

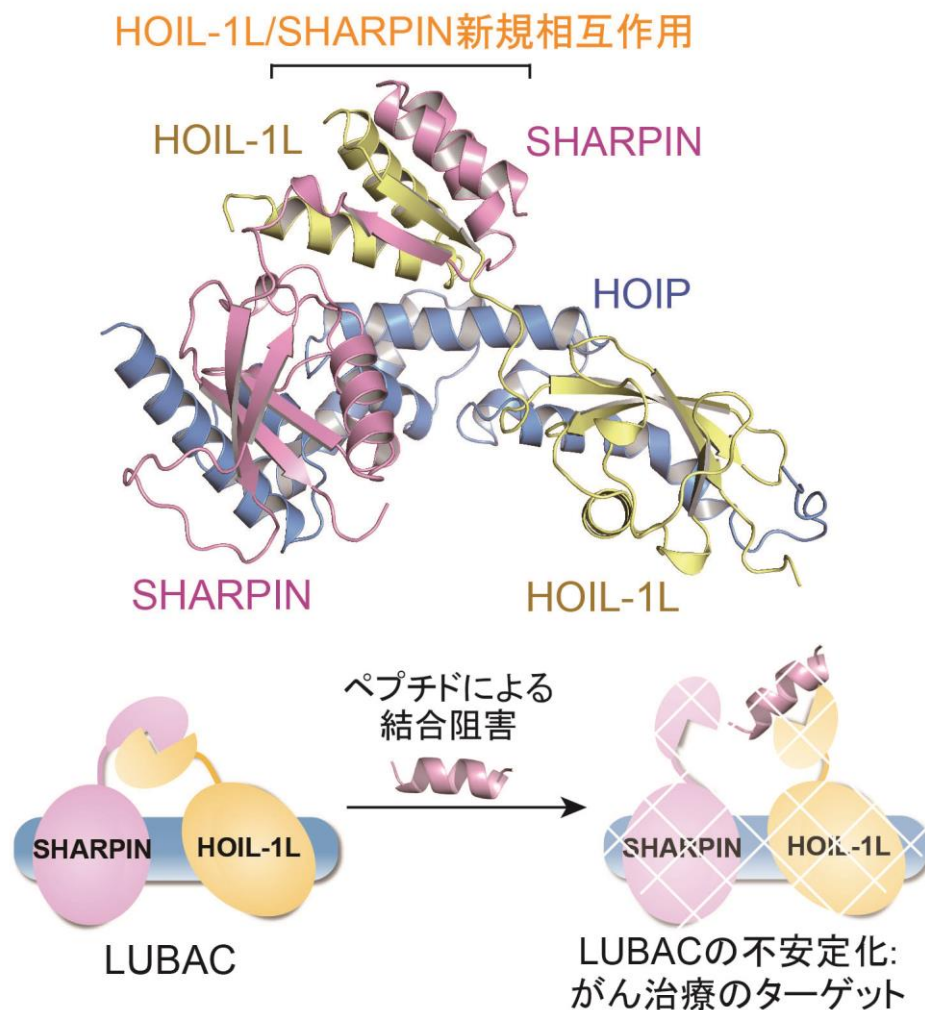
# がんを誘発する酵素の新たなタンパク質間相互作用を解明

## —抗がん剤の新たなターゲットを発見—

### 概要

新規のタンパク質翻訳後修飾である直鎖状ユビキチン鎖を生成する「LUBAC」は、発がんに関与する転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化し、計画的な細胞死を抑制する酵素です。この LUBAC が過剰に活性化すると、悪性リンパ腫の発症や、抗がん剤とがん免疫治療薬への耐性に関与することから、抗がん剤のターゲットと考えられてきました。京都大学大学院医学研究科 藤田宏明 助教、岩井一宏 教授、京都大学大学院工学研究科 徳永暉 博士課程学生、白川昌宏 教授らの研究グループは、この LUBAC の安定した複合体の形成に決定的な役割を果たすタンパク質の相互作用を解明し、その相互作用の阻害が、抗がん剤の有効なターゲットになることを明らかにしました。この結果を受けて、研究チームは相互作用を阻害する化合物の開発に着手しています。

本研究は、日本時間 2018 年 4 月 25 日に国際学術誌「Cell Reports」にオンライン掲載されました。



## 1. 背景

ユビキチンは、人間を含めたあらゆる真核生物に存在する小球状のタンパク質で、基質に連結してタンパク質の機能を様々な様式で制御することから、生命活動で必須な役割を担っています。このユビキチンを基質に連結させる酵素がユビキチンリガーゼです。ユビキチンリガーゼは、連結の標的となるタンパク質の認識に重要な役割を果たし、約 600 種類が知られています。

