総 説

自己免疫疾患とユビキチン修飾系

大 島 茂

Autoimmune diseases and ubiquitin system

Shigeru OSHIMA

Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

(Accepted December 4, 2017)

summary

Cytokines play important roles in the pathogenesis of autoimmune diseases. Anti-TNF α antibody therapy for rheumatoid arthritis, Crohn's disease, and psoriasis has made enough progress to change its treatment goal. This review focuses on the recent advances that have been made in understanding TNFR signaling through ubiquitin system. Genome-wide association studies (GWAS) identified numerous susceptibility loci associated with autoimmune diseases. Ubiquitin related genes TNFAIP3 and TNIP1 have been linked to multiple autoimmune diseases. Here, we review the importance of TNFAIP3 and TNIP1-mediated regulation of ubiquitin-dependent signaling. To monitor the dynamics of ubiquitin chain formation *in vivo*, we have developed a polyubiquitin-mediated fluorescence complementation (PolyUb-FC) assay. The PolyUb-FC assay has the advantage that monoubiquitination is non-fluorescent and chain-specific poly-ubiquitination can be directly visualized in living cells without using antibodies. The PolyUb-FC will be a useful tool for analyzing the dynamics of polyubiquitin chain generation.

Key words—— TNFAIP3 (A20); TNIP1 (ABIN-1); ubiquitin; TNF α ; autoimmune disease

抄 録

自己免疫疾患の病態形成にはサイトカインが重要な働きをしている。抗 TNF α 抗体の登場により関節リウマチ、クローン病、乾癬などの治療目標が変わるほどの進歩を遂げ、この成功により新たな炎症をターゲットとした治療法が次々と開発されている。驚くべきことは、抗 TNF α 抗体が承認された際は TNF α による NF κ B 活性化は判明していたが、TNF 受容体から NF κ B が活性化される分子機構の詳細や細胞死シグナルとの分岐点制御などが不明であったということである。抗 TNF α 抗体療法の作用機序や関連した新規薬剤の作用機序を深く理解するには TNF α シグナルを制御するユビキチン修飾系を理解しておく必要がある。本稿では TNF α シグナルをユビキチン修飾系の観点から概説する。また、複数の自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子として同定されているユビキチン関連遺伝子 TNFAIP3 と TNIP1 について述べる。TNFAIP3 と TNIP1 はユビキチンを介して NF κ B と細胞死シグナルを負に制御している。最後に、シグナル解析に有用なユビキチン可視化技術 (PolyUb-FC) も紹介する。

はじめに

自己免疫疾患は自己免疫寛容が破綻することで T 細胞や抗体が自己の細胞や組織の抗原と反応して臓器障害を生じると考えられている。その原因となる自己免疫寛容破綻機構は不明の疾患も多い。本稿においては炎症応答の中心的な役割を果たしている TNF α シグナル伝達をユビキチン修飾という観点から概説する。また、疾患関連遺伝子・パスウェイ解析にて自己免疫疾患と関連が明らかとなっているユ

ビキチン関連遺伝子 TNFAIP3 と TNIP1 について著者らのデータも含め解説するとともに、新しいユビキチン解析技術の解説から新規展開について述べる。

1) ユビキチン修飾系

ユビキチン修飾系は、標的タンパク質 (基質) に 76 アミノ酸からなるタンパク質であるユビキチンを付加することにより、細胞内でタンパク質の機能を制御する翻訳後修飾系である。ユビキチン修飾はタンパク質分解に留まらず、細胞現象や生体応答において様々な機能に関与している。ユビキチンタンパクは 4 種類のコードする遺伝子から作られてい

る¹⁾。ユビキチン分子内に7個存在するリジン（K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63）、およびN末端のメチオニン（M1）を介した8種のユビキチン間結合があり、細胞内にはこれらの多様な構造を持つポリユビキチン鎖が存在している²⁾。K48結合型ポリユビキチン鎖はタンパク質分解、K63結合型ポリユビキチン鎖はシグナル伝達やDNA修復、直鎖状ポリユビキチン鎖はNF- κ Bの活性化に関わっている（図1）。しかしながら、K27結合型、K29結合型、K33結合型等の修飾型によるタンパク機能制御の詳細や生体における意義は未だ明らかとされていない。さらにポリユビキチン鎖には分岐型や混合型なども存在することが明らかになってきているが生理的機能は不明である。

