

「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

H24 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) 「構造生物学」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) 「脂質炎症」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) 「自然炎症」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. ENPP ファミリー分子の慢性炎症における構造機能解明

ATX (別名 Enpp2) は血中に存在するリゾホスファチジルコリン (LPC) を加水分解し、リゾホスファチジン酸 (LPA) を産生する。LPA は脂質メディエーターとして GPCR である LPA 受容体に作用し様々な生命現象に関わる。また、ATX の発現亢進は乳がん、肺がん、脳腫瘍や、動脈硬化、神経因性疼痛などの慢性炎症疾患と関連することが報告されている。我々は、ATX と鎖長・飽和度の異なる 5 種類の LPA との複合体の結晶構造を解明した (Nishimasu *et al.*, *Nature Struct Mol Biol*, 2011, 論文 A-1)。結晶構造から、酵素活性部位に通じる疎水性チャンネルの存在が示された。このチャンネルを塞ぐような変異体を作製し解析したところ、LPA 産生活性は保持されている一方、細胞運動性促進活性が著しく低下することを見出した。この結果から、産生された LPA は疎水性チャンネルを通して効率的に LPA 受容体へと受け渡されることが示唆された。また、ATX はマルチドメイン蛋白質であるが、SMB ドメインやヌクレアーゼドメイン、糖鎖が活性に必須な意味はこれまで不明であった。我々は、これらドメインや糖鎖の欠失変異体の MD シミュレーションを行うことで、これらの構造ユニットが緊密な相互作用ネットワークを形成し、活性残基の位置を固定していることを明らかにした (論文 A-2)。さらに、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 教授らとの共同研究により、阻害剤スクリーニングを行い、ATX 阻害剤を見出すことに成功した。ATX と薬剤との複合体の結晶構造を 2.1 Å 分解能で決定し、構造情報を基にマウス個体内で LPA の産生を低下させる有効なリード化合物の創出に成功し、大手製薬会社との共同研究締結に至った (特許 1)。また、LPA 受容体に関しては、様々な生物種由来の LPA1-6 を GFP との融合蛋白質として昆虫細胞 Sf9 にて発現させ、蛍光を指標にしたゲル濾過クロマトグラフィー (FSEC) を用いて発現スクリーニングを行った。その結果、ゼブラフィッシュ由来の LPA6 が発現量・性質ともに良好であることが判明したが、糖鎖の不均一性のため、結晶化が阻まれていた。最近、PNGaseF を用いて糖鎖を切りそろえることで、均一性が顕著に向上し、現在結晶化を推進している。

さらに、NPP1 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。NPP1 に関して、NPP2 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 2.7 Å 分解能で決定することに成功した (論文 A-3, 4) (図 1)。その結果、NPP2 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、NPP2 様のリゾホスホリパーゼ活性を持つことが判明し、NPP1 と NPP2 の分子進化に重要な知見を与えた。NPP1 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、これらの慢性炎症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。

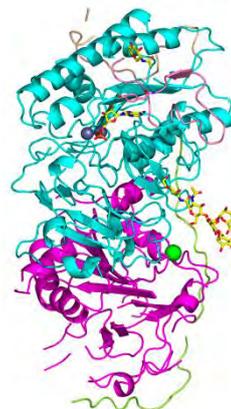


図 1 NPP1 の構造

#### 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 (C 項参照, 論文 C-1)。また、RIP-1 に結合した K63 型ユビキチン鎖に結合して、A20 を RIP にリクルートする Tax1bp1 に関しては、C 末端の Ubz Zn フィンガードドメインとポリユビキチン鎖の複合体の構造解析に成功し、細胞生物学的な解析を、徳永博士との共

同研究で行っている。さらに、HTLV-1 が宿主細胞で発現し、IKK 複合体を恒常的に活性化することで、成人 T 細胞白血病を惹起する Tax に関して、大量発現に成功し、相互作用する IKK $\gamma$  (NEMO) の結合ドメインとの複合体の結晶化を推進している。

