

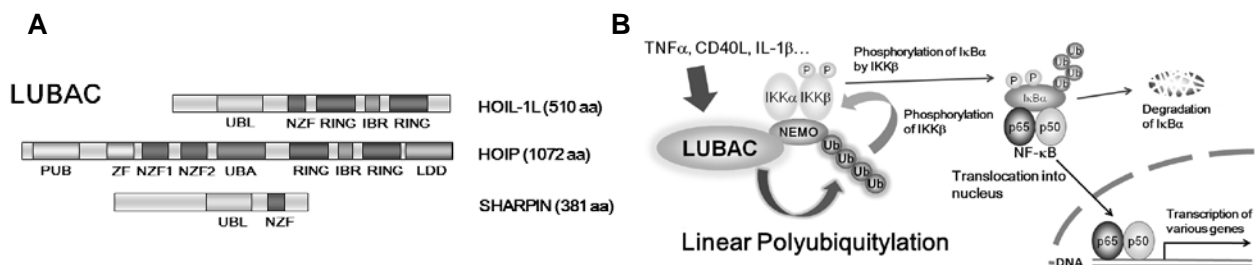
# 論文の内容の要旨

論文題目 : 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

氏名 : 坂本 裕樹

## 【序論】

これまで、ポリユビキチン修飾はタンパク質分解のためのシグナルと考えられてきた。しかし、近年の研究により様々な細胞内シグナル伝達に関与することが報告され、このような機能の違いはユビキチン鎖の結合様式に起因すると考えられている。ユビキチン鎖は、一方のユビキチンの C 末端のカルボキシル基と他方のリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基とのイソペプチド結合により形成されると考えられてきたが、近年、リジン残基ではなく N 末端の  $\alpha$ -アミノ基を介して形成される直鎖状ポリユビキチン鎖が報告された。直鎖状ポリユビキチン鎖はユビキチン E3 酵素に属する linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) (Figure 1A) により特異的に生成され、がんやアレルギーの原因ともなる転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に関与することが知られている (Figure 1B)。実際、LUBAC 活性の亢進が B 細胞様びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫や、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ため、本研究においては直鎖状ポリユビキチン鎖が関与する疾患の治療や、生命現象の解明の一助となる LUBAC 阻害剤の探索を目指した。



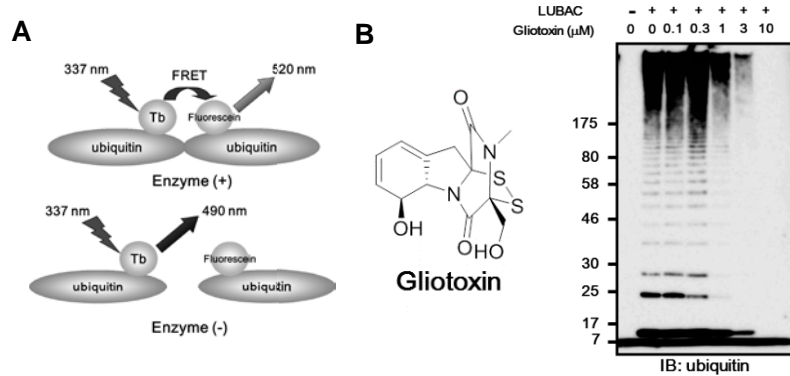
**Figure 1.** (A) Schematic representation of domain structure of LUBAC composed of HOIL-1L, HOIP and SHARPIN. (B) Schematic representation of LUBAC-mediated NF- $\kappa$ B activation pathway.

## 【本論】

### 1. LUBAC 阻害剤探索 high-throughput screening (HTS)

LUBAC による直鎖状ポリユビキチン鎖伸長反応を阻害する化合物を探索するために、Tb<sup>3+</sup>錯体と fluorescein を用いた時間分解 FRET を検出原理とするスクリーニング系を構築した (Figure 2A)。

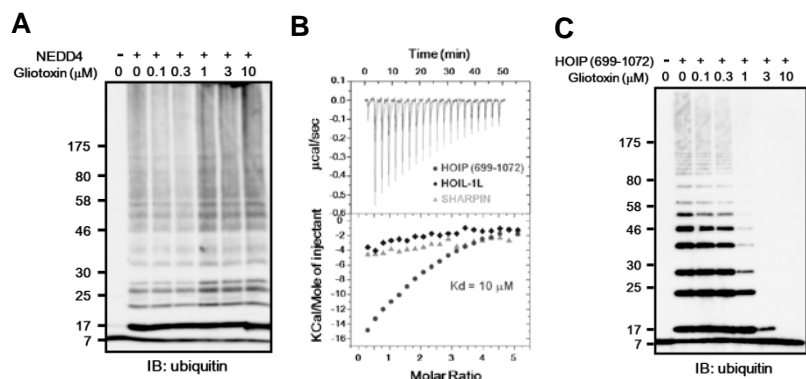
本スクリーニング系を用いて 141,137 化合物の評価を行ったところ、LUBAC に対する選択的な阻害剤として gliotoxin が見出された。また、FRET による評価のみならず、western blot の結果からも gliotoxin が LUBAC に触媒される直鎖状ポリユビキチン鎖の生成を強く阻害することが確認された (Figure 2B)。



**Figure 2.** (A) HTS strategy for identification of LUBAC inhibitor based on time-resolved FRET. (B) Fungal metabolite gliotoxin inhibits LUBAC-mediated linear polyubiquitin chain elongation.