ポリユビキチン鎖は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種の酵素群によりユビキチンが付加されることで形成する。ヒトでは約600種類存在するE3が状況に応じて選択的に標的タンパク質（基質）を識別し、次々とユビキチンを付加している。そのことにより必要なタイミングで必要なポリユビキチン鎖が形成される。一方で、ポリユビキチン鎖を切断する脱ユビキチン化酵素（DUB）も約100種類ある³⁾。脱ユビキチン化酵素（DUB）はユビキチンを切り離し、ユビキチンを再利用プールに供給するとともに、シグナル活性制御等を行う。脱ユビキチン化酵素活性を担うOTUドメインをもつ分子を中心に鎖特異性が分子構造学的にも解析されている。CezanneはK11鎖特異的脱ユビキチン化酵素であり、OTUB1

はK48鎖特異的、TRABIDはK29鎖とK33鎖特異的であることなどが示されはじめた⁴⁾。これらのE3や脱ユビキチン化酵素（DUB）などユビキチン関連酵素群により標的タンパク質（基質）にユビキチンを選択的に付加・切断することで基質の機能を調節している。

2) TNF α シグナルとユビキチン修飾系

自己免疫疾患は臓器特異的自己免疫疾患と全身性自己免疫疾患に分けられている。炎症性サイトカインTNF α が多くの病態に関与していることは知られており、関節リウマチ・乾癬・クローン病などでは抗TNF α 抗体が著効することは周知の事実である。ユビキチン修飾系はこのTNF α シグナルの研究を中心に発展した。TNF（Tumor Necrosis Factor） α は腫瘍壊死因子と訳され、固形がんに対して壊死を誘導する因子として発見されたサイトカインである。ホモ三量体の形で膜型リガンドとして機能している。マクロファージをはじめ様々な細胞に作用し、炎症・発生・分化など広範囲な生物活性を持つことが知られている^{5,6)}。このTNF α シグナルの下流であるNF κ Bと細胞死シグナルはユビキチン修飾により制御されている（図2）。

2-1 TNF α 誘導性 NF- κ B とユビキチン

NF- κ B活性化にはTNF α などによる迅速に活性化される古典的経路（canonical pathway）とB細胞活性化因子などによる比較的ゆっくり活性化する非古典的経路（non-canonical pathway）がある⁷⁾。ここで

図1 ユビキチン修飾系

図2 TNFα シグナル

は TNFα 誘導性の古典的経路 NF-κB 活性化機構を概略する。一般的に非刺激下では NF-κB は IκBα と結合することにより抑制され細胞質優位に存在している。① TNFα 刺激に伴い, TNFR1 のオリゴマー化と TRADD, TRAF2, RIPK1 が会合し Complex1 を形成する⁸⁾。②その後 RIPK1 の K377 に K63 型ポリユビキチン化がおこる⁹⁾。③ LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) が Complex1 に誘導される。LUBAC は HOIL-1L, HOIP, SHARPIN の 3 つのサブユニットから構成される約 600 kDa の複合型 E3 である。④ LUBAC が RIPK1 や NEMO を直鎖型ユビキチン化する^{10, 11)}。⑤ NEMO 内には直鎖ユビキチンを強く結合する UBAN ドメインが存在し直鎖型ポリユビキチン鎖を足場として IKK 複合体が Complex1 に集積する。⑥ IKK 複合体は IKKα, β および γ (NEMO) の 3 つのサブユニットから構成され, IKK の分子間相互作用により IKKβ が活性化される。⑦ IκBα をリン酸化の後, K48 結合型ポリユビキチン化され, IκBα はタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームにより分解を受ける。⑧これにより IκBα により抑制されていた NF-κB が核に移行することが可能となり目的遺伝子の転写活性化を行う。このように Complex I において, K63 型ポリユビキチン鎖, 直鎖型ポリユビキチン鎖が重要な役割を担っていることは疑いないが, 使い分けなど詳細な機構は未だ議論されている。

