5, 117.8, 118.1, 118.3, 121.7, 123.8, 126.1, 126.4, 137.6, 137.7, 139.2, 151.9, 164.6, 167.6, 168.7, 172.2, 172.8. LRMS (ESI<sup>+</sup>): 640 [M+H]<sup>+</sup>

### Synthesis of **3**



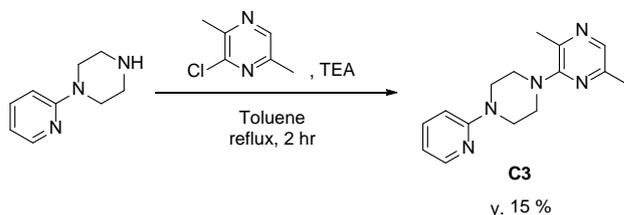
Compound **2** (28 mg, 0.044 mmol) was dissolved in H<sub>2</sub>O and TbCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (18 mg, 0.048 mmol) in H<sub>2</sub>O was added and stirred at room temperature for 1 hr. Then, the solution was concentrated and the residue was purified with Chelex 100 (Bio-Rad). Removing solvent by freeze-dry gave 35 mg of white solid (y. quant.). HRMS (ESI<sup>+</sup>): m/z calculated for C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>Tb [M+H]<sup>+</sup>; 796.17497, found; 796.17339 (-1.58 mmu)

### Synthesis of TbITC



Compound **4** (28 mg, 0.035 mmol) was dissolved in H<sub>2</sub>O and thiophosgene (50 μL, 0.51 mmol) in 3 mL of dichloromethane was added dropwise and stirred at room temperature for 1 hr. This solution was extracted with H<sub>2</sub>O and aqueous layer was dried up and 27 mg of white solid was afforded (96 %). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>Tb [M+H]<sup>+</sup>; 838.13139, found; 838.13503 (+3.64 mmu)

## Synthesis of **C3**



1-(2-pyridyl)piperazine (273.0 mg, 1.68 mmol) and 3-chloro-2, 5-dimethyl pyrazine (113.3 mg, 0.79 mmol) were dissolved in toluene and catalyst quantity of triethylamine was added. The reaction mixture was refluxed for 12 hr and solvent was removed under reduced pressure. The residue was extracted with 2 N HCl and then 2 N NaOH was added to the extract to be basic and the solution was extracted with dichloromethane. Combined organic layers were concentrated and purified by flash column chromatography with NH silica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 100 : 0 to 90 : 10), and 32 mg of light yellow solid was afforded (y. 15 %).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.42 (s, 3H), 2.52 (s, 3H), 3.33 (t, 4H,  $J = 5.1$  Hz), 3.69 (t, 4H,  $J = 5.1$  Hz), 6.64-6.67 (m, 1H), 6.72 (d, 1H,  $J = 9$  Hz), 7.52 (m, 1H), 7.95 (s, 1H), 8.23 (dd, 1H,  $J = 5.1$  Hz, 1.5 Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20.9, 21.4, 45.3, 107.3, 113.6, 136.1, 137.5, 143.2, 148.0, 148.3, 156.4, 159.7. LRMS (ESI<sup>+</sup>): 270 [M+H]<sup>+</sup>

## Credit

The figures below were reprinted with permission from " Sakamoto, H., Egashira, S., Saito, N., Kirisako, T., Miller, S., Sasaki, Y., Matsumoto, T., Shimonishi, M., Komatsu, T., Terai, T., Ueno, T., Hanaoka, K., Kojima, H., Okabe, T., Wakatsuki, S., Iwai, K., and Nagano, T. (2014) Gliotoxin Suppresses NF-kappaB Activation by Selectively Inhibiting Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC), *ACS chemical biology*. DOI: 10.1021/cb500653y." Copyright © 2014, American Chemical Society.

