

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」  
平成 23 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告
----------------

濡木 理

東京大学大学院理学系研究科・教授

慢性炎症による疾患発症機構の構造基盤

## §1. 研究実施体制

### (1)「濡木」グループ

① 研究代表者: 濡木 理 (東京大学大学院理学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・ 慢性炎症による疾患発症機構の構造基盤の解明

### (2)「青木」グループ

① 主たる共同研究者: 青木 淳賢 (東北大学・大学院薬学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ 脂質メディエーターによる慢性炎症惹起機構の解明

### (3)「徳永」グループ

① 主たる共同研究者: 徳永 文稔 (群馬大学生体調節研究所、教授)

② 研究項目

- ・ 脱ユビキチン化酵素による NF- $\kappa$ B 制御の分子基盤

## §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### A. 「構造生物学」グループ

#### 1. ENPP2 ファミリー分子の慢性炎症における構造機能解明

ENPP2/Autotaxin (ATX)に関しては、我々は、東北大学の青木博士との共同研究により、マウス由来のENPP2と脂肪酸種の異なる5種類のLPAの複合体の立体構造をX線結晶構造解析によって決定した(図1)。興味深いことに、脂質ポケットを持つ活性部位に通じる疎水性チャンネルが存在し、LPAを含まないENPP2の結晶中でendogenousな複数種のLPAが結合をしていることを、質量分析により確認した。

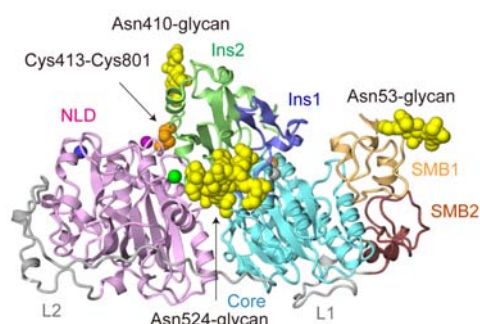


図1. ENPP2の結晶構造

がって、ENPP2によって産生されたLPAは、ENPP2

のもつ疎水性チャンネルを通して直接LPA受容体へと

受け渡されることが示唆された(A-1)。さらに、我々は、ENPP2の阻害剤から出発し、複合体の構造解析にもとづいて、マウス個体内でLPAの産生を低下させる阻害剤の創出に成功し、大手製薬会社との共同研究締結に至った。

さらに、ENPP1は、骨の代謝に深く関わっており、またインスリンレセプターと結合しこれを不活性化することで、インスリンシグナルを遮断し、II型糖尿病の原因となることが報告されている。ENPP1に関して、ENPP2のシグナル配列を付け替えてHEK293T細胞で大量調製を行い、AMPやAMPCPPとの複合体の結晶構造を2.7Å分解能で決定することに成功した。その結果、ENPP2で欠失していた挿入ループが基質の認識特異性を発揮していることを明らかにした。さらに、この挿入ループを欠失させた変異体は、NTPを加水分解する活性を失っただけでなく、ENPP2様のリゾホスホリパーゼ活性を持つことが判明し、ENPP1とENPP2の分子進化に重要な知見を与えた(論文投稿中)。ENPP1は骨石灰化やII型糖尿病の原因となるタンパク質であり、本研究で得られた立体構造情報は、これらの疾病に対する阻害剤開発の基盤となることが期待される。

今後、ENPP2の産生するLPA脂質メディエーターの受容体である、LPA受容体の大量調製系を確立し、ENPP2とLPA受容体の複合体の結晶化を推進する。さらに、リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)に関して、近年共同研究者の東北大学・青木博士らが同定したLysoPS産生酵素およびLPS受容体[GPR34(LPS<sub>1</sub>)、P2Y10(LPS<sub>2</sub>)、P2Y10-related(LPS<sub>3</sub>)、GPR174(LPS<sub>4</sub>)]の大量調製系の確立、結晶化を推進する。

#### 2. NF-κBシグナルが慢性炎症を惹起する機構の解明

徳永博士らは、LUBACと命名した新規直鎖状ポリユビキチン鎖を生成するユビキチンリガーゼが、炎症応答に重要なNF-κB経路の活性化を導くことを明らかにした。しかし、LUBACによるNF-κB活性化を抑制する機構は不明であった。我々は、LUBAC活性を負に制御する脱ユビキチン化酵素としてA20やCYLDを同定した。さらに、A20のLUBAC活性阻害は脱ユビキチン化酵

素活性ではなく、zinc finger (ZF) 領域による直鎖状ユビキチン結合に起因することを突き止めた。さらに、A20 に 7 つ存在する ZF のうち直鎖状ユビキチン結合に重要な ZF7 とポリユビキチンの複合体の結晶構造を 1.7 Å 分解能で決定することに成功した。