2-2 TNFα 誘導性細胞死シグナルとユビキチン

長らく TNFα により誘導される計画された細胞死はアポトーシスで, 壊死は偶発的な細胞死と考えられてきた。しかし, 2009 年に TNFα により誘導される計画された壊死 (ネクロプトーシス) の実行因子として RIPK3 が報告された¹²⁾ のを契機に TNFα 誘導性細胞死シグナルの研究は急速に発展した。続いて, アポトーシス経路に関する遺伝子 FADD, Caspase8, cFLIP 欠損マウスの胎生致死が RIPK1 もしくは RIPK3 欠損マウスとの交配で改善することも明らかとなった¹³⁻¹⁵⁾。このことにより Caspase の活性阻害により RIPK1/RIPK3 依存性のネクロプトーシスが誘導され胎生致死になることが遺伝学的に示された。現時点での細胞死シグナルの概略を述べる。① TNFα 誘導性アポトーシスにはユビキチン化されていない RIPK1 と caspase 活性化が必要である。TNFα 刺激後 Complex I のポリユビキチン化された RIPK1 が脱ユビキチン化され細胞質に移動する。そこで, TRADD, FADD, Caspase8, cFLIP と結合し, Complex IIa を形成する。また cIAP が存在しない状態では RIPK1 は FADD, Caspase8, cFLIP, RIPK3 と Complex IIb を形成する。Caspase8 が Complex IIa と Complex IIb の RIPK1 および RIPK3 を不活化することで従来から考えられてきたアポトーシスが誘導される。②一方, ネクロプトーシスでは同様に Complex I のポリユビキチン化された RIPK1 が脱ユ

ビキチン化され細胞質に移動する。FADD や不活化された Caspase8 とともに, RIPK1 が複数の RIPK3 を誘導し Necrosome を形成する。Caspase が抑制された条件ではこの Necrosome が MLKL をリン酸化しネクロプトーシスを誘導する。著者らはこの Necrosome が RIPK3 のユビキチン化で制御されていることを明らかにした¹⁶⁾。しかし, 複数ある RIPK3 のユビキチン化部位や鎖特異性については今後の詳細な検討が必要である。現在では, TNF α シグナルだけではなく LPS 刺激下, DNA 障害, ある種のウイルス感染, 抗がん剤投与時などでネクロプトーシスが誘導されることが示され, 生体は状況に応じてアポトーシスとネクロプトーシスを使い分けていることが分子機構から明らかになりつつある。

3) 自己免疫疾患とユビキチン関連遺伝子 TNFAIP3 と TNIP1

関節リウマチに代表される膠原病, 乾癬などの皮膚疾患, クローン病や潰瘍性大腸炎などの消化器疾患など多くの原因不明な自己免疫疾患がある。ヒトゲノム解析 (GWAS) において様々な疾患の感受性遺伝子が同定され, その中にはユビキチン修飾に関わる遺伝子が含まれている。本稿では TNF α シグ

ナルとユビキチンに関わる TNFAIP3 (A20) および TNIP1 (ABIN-1) について解説する。

3-1 TNFAIP3

TNFAIP3 (TNF alpha-inducible protein 3, A20) は TNF α により誘導される遺伝子として同定された。多くの細胞では低レベルに発現し NF κ B の活性化とともに強く誘導される。一方リンパ球においては恒常的に発現している。構造的には E3 機能を持つ 7 つの ZF ドメインと脱ユビキチン化酵素 (DUB) 活性をもつ OTU ドメインの両方を持つ複雑な分子である^{17, 18)}。7 番目の ZF ドメイン (ZF7) が直鎖型ユビキチン鎖と結合する (図 3)。