### 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

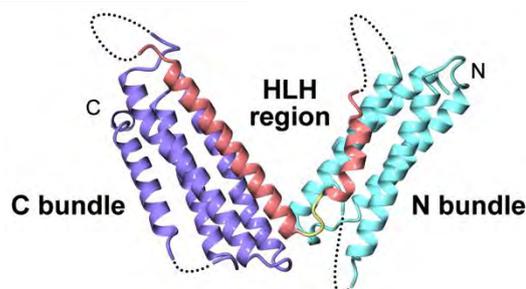


図 2. HHM の結晶構造

(図 2) (A-4)。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成したところ、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 とともに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-5)。

### 4. Zucchini 蛋白質が piRNA の成熟に働くメカニズムの解明

Zucchini (Zuc) 蛋白質は、ミトコンドリアの外膜に根をおろした膜蛋白質であり、生殖細胞の生殖顆粒 (Yb body) と接触して、piRNA の生産、トランスポゾンの発現抑制に働くことが示唆されて来た。これまでの研究から、Zuc は PLD ファミリーの蛋白質で、脂質カルジオリピンを分解して PA を合成することで、piRNA 生産のシグナルを制御すると考えられて来た。本研究では、ショウジョウバエの Zuc の細胞質ドメインを 1.75 Å 分解能で結晶構造解析した結果、2 量体を形成しており、ダイマーの境界に活性残基である His169 と Lys171 が集合して活性部位を形成していた。また、活性部位を含む、負電荷を持つ溝が存在し、その幅は、同 PLD ファミリーのヌクレアーゼである Nuc (2 本鎖 DNA および 2 本鎖 RNA を切断する) に比べ明らかに狭かった。生化学解析の結果、Zuc は配列非特異的に 1 本鎖 RNA を切断するエンドヌクレアーゼであることが明らかになった。Zuc を knock down すると piRNA の前駆体が蓄積することから、Zuc は piRNA の成熟に働く RNase であることが明らかになった (論文 A-6, 7)。

#### B. 「脂質炎症」グループ

##### 1. 新規リゾリン脂質メディエーターリゾホスファチジルセリン (LysoPS) に関する研究

新規 G protein-coupled receptor (GPCR) の活性化測定法、TGF $\alpha$  切断アッセイを開発し、この手法用い、新規 LysoPS 受容体、P2Y10 と GPR174 を見出した。P2Y10 と GPR174 をそれぞれ LPS<sub>1</sub>、LPS<sub>2</sub> と命名した (論文 B-1, 2, 3)。また、P2Y10 と GPR174 のノックアウトマウスを作製し解析を進めている。予備的知見では P2Y10、GPR174 とともにリンパ球に発現し、また、リンパ球の抗原刺激により発現が劇的に増加するので、これらの受容体はリンパ球の活性化に関与している可能性が想定された。一方、バキュロウイルス系による LysoPS 産生酵素 PS-PLA<sub>1</sub> の発現系を構築し、大量精製への道筋を開いた。

##### 2. 慢性肝炎におけるコリン産生酵素 NPP6 の機能解明

慢性炎症として、脂肪肝とそれに引き続き起こる肝炎に着目した解析を行っている。コリン欠乏食により誘発される脂肪肝、肝炎に対しNPP6の基質であるGlycerophosphocholineを投与したところ、(GPC)が顕著に脂肪肝、肝炎の発症を抑制することが明らかとなった(図3)。また、NPP6ノックアウトマウスの肝臓を解析した結果、NPP6ノックアウトマウスでは脂肪が肝臓に蓄積している様子が観察された(図4)。NPP6は肝臓においてコリンの吸収が盛んな部位で類洞に高発現していた。また、NPP6を発現しない細胞にNPP6を発現させると、GPCをコリン源これらの結果から、NPP6はGPCを分解し肝臓にコリンを供給する役割があることが明らかとなった(図6)。