### 2. *In vitro*における gliotoxin の LUBAC 阻害機構の精査

続いて、gliotoxin の LUBAC に対する阻害機構について精査した。ユビキチン化反応は E1, E2, E3 の 3 種の酵素群が触媒する連続反応であるため、gliotoxin が E3 である LUBAC 以外の E1, E2 を阻害しないことを確認する必要がある。そこで、E1, E2 にはこれまでと同一の酵素を用い、E3 のみを LUBAC とは異なる酵素である NEDD4 に置き換えてユビキチン鎖伸長反応を行ったところ、gliotoxin による阻害を受けないことが確認された (Figure 3A)。この結果は、gliotoxin が E1 や E2 ではなく LUBAC を選択的に阻害していることを示すものである。また、LUBAC は HOIP, HOIL-1L, SHARPIN の 3 者から構成される複合体であるため、gliotoxin がこれらの内のいずれのタンパク質に結合しているか評価するべく isothermal titration calorimetry (ITC) 法により検討を行った。この結果、gliotoxin は酵素活性中心を有する HOIP (699-1072 aa) に選択的に結合し、その他の構成因子である HOIL-1L や SHARPIN には結合しないことが示された (Figure 3B)。また、gliotoxin の添加により複合体としての LUBAC ではなく、酵素活性中心である HOIP (699-1072 aa) のみに触媒される直鎖状ポリユビキチン鎖の生成も阻害されたことから、gliotoxin が LUBAC の酵素活性中心に結合することが強く支持された (Figure 3C)。



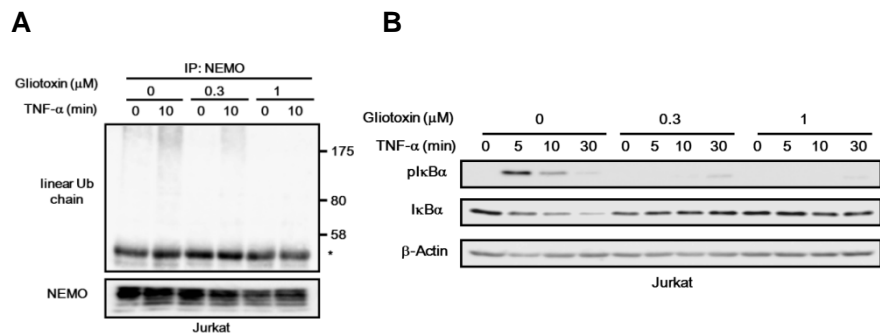
**Figure 3.** (A) Gliotoxin does not inhibit NEDD4 enzymatic activity. (B) ITC experiments revealed that gliotoxin binds to HOIP selectively but no to HOIL-1L or SHARPIN. (C) Gliotoxin inhibits HOIP (699-1072)-mediated linear polyubiquitylation.

### 3. Gliotoxin の細胞への応用

#### A. LUBAC および NF- $\kappa$ B の活性化阻害

続いて、gliotoxin が細胞内においても LUBAC を阻害するか否かを検討した。細胞に TNF- $\alpha$  刺激を与えると、LUBAC は基質タンパク質である NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することで NF- $\kappa$ B 活性化を惹起する。そこで、gliotoxin 処理した Jurkat 細胞に TNF- $\alpha$  刺激を与えたところ、gliotoxin 濃度依存的に NEMO に結合する直鎖状ポリユビキチン鎖が減少することが示された (Figure 4A)。さらに、引き続き NF- $\kappa$ B の活性化をその阻害タンパク質で

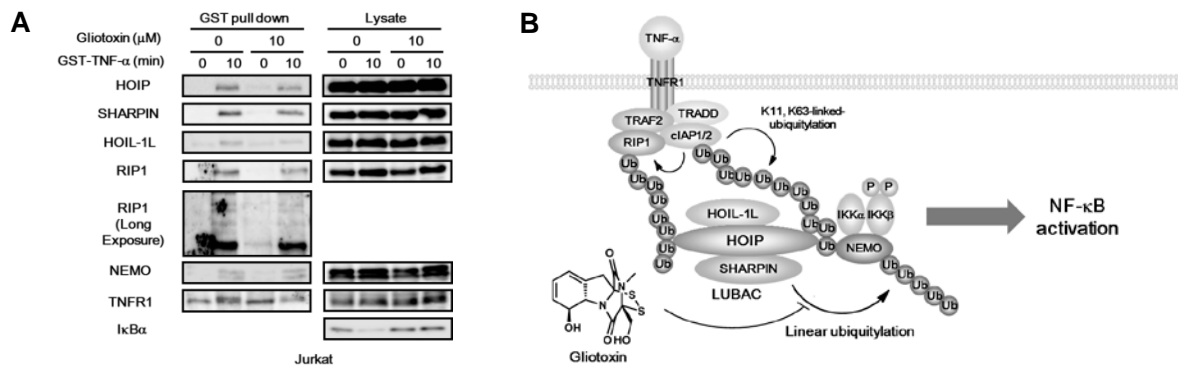
ある I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化および分解から評価したところ、いずれも gliotoxin の添加により強く阻害され (Figure 4B)、LUBAC を阻害することで NF- $\kappa$ B の活性化を抑制可能であるという本研究のコンセプトが強く支持された。



**Figure 4.** (A) Gliotoxin inhibits TNF- $\alpha$ -stimulated linear ubiquitin chain formation by LUBAC in Jurkat cells. (B) Gliotoxin inhibits NF- $\kappa$ B activation caused by TNF- $\alpha$  stimulation.