TNFAIP3 は, TNF α 刺激においては RIPK1 の K63 と直鎖型ポリユビキチン鎖の脱ユビキチン化酵素 (DUB) として機能し, TNFAIP3 欠損ではユビキチン鎖が遷延することで NF κ B が強く活性化される¹⁹⁾。また, 同様に TLR 下流の TRAF6 のポリユビキチン化, NOD2 下流の RIPK2 のポリユビキチン化の脱ユビキチン化酵素 (DUB) として機能しており^{20, 21)}, TNFAIP3 が欠損すると NF κ B シグナルが増強される。つまり TNFAIP3 は NF κ B のネガティブフィードバック機構として重要な役割を果たしている。

図 3 TNFAIP3 と TNIP1

1) 両分子構造, 2) 感受性遺伝子として報告されている代表的疾患, 3) TNFAIP3 はネガティブフィードバックとして機能する。

しかし、複雑なことに TNFAIP3 は細胞死シグナルも抑制している。TNFAIP3 欠損細胞では一般的に NFkB が活性化しており、サイトカイン産生や細胞増殖が活発化している。一方で生体では活性化が強すぎると悪影響のため、活性化細胞を除去し自己防御するシステムと考えられる。細胞種やリガンドによりバランスが異なっており、ヒト疾患における TNFAIP3 変異や遺伝多型による表現系の違いはこのバランスがどのように崩れるかによると考えられる。

近年、TNFAIP3 の遺伝子変異が主に B 細胞リンパ腫の主要な発症原因であることが明らかとなり、TNFAIP3 変異による原発性免疫不全症も報告されている²²⁾。著者らは、TNFAIP3 がクローン病感受性遺伝子であることを報告してきた²³⁾。また TNFAIP3 はセリアック病、関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、SLE、強皮症などの自己免疫疾患の感受性遺伝子として報告されている。炎症性腸疾患において TNFAIP3 遺伝子多型と抗 TNF 抗体治療効果に明らかな相関を認めており²⁴⁾、臨床的にも非常に重要な遺伝子である。

さらに著者らのグループおよびいくつかのグループで動物モデルの解析が活発に行われた。全身性 TNFAIP3 欠損マウスでは全身に炎症を認め、1ヶ月前後に死亡する²⁵⁾。DC 特異的欠損マウスでは関節炎²³⁾、B 細胞特異的欠損マウスでは SLE 様自己抗体を観察した²⁶⁾。他のグループからは皮膚特異的欠損マウスで乾癬様所見を認めている²⁷⁾。さらに腸炎についても多く解析されている。TNFAIP3 全身性欠損マウスでは自然発症腸炎を認め²⁵⁾、腸管上皮細胞特異的欠損マウスでは腸管上皮細胞死増加および実験腸炎の増悪する²⁸⁾。また、腸管上皮細胞における TNFAIP3 発現はタイトジャンクションを介してバリア機能も制御していることも明らかとなった。さらに DC 特異的欠損マウス、上皮・マクロファージ欠損マウスが自然発症腸炎を認めている^{23, 24)}。以上のように多くの疾患モデルにおいて TNFAIP3 欠損で自己免疫疾患様表現系を示しているが、リンパ球特異的欠損マウスを用いた EAE モデルでは逆に炎症が改善する^{16, 29)}。このことは疾患モデルにおいても NFkB 制御と細胞死制御のバランスが重要であることを示している。TNFAIP3 機能の理解を複雑にしているが、自己免疫疾患病態解明のためには越えなければならない壁である。

3-2 TNIP1

TNIP1 (TNFAIP3-interacting protein 1, ABIN-1) は TNFAIP3 と結合する分子として同定された。TNIP1 は酵素ドメインが見いだされておらず、ポリユビキチン鎖に結合することで NFkB や細胞死シグナルに作用すると考えられている。著者らは TNIP1 に NEMO と同様なポリユビキチン鎖ドメインを持つことを見だし、このポリユビキチン結合配列 (UBAN, ubiquitin-binding in ABIN and NEMO) が細胞死シグナル伝達において重要な役割を担っていることを報告し³⁰⁾ (図 3)、さらに直鎖ユビキチン優位に結合することが報告されている³¹⁾。TNIP1 も、ヒトゲノム解析 (GWAS) において様々な疾患の感受性遺伝子として同定されている。乾癬、乾癬性関節炎、SLE、強皮症ではイントロンの遺伝子多型が疾患感受性と関係していることが報告されている³²⁾。また、白血病、リンパ腫や慢性関節リウマチでは TNIP1 遺伝子発現に差があることが報告されている。これらのことより TNIP1 は、自己免疫疾患と関係する遺伝子であり非常に重要な新しい分子であることが分かる。