**Figures 2-1-4, 2-3-8, 3-3-2, 4-1-1, 4-1-2, 4-2-1, 4-2-2, 4-3-2, 5-1-2, 5-1-3, 5-1-4, 5-1-5, 5-2-1, 5-2-2, 5-2-4.**

## 参考文献

1. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system, *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.
2. Chen, Z. J., and Sun, L. J. (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling, *Molecular cell* 33, 275-286.
3. Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation, *Cell* 137, 133-145.
4. Ikeda, F., and Dikic, I. (2008) Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series, *EMBO reports* 9, 536-542.
5. 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, *The EMBO journal* 25, 4877-4887.
6. 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-kappaB activation, *Nature cell biology* 11, 123-132.
7. Ye, Y., and Rape, M. (2009) Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work, *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 755-764.
8. Li, Q., and Verma, I. M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system, *Nature reviews. Immunology* 2, 725-734.
9. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit, *Nature reviews. Cancer* 2, 301-310.
10. Ghosh, S., and Hayden, M. S. (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation, *Nature reviews. Immunology* 8, 837-848.
11. Luo, J. L., Kamata, H., and Karin, M. (2005) IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy, *The Journal of clinical investigation* 115, 2625-2632.
12. 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-kappaB activation, *Cell* 136, 1098-1109.
13. Fujita, H., Rahighi, S., Akita, M., Kato, R., Sasaki, Y., Wakatsuki, S., and Iwai, K. (2014) Mechanism underlying IkappaB kinase activation mediated by the linear ubiquitin chain assembly complex, *Molecular and cellular biology* 34, 1322-1335.

14. 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-kappaB-activating linear ubiquitin chain assembly complex, *Nature* *471*, 633-636.
15. Ikeda, F., Deribe, Y. L., Skanland, S. S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S. J., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J. P., Schaefer, L., Rittinger, K., Macek, B., and Dikic, I. (2011) SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis, *Nature* *471*, 637-641.
16. Gerlach, B., Cordier, S. M., Schmukle, A. C., Emmerich, C. H., Rieser, E., Haas, T. L., Webb, A. I., Rickard, J. A., Anderton, H., Wong, W. W., Nachbur, U., Gangoda, L., Warnken, U., Purcell, A. W., Silke, J., and Walczak, H. (2011) Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling, *Nature* *471*, 591-596.
17. Smit, J. J., Monteferrario, D., Noordermeer, S. M., van Dijk, W. J., van der Reijden, B. A., and Sixma, T. K. (2012) The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension, *The EMBO journal* *31*, 3833-3844.
18. Smit, J. J., van Dijk, W. J., El Atmioui, D., Merckx, R., Ovaa, H., and Sixma, T. K. (2013) Target specificity of the E3 ligase LUBAC for ubiquitin and NEMO relies on different minimal requirements, *The Journal of biological chemistry* *288*, 31728-31737.
19. Yang, Y., Schmitz, R., Mitala, J., Whiting, A., Xiao, W., Ceribelli, M., Wright, G. W., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Rosenwald, A., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Braziel, R. M., Tubbs, R. R., Cook, J. R., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., Wiestner, A., Kruhlak, M. J., Iwai, K., Bernal, F., and Staudt, L. M. (2014) Essential role of the linear ubiquitin chain assembly complex in lymphoma revealed by rare germline polymorphisms, *Cancer discovery* *4*, 480-493.
20. Tomonaga, M., Hashimoto, N., Tokunaga, F., Onishi, M., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Iwai, K. (2012) Activation of nuclear factor-kappa B by linear ubiquitin chain assembly complex contributes to lung metastasis of osteosarcoma cells, *International journal of oncology* *40*, 409-417.
21. Mackay, C., Carroll, E., Ibrahim, A. F., Garg, A., Inman, G. J., Hay, R. T., and Alpi, A. F. (2014) E3 ubiquitin ligase HOIP attenuates apoptotic cell death induced by cisplatin, *Cancer research* *74*, 2246-2257.
22. Madiraju, C., Welsh, K., Cuddy, M. P., Godoi, P. H., Pass, I., Ngo, T., Vasile, S.,