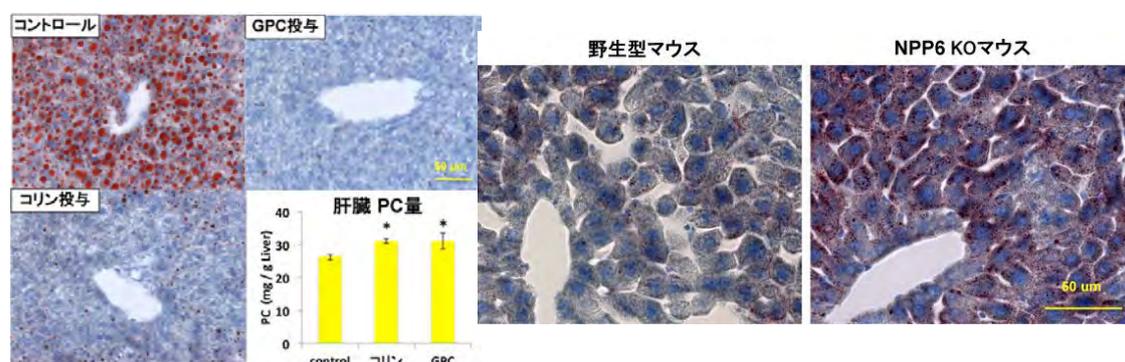
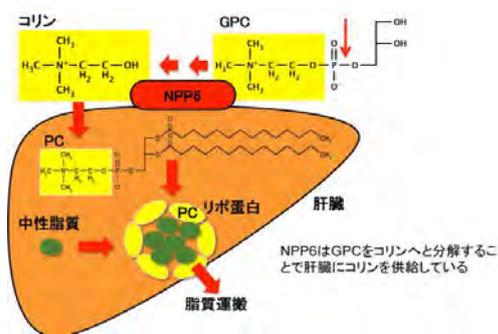


図3. GPCはコリン欠乏による脂肪肝の発症を劇的に抑制する(左上)

図4. NPP6 KOマウスは脂肪肝を引き起こす(右上)

図5. NPP6による肝臓へのコリン供給経路(左下)



### C. 「自然炎症」グループ

NF- $\kappa$ B は細菌やウイルス、炎症性サイトカイン、紫外線などの外界ストレスによって惹起し、炎症や自然・獲得免疫制御において中心的な役割を果たすシグナル伝達経路である。NF- $\kappa$ B の活性化には、リン酸化のみならず多様なユビキチン化によるタンパク質の翻訳後修飾が重要である。ユビキチンは、真核生物に高度に保存された低分子量球状タンパク質で、時空間特異的に標的タンパク質に結合されることでタンパク質分解、シグナル伝達、DNA 修復、エンドサイトーシスなど多彩な細胞機能発現を促す。このようなユビキチンの多機能性発現は、ユビキチンが分子内の7つの Lys 残基を介した分岐鎖状ポリユビキチン鎖と我々が同定した N 末端 Met を介する直鎖状ポリユビキチン鎖という8種類のポリユビキチン鎖を生成可能なことに起因する。我々は、LUBAC ユビキチンリガーゼによる直鎖状ユビキチン生成を介して NF- $\kappa$ B 経路を活性化することを同定した。しかし、この経路において抑制的に機能する脱ユビキチン化酵素については全く不明であった。