### 3. 転写制御因子タンパク質が慢性炎症を制御するメカニズムの解明

dnHLH 転写因子である HHM/GCIP は、TGF- $\beta$  下流で Oligo-1 転写因子を阻害することで細胞運動を抑制し、また Cyclin D1-CDK4 と結合してこれを抑制することで、細胞周期を G1 期で停止させ、強い抗腫瘍作用を発揮することが知られている。また HHM/GCIP は、NF- $\kappa$ B プロモーター領域のヒストン H3 に特異的な脱アセチル化酵素 SirT6 と相互作用する。我々は、HHM/GCIP の結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定することに成功した (図2) (A-2)。その結果、HHM/GCIP は、10 本のヘリックスが 5 本ずつのヘリックスバンドル構造を形成し、この N 端ドメイン (N バンドル) と C 端ドメイン (C バンドル) が鋭角に V 字型構造を取った新規構造を持っていることが判明した。この N バンドルと C バンドルをつなぐ部位に HLH があり、通常の HLH とは全く異なる伸張した構造をとっていた。さらに、超遠心分析を行うことで、HHM/GCIP は V 字型構造と HLH がほどけた relaxed 型構造との conformation 平衡として存在することが判明した。さらに、HHM/GCIP の HLH と N バンドルおよび C バンドルの結合を弱め、V 字型構造を不安定化する変異体を作製したところ、これらの変異体は relaxed 型構造のみを取るようになり、変異体 HHM/GCIP は Oligo-1 のみならず NeuroD1 や Id2 とも結合するようになった。またこの変異体は筋細胞の分化を著しく促進することが判明した (Id2 による MyoD の抑制を解放するためと思われる)。以上のことから、HHM/GCIP の V 字型構造は、転写因子の特異性に寄与しており、Oligo-1 と結合すると、Cyclin D1 と結合しその活性を抑制することで細胞周期を G1 停止させ、がん細胞の運動抑制と増殖抑制の二通りの方法で抗腫瘍活性を発揮していることが示された (A-3)。

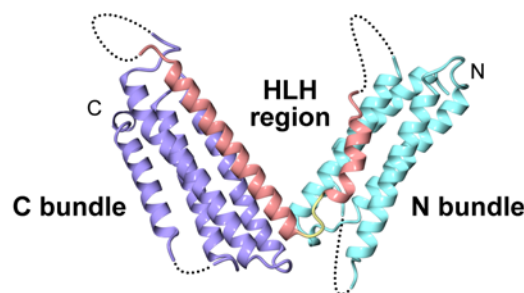


図 2. HHM の結晶構造

#### B. 「脂質炎症」グループ

慢性炎症に伴う臓器の線維化は重篤な機能障害をもたらす。線維化は肺、腎臓、肝臓、心臓、腹膜など全身のいたるところで起こりうるが、その発症機構については不明な点はまだ多く残されている。NPP2 は生理活性脂質リゾホスファチジン酸 (LPA) の産生酵素である。LPA の作用は LPA に特異的な G タンパク質共役型受容体を介するが、LPA 受容体のうち LPA<sub>1</sub> が肺、腎、腹膜の線維化に促進的に機能していることがノックアウトマウスを用いた研究より明らかにされている。これまでに我々は NPP2 が肺の線維症に機能していることを明らかにしてきたが、NPP2 がどのような細胞に発現しているかについては明らかになっていなかった。そこで我々は最近新たに確立した抗体を用いて NPP2 の肺線維症における発現解析を行うと同時に、さらにその他の線維症マウスモデルについても同様の発現解析を行った。

### 1肺線維症モデルにおける NPP2 の発現

ブレオマシシ誘導型マウス肺線維症モデルにおいて NPP2 の発現を調べたところ、mRNA レベルでは NPP2 の発現は低下していた。しかし、抗 NPP2 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、NPP2 の発現は増加傾向にあった。そこでさらに、免疫組織染色を行ったところ、ブレオマイシシ投与後1週間の炎症期において、マクロファージ様細胞に NPP2 の陽性シグナルが認められることがわかった(図3)。

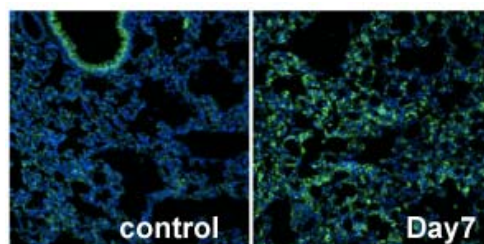


図 3. 肺線維症モデルにおける ENPP2 の発現上昇

### 2腎線維症モデルにおける NPP2 の発現

腎線維症モデルである片側尿管結紮モデルを作製し、NPP2 の発現を調べたところ、肺線維症同様に mRNA レベルでの低下が認められた。これまでのところ免疫組織染色での特異的シグナルは認められていない。

### 3腹膜線維症モデルにおける NPP2 の発現

腹膜線維症モデルとして、グルコン酸クロルヘキシジンを2日おきに3週間、マウスに腹腔内投与した。このとき腹膜において NPP2 の mRNA レベルの有意な上昇は認められなかった。しかし、免疫組織染色を行ったところ、通常の腹膜には全く陽性シグナルが認められなかったが、線維化した腹膜において線維芽細胞に強いシグナルが認められた(図4)。