動物モデル解析においては、TNIP1 欠損マウスは胎生致死で³⁰⁾、DC 特異的欠損マウス³³⁾ や皮膚特異的欠損マウス³⁴⁾ では乾癬様表現系を認めた。さらに UBAN の変異体マウスでは全身に自己免疫疾患様表現系を認めている³¹⁾。このように TNFAIP3 および TNIP1 は多くの自己免疫疾患において病態への関与が示されておりヒトゲノムのみならず動物モデルでもユビキチンを介したシグナルの重要性を示している。今までの解析はそれぞれの遺伝子についてであったが、いくつかの疾患で TNFAIP3 と TNIP1 が同時に感受性遺伝子として同定されていることから TNFAIP3/TNIP1 分子複合体が自己免疫疾患に重要であることが示唆されている。TNFAIP3 と TNIP1 の相互作用が今後の重要な研究課題であり、解明することで自己免疫疾患の病態に迫れると考えられる。

4) ユビキチン鎖可視化 (PolyUb-FC) の樹立

ポリユビキチン鎖の機能として近年着目されているのがオートファジーである。オートファジーはタンパク質だけではなくオルガネラや細菌も分解できる大規模な分解機構であり、自己免疫疾患では SLE やクローン病などで着目されている^{35, 36)}。オートファジーは基質認識に特異性がないと考えられて

きたが、特異的に認識する選択的オートファジーが明らかになってきた^{37, 38)}。細胞に侵入した病原細菌に壊された endosome 膜、損傷を受けたオルガネラ、変性タンパク質凝集体（アグリソーム）などの標的カーゴ基質がユビキチン鎖で標識される。ユビキチン鎖標識された基質はカーゴ受容体（p62 や NBR1 など）を介して隔離膜上に局在する LC3 などと結合し、最終的にオートファゴゾームに捕捉され分解される。認識されるポリユビキチン鎖としては K63 型や K27 型などが報告がされているが、ポリユビキチン鎖がいかなる特異性や選択性をもってカーゴ受容体と結合し、カーゴ分解されるかの全体像は不明である。そこで著者らは、自己免疫疾患（特にクローン病）におけるユビキチン鎖の解析を進めるためユビキチン鎖の動的可視化を試みた。いままで様々なユビキチンの可視化が試みられてきた。鎖特異的抗体は、動的解析は不可能であり、Ub-GFP 発現ベクターや Ub-GFP トランスジェニックマウスは鎖状になる前から蛍光標識されており、モノユビキチン・フリーユビキチン・ポリユビキチン鎖との顕微鏡的判別は不可能であった。NEMO や TNIP1 のポリユビキチン鎖結合ドメインを用いたセンサータンパク質は、鎖特異的結合タンパク質を蛍光標識し細胞内動態を解析するが、鎖状になる前から蛍光標識されており動的解析には不十分であるとともに、鎖特異的タンパク質が未だ限られていた³⁹⁾。そこで、ポリユビキチン鎖を検出する手法の開発に取り組み、著者らは、蛍光タンパク質再構成法（bimolecular fluorescence complementation, BiFC）による分子間相互作用の検出原理⁴⁰⁾を用いて PolyUb-FC を樹立した⁴¹⁾。予め 2 つに分割した蛍光タンパク質 monomeric Kusabira-Green (mKG) の遺伝子に、ユビキチン遺伝子をそれぞれ融合し、ユビキチンが相互作用すると、分割した mKG の断片が近接により再構成され蛍光能を回復し、相互作用を蛍光シグナルとし