そこで今回、NF- $\kappa$ B 経路の抑制因子として知られている脱ユビキチン化酵素が LUBAC を介する NF- $\kappa$ B 経路を制御するか解析したところ、CYLD は直鎖状ユビキチンを分解することでこの経路の制御に寄与することを見いだした。一方、A20 は、直鎖状ユビキチン鎖を分解するのではなく、C 末端7番目のジンクフィンガー領域(ZF)で直鎖状ユビキチンに特異的に結合することで LUBAC や炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ )刺激によって惹起される NF- $\kappa$ B 活性化を阻害することを突き止めた(図6)。さらに、濡木グループによって A20 ZF7 と直鎖状ユビキチンの X 線結晶構造解析が行われ、A20 ZF7 は遠位ユビキチンの Ile44 疎水性ポケットと近位ユビキチンの  $\alpha$ -ヘリックス領域に同時に結合することで直鎖状ユビキチン鎖を認識し、Gly76-Met1 のユビキチン間結合を識別しているのではないことが示された(図x)。A20 の遺伝性変異は B 細胞リンパ腫を引き起こし、その遺伝子多型は関節リウマチなど自己免疫疾患に関連することが知られている。本研究から非ホジキンリンパ腫を起こす A20 ZF7 の遺伝子変異では、直鎖状ユビキチン鎖への結合や TNF 受容体への会合が低下し、その結果、NF- $\kappa$ B の持続的活性化が慢性炎症、延いては癌を引き起こしている可能性が示唆され、業績 C-1 として発表した。今回の研究成果は、B 細胞リンパ腫発症の分子メカニズムの一端を解明したもので、今後、抗癌剤や自己免疫疾患に対する治療薬創薬の標的としても重要な発見である。

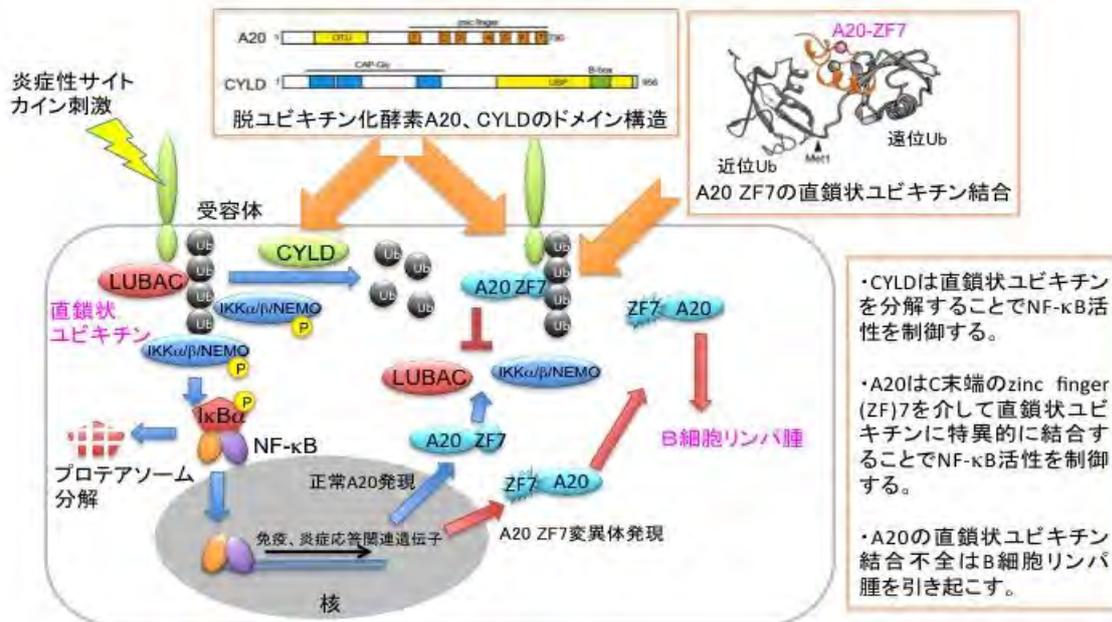


図 6. 直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF-κB 活性化と脱ユビキチン化酵素(CYLD、A20)による抑制、および A20 の直鎖状ユビキチン結合不全による B 細胞リンパ腫の発症機構