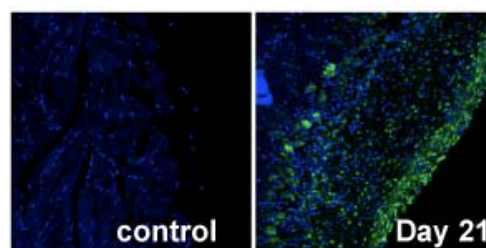


図 4. 腹膜線維症における ENPP2 の発現上昇

## C. 「自然炎症」グループ

NF- $\kappa$ B は炎症応答や自然・獲得免疫制御に中心的な役割を果たすシグナル伝達経路である。自然炎症グループは、HOIL-1L-HOIP からなる LUBAC ユビキチンリガーゼ複合体が直鎖状ポリユビキチン鎖という新規ユビキチン鎖を I $\kappa$ B キナーゼの制御サブユニット(NEMO)に付加することで、NF- $\kappa$ B 活性化を導くことを明らかにしている。本研究では LUBAC の生理機能解析を進めるとともに、特に LUBAC による NF- $\kappa$ B 活性化を負に制御するメカニズムの解明とその構造基盤解析を目指す。

平成 23 年度研究の結果、本グループでは LUBAC 新規構成因子として SHARPIN を同定し、その遺伝的欠損マウスでは慢性皮膚炎など重篤な慢性炎症を呈することを明らかにした。さらに、LUBAC は NF- $\kappa$ B 制御を介してインターフェロン産生シグナルや癌転移に影響を与えることを示した。また、LUBAC 構成サブユニット間の相互作用についても解析を進めた(C-1、C-2)。LUBAC による NF- $\kappa$ B 活性化を負に制御する因子としては、脱ユビキチン化酵素に着目して解析を行った。特に、NF- $\kappa$ B 制御に関わることが知られる A20、CYLD、Cezanne を標的に、LUBAC 惹起 NF- $\kappa$ B 活性化への関与を調べたところ、A20とCYLDが抑制効果を示すことが分かった。CYLDは脱ユビ

キチン化酵素活性を介して LUBAC 活性を抑制するが、驚いたことに A20 は脱ユビキチン化酵素活性ではなく直鎖状ユビキチン結合が重要であることが示された(図5)。

今後、構造生物学グループ(濡木グループ)とともに A20 の直鎖状ユビキチン認識の構造基盤を解明するとともに、生理的・病理的な意義について研究を進展させている。すでに、組換えタンパク質の発現及び結晶構造解析や病態を引き起こす遺伝性変異による機能変換解明に着手しており、来年度に完成できる可能性は高い。

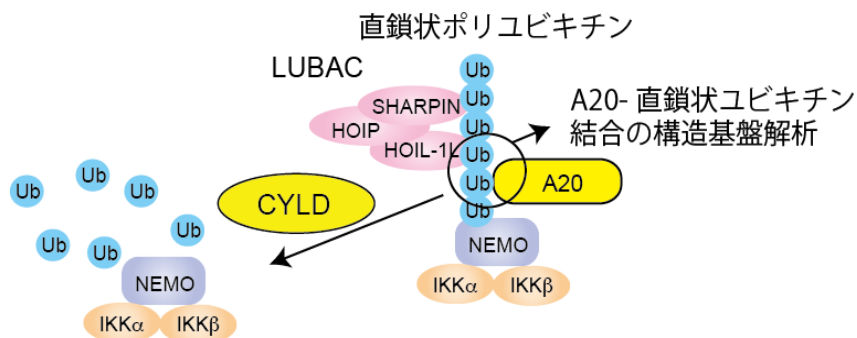


図 5. CYLD と A20 は異なる分子メカニズムで直鎖状ユビキチン化を介する NF-κB 活性制御を司る

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

- A-1. H. Nishimasu, R. Ishitani, J. Aoki and O. Nureki “A 3D view of autotaxin” *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 138-145 (2012).
- A-2. R. Ishii, K. Isogaya, A. Seto, D. Koinuma, Y. Watanabe, F. Arisaka, S.I. Yaguchi, H. Ikushima, N. Dohmae, K. Miyazono, K. Miyazawa, R. Ishitani, O. Nureki “Structure of a dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator suggests mechanisms of autoinhibition” *EMBO J.* in press (2012). doi: 10.1038/emboj.2012.77.
- C-1. Yoshinori Uekusa, Syunsuke Miura, Hiroaki Sasakawa, Eiji Kurimoto, Eri Sakata, Serve Oliver, Hirokazu Yagi, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Iwai, and Koichi Kato, “Backbone and side chain  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  assignments of ubiquitin-like domain of human HOIL-1L, an essential component of linear ubiquitin chain assembly complex”, *Biomol. NMR Assign.* (in press).
- C-2. Hirokazu Yagi, Kazuhiro Ishimoto, Takeshi Hiromoto, Hiroaki Fujita, Tsunehiro Mizushima, Yoshinori Uekusa, Maho Yagi-Utsumi, Eiji Kurimoto, Masanori Noda, Susumu Uchiyama, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Iwai, and Koichi Kato, “Non-canonical UBA–UBL interaction mediates formation of linear ubiquitin chain assembly complex”, *EMBO Rep.* (in press).