#### B. Gliotoxin による NF- $\kappa$ B 活性化阻害機構解明

Gliotoxin はアスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus fumigatus* などにより産生される主要な二次代謝産物として古くより知られており、NF- $\kappa$ B の活性化阻害能を有することも報告されていた。しかし、gliotoxin がいずれの分子を標的として NF- $\kappa$ B の活性化を阻害しているのかは明確にされていなかったため、gliotoxin が LUBAC を標的として NF- $\kappa$ B の活性化を阻害する可能性を検証した。TNF- $\alpha$  が受容体に結合すると TRAF2, TRADD, cIAP1/2, RIP1 などの様々なタンパク質が受容体に集積し、TNF receptor signaling complex (TNFRSC) を形成する。続いて、TNFRSC 中に存在する E3 である cIAP1/2 によって cIAP1/2 自身や RIP1 などに Lys11, Lys63 を介したユビキチン鎖が付加され、それを認識する LUBAC, およびその基質タンパク質である NEMO が集積することで LUBAC と NEMO が近接する。その結果、NEMO が LUBAC によって直鎖状ポリユビキチン化されることで、IKK $\beta$  が活性化され、引き続き I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化および分解を伴う NF- $\kappa$ B の活性化が起こると考えられている。そこで、Jurkat 細胞を GST-TNF- $\alpha$  で刺激した後に GST-pull down 法により TNFRSC を単離したところ、LUBAC および NEMO の TNFRSC への集積は 10  $\mu$ M という高濃度の gliotoxin の存在下でも一切影響を受けないことが確認された (Figure 5A)。先行研究によって、NEMO への直鎖状ポリユビキチン鎖の付加が IKK $\beta$  を直接活性化するシグナルとなることが示されている。Gliotoxin は LUBAC の TNFRSC への集積を阻害せず、かつ NEMO の直鎖状ポリユビキチン化を阻害するため、gliotoxin による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制は LUBAC を選択的に阻害したことによるものと強く支持された (Figure 5B)。

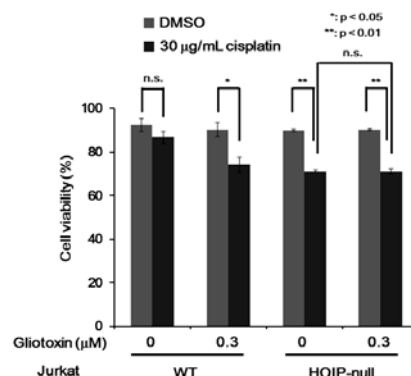


**Figure 5.** (A) Recruitment of LUBAC to TNFRSC was not suppressed by gliotoxin treatment. (B) Gliotoxin suppresses TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation by inhibiting LUBAC selectively.

### C. LUBAC 阻害剤を用いた疾患治療への応用

序論にも記述したように、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。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 6)。

Annexin V-FITC 染色により細胞の生存率を算出したところ、0.3  $\mu$ M gliotoxin と共に加えることで、Jurkat 細胞の cisplatin 依存的なアポトーシスの誘導が増強されることが認められた。また、HOIP-null Jurkat 細胞でも同様の試験を行ったところ、cisplatin 単独投与時に wild type と比較して多くの細胞死が認められ、gliotoxin と併用してもアポトーシスの誘導が増強されなかったことから、gliotoxin と cisplatin の共投与により惹起さ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。



**Figure 6.** Cisplatin-induced apoptosis is increased by co-treatment of gliotoxin and cisplatin.

### 【結論】

本研究を通じて、私は LUBAC の阻害剤として gliotoxin を見出し、同化合物を用いることで *in vitro*, 細胞内のいずれにおいても LUBAC を選択的に阻害可能であることを示した。さらに、同化合物を用いて LUBAC 活性を阻害することにより、抗がん剤 cisplatin への耐性を減弱させることが可能であることを示唆する結果を得た。Gliotoxin は世界で初めての LUBAC に対する選択的な小分子阻害剤であるため、本化合物を用いることで LUBAC 依存的なシグナル伝達の解明、ひいては疾患との関与についてもより深く迫ることができるようになると期待される。また、以前より知られていた gliotoxin による NF- $\kappa$ B の活性化阻害は LUBAC の活性化抑制を介するものであるという事が強く示唆された。これは、*Aspergillus fumigatus* などの真菌感染の機構解明に迫る上でも重要な知見と言える。