図4 PolyUb-FC システム

て検出することが可能である。この蛍光タンパク質再構成法（BiFC 法）を用いることにより鎖特異的なポリユビキチン鎖を可視化することが可能となった（図4）。例えば、DNA 二本鎖損傷が起きると、損傷部位に様々なタンパク質が集結し修復のための足場作り・時間稼ぎ・修復方法の選択などを行っていると考えられている。その修復機構には K63 型ポリユビキチン鎖が誘導されることは示されている⁴²⁾。そこで著者らはネオカルジノスタチン（neocarzinostatin）を用いて DNA 二本鎖損傷を誘導した際の K63 鎖誘導性を、PolyUb-FC と K63 特異的抗体をもちいた系で比較した。PolyUb-FC と K63 特異的抗体免疫染色と遜色がないことを示し、PolyUb-FC は動的解析ができる優位性が考えられた。

次に応用として K33 結合型ポリユビキチン鎖の動態を世界で初めて観察することに成功した。この可視化可能となった K33 鎖ポリユビキチン鎖が生理的な機能を持っているかを検討するため、オートファジーについて検討した。カーゴ受容体 p62 のポリユビキチン鎖結合は K63 鎖や K48 鎖では知られていたが K33 鎖については不明であった。そこで PolyUb-FC を用いて K33 鎖について検討した。PolyUb (WT)-FC は p62 と共局在することが確認さ

図5 K33 鎖の可視化
p62 ノックダウンにて K33 鎖と LC3 の共局在が消失する。

れたが、驚いたことに PolyUb (K33)-FC も p62 と共局在することが判明した。この結合が本当に p62 であることを確認するため、ユビキチン結合ドメイン (UBA ドメイン) を欠損させた p62 を用いて検討し、PolyUb (K33)-FC と p62 との共局在は UBA ドメインを介していることを確認した。さらに、PolyUb (K33)-FC が LC3 と共局在することも見いだし、p62siRNA にてこの共局在が減弱することも見いだした (図 5)。以上より、p62 は K63 鎖や K48 鎖のポリユビキチン鎖だけでなく K33 鎖のポリユビキチン鎖にも結合し、オートファジーに関与していることが判明した。PolyUb-FC は、応用範囲が大きく、ユビキチンの理解に留まらず、ユビキチンが関与する疾患病態理解と制御へ向けた技術基盤を提供するものである。今後の自己免疫疾患を解析する上で重要なツールになると考えられる。また、著者らのグループでは分子特異的なポリユビキチン化の可視化も開発しておりさらなる進展が期待される。

おわりに

近年の抗 TNF α 抗体治療は、たとえ原因は不明でも、炎症が生じている免疫系の 1 カ所をポイントで是正することにより炎症を抑えられることを示した画期的な治療法である。現在、免疫応答をターゲットとした治療法が次々と開発されつつあるが、本稿のユビキチン修飾系の解説が新規薬剤作用機序理解の手助けになれば幸いである。また、ユビキチン修飾系はオートファジーとも深く関わっており創薬標的としてユビキチン修飾が着目されており更なる展開から目が離せない。

謝 辞

カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) Averil Ma 教授研究室および東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科消化器病態学渡辺守教授研究室にて行った研究成果を含めた総説であり、両教授とともに共同研究者および大学院生に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kobayashi, M., et al.: The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development. *Sci Rep.* **6**: 36780, 2016.

- 2) Kulathu, Y., Komander, D.: Atypical ubiquitylation – the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**: 508–523, 2012.
- 3) Mevissen, T.E. et al.: OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis. *Cell.* **154**: 169–184, 2013.
- 4) Michel, M.A. et al.: Assembly and specific recognition of k29- and k33-linked polyubiquitin. *Mol Cell.* **58**: 95–109, 2015.
- 5) Ting, A.T., Bertrand, M.J.: More to Life than NF- κ B in TNFR1 Signaling. *Trends Immunol.* **37**: 535–545, 2016.
- 6) Brenner, D., et al.: Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol.* **15**: 362–374, 2015.
- 7) Hayden, M.S., Ghosh, S.: NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* **26**: 203–234, 2012.
- 8) Chang, L., et al.: The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell.* **124**: 601–613, 2006.
- 9) Ea, C.K., et al.: Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell.* **22**: 245–257, 2006.
- 10) Tokunaga, F. et al.: Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol.* **11**: 123–132, 2009.
- 11) Tokunaga, F., et al.: SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature.* **471**: 633–636, 2011.
- 12) He, S., et al.: Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell.* **137**: 1100–1111, 2009.
- 13) Kaiser, W.J., et al.: RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature.* **471**: 368–372, 2011.
- 14) Oberst, A., et al.: Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature.* **471**: 363–367, 2011.
- 15) Zhang, H., et al.: Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. *Nature.* **471**: 373–376, 2011.
- 16) Onizawa, M., et al.: The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. *Nat Immunol.* **16**: 618–627, 2015.