- Sergienko, E. A., Diaz, P., Matsuzawa, S., and Reed, J. C. (2012) TR-FRET-based high-throughput screening assay for identification of UBC13 inhibitors, *Journal of biomolecular screening* 17, 163-176.
23. Goldenberg, S. J., Marblestone, J. G., Mattern, M. R., and Nicholson, B. (2010) Strategies for the identification of ubiquitin ligase inhibitors, *Biochemical Society transactions* 38, 132-136.
  24. Förster, T. (1959) 10th Spiers Memorial Lecture. Transfer Mechanisms of Electronic Excitation, *Discussions of the Faraday Society* 27, 7-17.
  25. Erickson, J. W., Mittal, R., and Cerione, R. A. (1995) Use of resonance energy transfer to determine the proximity of the guanine nucleotide binding site of transducin relative to a conformationally-sensitive site on the gamma subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase, *Biochemistry* 34, 8693-8700.
  26. Emami-Nemini, A., Roux, T., Leblay, M., Bourrier, E., Lamarque, L., Trinquet, E., and Lohse, M. J. (2013) Time-resolved fluorescence ligand binding for G protein-coupled receptors, *Nature protocols* 8, 1307-1320.
  27. Sakamoto, H., Egashira, S., Saito, N., Kirisako, T., Miller, S., Sasaki, Y., Matsumoto, T., Shimonishi, M., Komatsu, T., Terai, T., Ueno, T., Hanaoka, K., Kojima, H., Okabe, T., Wakatsuki, S., Iwai, K., and Nagano, T. (2014) Gliotoxin Suppresses NF-kappaB Activation by Selectively Inhibiting Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC), *ACS chemical biology*.
  28. Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J. H., Downs, C. M., and Metcalf, T. G. (1958) Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum, *The American journal of pathology* 34, 1081-1097.
  29. Pinghua, G., and Selvin, P. R. (2004) Carbostyryl Derivatives as Antenna Molecules for Luminescent Lanthanide Chelates, *Bioconjugate Chemistry* 15, 1088-1094.
  30. Rashid, F., Sharma, S., and Bano, B. (2005) Comparison of guanidine hydrochloride (GdnHCl) and urea denaturation on inactivation and unfolding of human placental cystatin (HPC), *The protein journal* 24, 283-292.
  31. Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J. J., and Kumar, T. K. (2009) Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate, *Protein science : a publication of the Protein Society* 18, 980-993.
  32. Sjöback, R., Nygren, J., and Kubista, M. (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein, *Spectrochimica Acta Part A* 51, L7-L21.
  33. Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening

- Assays, *Journal of biomolecular screening* 4, 67-73.
34. Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R. M., Tsai, Y. C., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., Pierre, S. A., Jensen, J. P., Davydov, I. V., Oberoi, P., Li, C. C., Kenten, J. H., Beutler, J. A., Vousden, K. H., and Weissman, A. M. (2007) Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics, *Cancer research* 67, 9472-9481.
  35. Wang, X., Trotman, L. C., Koppie, T., Alimonti, A., Chen, Z., Gao, Z., Wang, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P. P., and Jiang, X. (2007) NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN, *Cell* 128, 129-139.
  36. Waring, P., and Beaver, J. (1996) Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines, *General pharmacology* 27, 1311-1316.
  37. Dove, K. K., and Klevit, R. E. (2012) RING-between-RINGs--keeping the safety on loaded guns, *The EMBO journal* 31, 3792-3794.
  38. Stieglitz, B., Morris-Davies, A. C., Koliopoulos, M. G., Christodoulou, E., and Rittinger, K. (2012) LUBAC synthesizes linear ubiquitin chains via a thioester intermediate, *EMBO reports* 13, 840-846.
  39. Pierce, M. M., Raman, C. S., and Nail, B. T. (1999) Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions, *Methods* 19, 213-221.
  40. Waring, P., Sjaarda, A., and Lin, Q. H. (1995) Gliotoxin inactivates alcohol dehydrogenase by either covalent modification or free radical damage mediated by redox cycling, *Biochemical Pharmacology* 49, 1195-1201.
  41. Hill, B. G., Reily, C., Oh, J. Y., Johnson, M. S., and Landar, A. (2009) Methods for the determination and quantification of the reactive thiol proteome, *Free radical biology & medicine* 47, 675-683.
  42. Berndsen, C. E., and Wolberger, C. (2014) New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism, *Nature structural & molecular biology* 21, 301-307.
  43. Bernassola, F., Karin, M., Ciechanover, A., and Melino, G. (2008) The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development, *Cancer cell* 14, 10-21.
  44. Deshaies, R. J., and Joazeiro, C. A. (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases, *Annual review of biochemistry* 78, 399-434.
  45. Wenzel, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. S., and Klevit, R. E. (2011) UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids, *Nature* 474, 105-108.
  46. Xia, Z. P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W., and Chen, Z. J. (2009) Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains,