このユビキチンリガーゼのうち、LUBAC は「直鎖状ユビキチン鎖」を生成し、過剰な活性化ががんの発生に関与する転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化し、計画的な細胞死（プログラム細胞死）を抑制することが知られています。さらに、LUBAC が過剰に活性化すると、ある種のヒト B 細胞リンパ腫の発症、広く使われている抗がん剤シスプラチンへの耐性、そして近年注目を集めているがん免疫治療薬 PD-1 チェックポイント阻害剤への耐性に関与することが報告されています。したがって、LUBAC の活性を押さえることは、抗がん剤の有効なターゲットであるといえます。

この LUBAC は、活性中心を有する HOIP、アクセサリー分子である HOIL-1L と SHARPIN という 3 種類のサブユニットで安定な複合体を形成します。これまでに、1 つのサブユニットが欠損すると LUBAC が不安定になり、直鎖状ユビキチン鎖を生成する能力が弱まることが報告されていました。しかし、LUBAC が 3 種のサブユニットで安定な複合体を形成するメカニズムは不明であり、その解明が望まれていました。

そこで、本研究では LUBAC を安定化するメカニズムを解明し、その成果に基づいて LUBAC を不安定にして量を減少させる薬剤の開発、がん治療への応用の基礎的検討を行うことを目指して研究を進めました。

## 2. 研究手法・成果

LUBAC が安定な複合体を形成するメカニズムを探索するため、まずはじめに、すでに複合体形成への寄与が知られていた HOIP と HOIL-1L (HOIP/HOIL-1L) (図 1)、HOIP と SHARPIN (HOIP/SHARPIN) (図 2) との結合を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法にて評価しました。両結合ともに、結合と解離が非常に早い反応であるため、安定した複合体への寄与は大きくないことが想定されました。しかし、HOIP に HOIL-1L と SHARPIN の 2 サブユニットを添加して三者複合体を形成させたところ、強固な複合体を形成し、ほとんど解離しないことに加え、これまで存在が知られていなかった HOIL-1L と SHARPIN (HOIL-1L/SHARPIN) が結合していることを示唆する結果が得られました (図 3)。

そこで 3 サブユニットが存在すれば安定な複合体が形成されるメカニズムを探るために、三者の結合領域の共結晶構造解析を行いました (図 4)。その結果、HOIL-1L/SHARPIN は LUBAC-tethering motif (LTM) という新規に見いだした領域で相互作用することがわかりました。また、この相互作用は 2 つのタンパク質がそれぞれフラグメント (タンパク質の断片構造) を出し合って 1 つのドメイン (独立した三次元構造と機能を持つタンパク質の一部分) を形成するという、これまで報告されていない非常にユニークな様式でした。また、SPR 法を用いた検索の結果、HOIL-1L/SHARPIN の結合は非常に解離が遅く (図 5)、新規に同定した HOIL-1L/SHARPIN 相互作用が安定な LUBAC 複合体の形成に非常に重要であることがわかりました。

LUBAC の量が減少すればその発がんに関与する機能は減弱するので、安定した LUBAC の形成に大きく寄与する HOIL-1L/SHARPIN の結合を阻害するペプチド阻害剤を開発しました。この阻害ペプチドは、細胞内の LUBAC の量を効率よく不安定化して減少させ (図 6)、その機能を抑制すること、さらに日本人に多い悪性

リンパ腫である「活性化 B 細胞様のびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫」(ABC DLBCL) 細胞を死滅させることが分かりました (図 7)。以上の結果から、HOIL-1L/SHARPIN の相互作用の阻害は、LUBAC 複合体の形成を抑制するため、新たな抗がん剤のターゲットであることを示すことが出来ました。

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究によって、安定した LUBAC 複合体形成のカギを握る HOIL-1L/SHARPIN の相互作用を阻害することが、新たな抗がん剤のターゲットであることを示すことが出来ました。この成果を踏まえ、本研究グループでは、HOIL-1L と SHARPIN との結合の阻害化合物の開発に着手しています。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究プロジェクトは、日本学術振興会・若手研究 B「直鎖状ポリユビキチン鎖による細胞死制御メカニズムの解明」、日本学術振興会・新学術領域研究「細胞の生存と死を決定する制御システムの数理モデル化」、日本学術振興会・新学術領域研究「直鎖状ポリユビキチン鎖の選択的生成機構とその役割」、日本学術振興会・基盤研究 A「直鎖状ポリユビキチン鎖生成リガーゼの機能とその委譲による疾患発症機構」、日本学術振興会・挑戦的萌芽研究「NF- $\kappa$ B を制御する直鎖状ユビキチン鎖生成調節薬の開発」、日本学術振興会・基盤研究 S「直鎖状ユビキチン鎖を生成する LUBAC リガーゼの統括的研究」、国立研究開発法人日本医療研究開発機構・革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST)「幹細胞における多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析」、日本学術振興会・新学術領域研究「ODMR と in-cell NMR による細胞内蛋白質間相互作用・動態の解析法の開発」の支援を受けて行われました。