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. H. Nishimasu, R. Ishitani, J. Aoki and O. Nureki “A 3D view of autotaxin” *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 138-145 (2012).
2. M. Koyama, H. Nishimasu, R. Ishitani and O. Nureki “Molecular Dynamics Simulation of Autotaxin: Roles of the Nuclease-like Domain and the Glycan Modification” *J. Phys. Chem. B* **116**, 11798-11808 (2012).
3. K. Kato, H. Nishimasu, E. Mihara, R. Ishitani, J. Takagi, J. Aoki and O. Nureki “Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp1” *Acta Crystallogr. F* **68**, 778-782 (2012)
4. K. Kato, H. Nishimasu, S. Okudaira, E. Mihara, R. Ishitani, J. Takagi, J. Aoki and O. Nureki “Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 16876-16881 (2012). doi: 10.1073/pnas.1208017
5. 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.* **31**, 2541-2552 (2012). doi: 10.1038/emboj.2012.77.
6. S. Fukuhara, H. Nishimasu, L. Bonnefond, N. Matsumoto, R. Ishitani and O. Nureki “Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Zucchini from Drosophila melanogaster.” *Acta. Crystallogr F* **68**, 1346-1350 (2012). doi: 10.1107/S1744309112038936
7. H. Nishimasu, H. Ishizu, K. Saito, S. Fukuhara, M. K. Kamatani, L. Bonnefond, N. Matsumoto, T. Nishizawa, K. Nakanaga, J. Aoki, R. Ishitani, H. Siomi, M. C. Siomi and O. Nureki “Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis” *Nature* **491**, 284-287 (2012)
8. Asuka Inoue, Jun Ishiguro, Hajime Kitamura, Naoaki Arima, Michiyo Okutani, Akira Shuto, Shigeki Higashiyama, Tomohiko Owada, Hiroyuki Arai, Kumiko Makide and Junken Aoki “TGFalpha shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation” *Nature Methods* **9**, 1021-1019 (2012). doi: 10.1038/nmeth.2172
9. Hajime Kitamura, Kumiko Makide, Akira Shuto, Masaya Ikubo, , Asuka Inoue, Kensuke Suzuki, Yusuke Sato, Sho Nakamura, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada and Junken Aoki “GPR34 is a Receptor for Lysophosphatidylserine, with a Fatty Acid at the sn-2 Position” *J. Biochem.* **151**, 511-518 (2012). doi: 10.1093/jb/mvs011
10. Takafumi Hashimoto, Shinichi Okudaira, Koji Igarashi, Kotaro Hama, Yutaka Yatomi and Junken Aoki “Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATXδ, with a four-amino acid deletion” *J. Biochem.* **151**: 89-97 (2012). doi: 10.1093/jb/mvr126

11. Fuminori Tokunaga\*, Hiroshi Nishimasu\*, Ryuichiro Ishitani, Eiji Goto, Takuya Noguchi, Kazuhiro Mio, Kiyoko Kamei, Averil Ma, Kazuhiro Iwai, and Osamu Nureki “Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- $\kappa$ B regulation” (2012) *EMBO J.* 31 (19), 3856-3870, (2012) (\*; equal contribution). doi: 10.1038/emboj.2012.241.
12. Tobias Kensche\*, Fuminori Tokunaga\*, Fumiyo Ikeda, Eiji Goto, Kazuhiro Iwai, and Ivan Dikic “Analysis of NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) binding to linear and lysine-linked ubiquitin chains and its role in the activation of NF- $\kappa$ B” *J. Biol. Chem.*, 287 (28), 23626-23634, (2012) (\*; equal contribution). doi: 10.1074/jbc.M112.347195.
13. 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.*, 13 (5), 462-468 (2012). doi: 10.1038/emboj.2012.24.
14. 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.*, 6 (2), 177-180 (2012). doi: 10.1007/s12104-011-9350-1.
15. Masato Tomonaga, Nobuyuki Hashimoto, Fuminori Tokunaga, Megumi Onishi, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, and Kazuhiro Iwai “Activation of nuclear factor-kappa B by linear ubiquitin chain assembly complex contributes to lung metastasis of osteosarcoma cells” *Int. J. Oncol.* 40 (2), 409-417 (2012). doi: 10.3892/ijo.2011.1209.

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)