- 17) Ma, A., Malynn, B.A.: A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat Rev Immunol.* **12**: 774–785, 2012.
- 18) Catrysse, L., et al.: A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* **35**: 22–31, 2014.
- 19) Wertz, I.E., et al.: De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature.* **430**: 694–699, 2004.
- 20) Boone, D.L., et al.: The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol.* **5**: 1052–1060, 2004.
- 21) Hitotsumatsu, O., et al.: The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity.* **28**: 381–390, 2008.
- 22) Takagi, M., et al.: Haploinsufficiency of TNFAIP3 (A20) by germline mutation is involved in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* **139**: 1914–1922, 2017.
- 23) Hammer, G.E., et al.: Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nat Immunol.* **12**: 1184–1193, 2011.
- 24) Vereecke, L., et al.: A20 controls intestinal homeostasis through cell-specific activities. *Nat Commun.* **5**: 5103, 2014.
- 25) Lee, E.G., et al.: Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science.* **289**: 2350–2354, 2000.
- 26) Tavares, R.M., et al.: The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity.* **33**: 181–191, 2010.
- 27) Lippens, S., et al.: Keratinocyte-specific ablation of the NF-kB regulatory protein A20 (TNFAIP3) reveals a role in the control of epidermal homeostasis. *Cell Death Differ.* **18**: 1845–1853, 2011.
- 28) Vereecke, L., et al.: Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J Exp Med.* **207**: 1513–1523, 2010.
- 29) Matsuzawa, Y., et al.: TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy.* **11**: 1052–1062, 2015.
- 30) Oshima, S., et al.: ABIN-1 is a ubiquitin sensor that restricts cell death and sustains embryonic development. *Nature.* **457**: 906–909, 2009.
- 31) Nanda, S.K., et al.: Polyubiquitin binding to ABIN1 is required to prevent autoimmunity. *J Exp Med.* **208**: 1215–1228, 2011.
- 32) G'Sell, R.T., et al.: A20-Binding Inhibitor of NF-kB Activation 1 is a Physiologic Inhibitor of NF-kB: A Molecular Switch for Inflammation and Autoimmunity. *Arthritis Rheumatol.* **67**: 2292–2302, 2015.
- 33) Callahan, J.A., et al.: Cutting edge: ABIN-1 protects against psoriasis by restricting MyD88 signals in dendritic cells. *J Immunol.* **191**: 535–539, 2013.
- 34) Ippagunta, S.K., et al.: Keratinocytes contribute intrinsically to psoriasis upon loss of Tnfr1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113**: E6162–E6171, 2016.
- 35) Mizushima, N., Komatsu, M.: Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* **147**: 728–741, 2011.
- 36) Jiang, P., Mizushima, N.: Autophagy and human diseases. *Cell Res.* **24**: 69–79, 2014.
- 37) Shaid, S., et al.: Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* **20**: 21–30, 2013.
- 38) Rogov, V., et al.: Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.* **53**: 167–178, 2014.
- 39) van Wijk, S.J., et al.: Fluorescence-based sensors to monitor localization and functions of linear and K63-linked ubiquitin chains in cells. *Mol Cell.* **47**: 797–809, 2012.
- 40) Kerppola, T.K.: Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 449–456, 2006.
- 41) Nibe, Y., et al.: Novel polyubiquitin imaging system, PolyUb-FC, reveals that K33-linked polyubiquitin is recruited by SQSTM1/p62. *Autophagy.* 2017 in press.
- 42) Kato, K., et al.: Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. *Mol Cell.* **53**: 617–630, 2014.