<イメージ図>

図 1. HOIP/HOIL-1L 結合

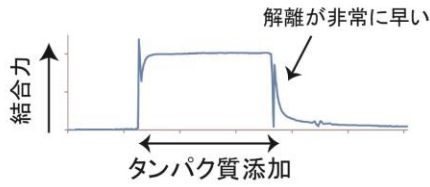


図 2. HOIP/SHARPIN 結合

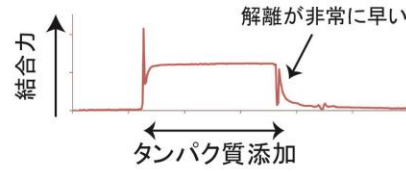


図 3. HOIP/HOIL-1L/SHARPIN 結合

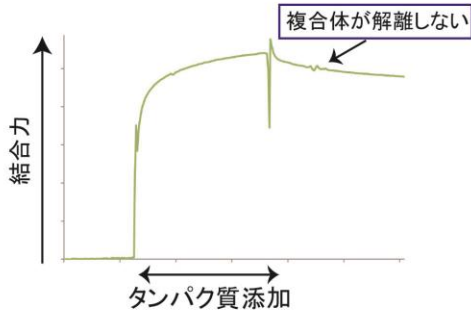


図 4. LUBAC の共結晶構造

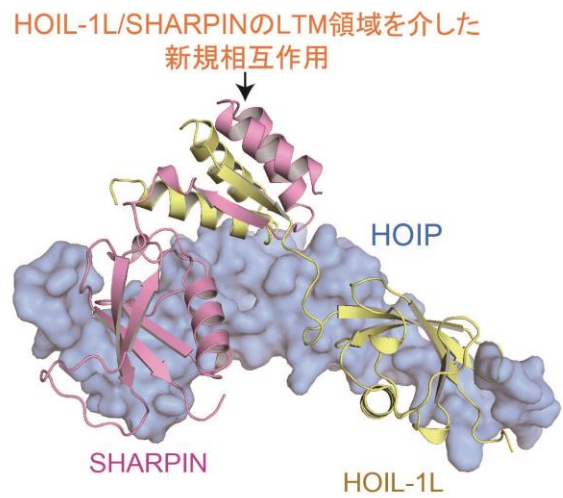


図 5. HOIL-1L/SHARPIN 結合

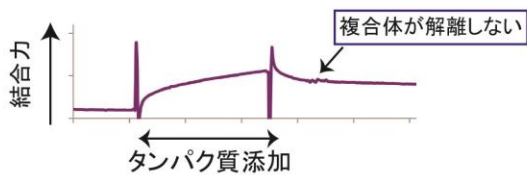


図 7. ペプチド阻害剤によるがん細胞の死滅

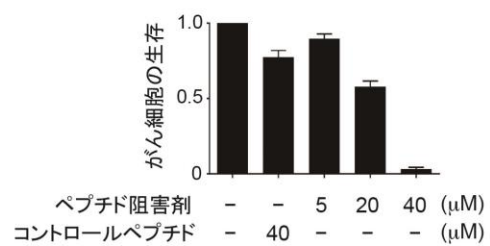
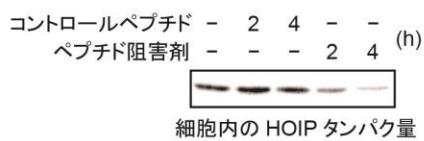


図 6. ペプチド阻害剤による HOIP 不安定化



**<論文タイトルと著者>**

タイトル : Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization

著者 : Hiroaki Fujita, Akira Tokunaga, Satoshi Shimizu, Amanda L. Whiting, Francisco Aguilar-Alonso, Kenji Takagi, Erik Walinda, Yoshiteru Sasaki, Taketo Shimokawa, Tsunehiro Mizushima, Izuru Ohki, Mariko Ariyoshi, Hidehito Tochio, Federico Bernal, Masahiro Shirakawa, and Kazuhiro Iwai

掲載誌 : Cell Reports DOI : <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.112>