- Nature* 461, 114-119.
47. Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Mrad, R. L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., Mak, T. W., Lacasse, E. C., Waring, J., and Korneluk, R. G. (2008) Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11778-11783.
  48. Riley, B. E., Lougheed, J. C., Callaway, K., Velasquez, M., Brecht, E., Nguyen, L., Shaler, T., Walker, D., Yang, Y., Regnstrom, K., Diep, L., Zhang, Z., Chiou, S., Bova, M., Artis, D. R., Yao, N., Baker, J., Yednock, T., and Johnston, J. A. (2013) Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases, *Nature communications* 4, 1982.
  49. Spikes, S., Xu, R., Nguyen, C. K., Chamilos, G., Kontoyiannis, D. P., Jacobson, R. H., Ejzykiewicz, D. E., Chiang, L. Y., Filler, S. G., and May, G. S. (2008) Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence, *The Journal of infectious diseases* 197, 479-486.
  50. Bok, J. W., Chung, D., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Kirby, K. A., and Keller, N. P. (2006) GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence, *Infection and immunity* 74, 6761-6768.
  51. Pahl, H. L., Krauss, B., Schulze-Osthoff, K., Decker, T., Traenckner, E. B., Vogt, M., Myers, C., Parks, T., Warring, P., Muhlbacher, A., Czernilofsky, A. P., and Baeuerle, P. A. (1996) The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- $\kappa$ B, *The Journal of experimental medicine* 183, 1829-1840.
  52. Iwai, K. (2012) Diverse ubiquitin signaling in NF- $\kappa$ B activation, *Trends in cell biology* 22, 355-364.
  53. Iwai, K., Fujita, H., and Sasaki, Y. (2014) Linear ubiquitin chains: NF- $\kappa$ B signalling, cell death and beyond, *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 503-508.
  54. Hostager, B. S., Kashiwada, M., Colgan, J. D., and Rothman, P. B. (2011) HOIL-1L interacting protein (HOIP) is essential for CD40 signaling, *PloS one* 6, e23061.
  55. Maruyama, T., Araki, T., Kawarazaki, Y., Naguro, I., Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2014) Roquin-2 Promotes Ubiquitin-Mediated Degradation of ASK1 to Regulate Stress Responses, *Science Signaling* 7, ra8.
  56. Liu, S., and Chen, Z. J. (2011) Expanding role of ubiquitination in NF- $\kappa$ B

- signaling, *Cell research* 21, 6-21.
57. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van Oers, M. H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis, *Blood* 84, 1415-1420.
  58. Haas, T. L., Emmerich, C. H., Gerlach, B., Schmukle, A. C., Cordier, S. M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., Koschny, R., Komander, D., Silke, J., and Walczak, H. (2009) Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction, *Molecular cell* 36, 831-844.
  59. Dynek, J. N., Goncharov, T., Dueber, E. C., Fedorova, A. V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W. J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D. S., and Vucic, D. (2010) c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling, *The EMBO journal* 29, 4198-4209.
  60. Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., Lu, J., Meagher, J. L., Yang, C. Y., Qiu, S., Tomita, Y., Ueda, Y., Jiang, S., Krajewski, K., Roller, P. P., Stuckey, J. A., and Wang, S. (2007) Design, synthesis, and characterization of a potent, nonpeptide, cell-permeable, bivalent Smac mimetic that concurrently targets both the BIR2 and BIR3 domains in XIAP, *Journal of the American Chemical Society* 129, 15279-15294.
  61. Geissler, A., Haun, F., Frank, D. O., Wieland, K., Simon, M. M., Idzko, M., Davis, R. J., Maurer, U., and Borner, C. (2013) Apoptosis induced by the fungal pathogen gliotoxin requires a triple phosphorylation of Bim by JNK, *Cell death and differentiation* 20, 1317-1329.
  62. Kweon, Y.-O., Paik, Y.-H., Schnabl, B., Qian, T., Lemasters, J. J., and Brenner, D. A. (2003) Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells, *Journal of Hepatology* 39, 38-46.
  63. Kroll, M., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., Thomas, D., Friguet, B., and Conconi, M. (1999) The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome, *Chemistry & biology* 6, 689-698.
  64. Niu, J., Shi, Y., Iwai, K., and Wu, Z. H. (2011) LUBAC regulates NF-kappaB activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO, *The EMBO journal* 30, 3741-3753.
  65. Peltzer, N., Rieser, E., Taraborrelli, L., Draber, P., Darding, M., Pernaute, B., Shimizu, Y., Sarr, A., Draberova, H., Montinaro, A., Martinez-Barbera, J. P., Silke, J., Rodriguez, T. A., and Walczak, H. (2014) HOIP Deficiency Causes Embryonic Lethality by Aberrant TNFR1-Mediated Endothelial Cell Death, *Cell reports* 9, 153-165.

66. Boisson, B., Laplantine, E., Prando, C., Giliani, S., Israelsson, E., Xu, Z., Abhyankar, A., Israel, L., Trevejo-Nunez, G., Bogunovic, D., Cepika, A. M., MacDuff, D., Chrabieh, M., Hubeau, M., Bajolle, F., Debre, M., Mazzolari, E., Vairo, D., Agou, F., Virgin, H. W., Bossuyt, X., Rambaud, C., Facchetti, F., Bonnet, D., Quartier, P., Fournet, J. C., Pascual, V., Chaussabel, D., Notarangelo, L. D., Puel, A., Israel, A., Casanova, J. L., and Picard, C. (2012) Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency, *Nature immunology* *13*, 1178-1186.
67. Sasaki, Y., Sano, S., Nakahara, M., Murata, S., Kometani, K., Aiba, Y., Sakamoto, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Kurosaki, T., and Iwai, K. (2013) Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells, *The EMBO journal* *32*, 2463-2476.

## 発表論文

Hiroki Sakamoto, Shinichiro Egashira, Nae Saito, Takayoshi Kirisako, Simon Miller, Yoshiteru Sasaki, Tadahiko Matsumoto, Manabu Shimonishi, Toru Komatsu, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Soichi Wakatsuki, Kazuhiro Iwai, Tetsuo Nagano, (2014) Gliotoxin Suppresses NF- $\kappa$ B Activation by Selectively Inhibiting Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC), *ACS Chem. Biol.* DOI: 10.1021/cb500653y.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導・御教授を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室の浦野泰照 教授、および東京大学創薬オープンイノベーションセンターの長野哲雄 客員教授に心より感謝申し上げます。

また、六年間の研究の中での確かな御指導・御助言を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室の花岡健二郎 准教授、上野匡 助教、寺井琢也 助教、小松徹 助教に深く感謝申し上げます。

直鎖状ポリユビキチン鎖の専門的な研究を行うために、およそ二年間にわたり研究室に滞在させて頂き、多大な御指導・御助言・御協力を賜りました京都大学 大学院医学研究科 細胞機能制御学教室の岩井一宏 教授、佐々木義輝 准教授、武田有紀子 助教、藤田宏明 助教、松本忠彦 医師、中川朋子 研究員および群馬大学 生体調節研究所 分子細胞制御分野の徳永文稔 教授に心より感謝申し上げます。

阻害剤スクリーニングに供する酵素 Petit-LUBAC, Petit-SHARPIN を構築し、提供して頂いたキリン株式会社の桐浴隆嘉 博士に深く感謝申し上げます。

阻害剤スクリーニングを行う上で、化合物の供与および御指導・御助言を賜りました東京大学 創薬オープンイノベーションセンターの岡部隆義 特任教授、小島宏建 特任教授、江頭慎一郎 特任研究員、齊藤奈英 特任研究員、および大日本住友製薬株式会社の下西学 博士に深く感謝申し上げます。

タンパク質の相互作用を評価する上で、御助言・御協力を頂きました SLAC 国立加速器研究所の若槻壮市 教授、高エネルギー加速器研究機構の Simon Miller 博士に深く感謝申し上げます。

常に互いに励まし合い、切磋琢磨した同期生の朴文氏、平田智也氏に深く感謝申し上げます。また、研究における議論や日常的な会話を交わし、六年間にわたって有意義な研究室での生活を与えて頂いた全ての教室員に心より感謝申し上げます。

最後に、長い学生生活を支えて頂いた私の家族に心より感謝申し上げます。

2015年3月

坂本 裕樹