

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21229

研究課題名(和文)新規ベーチェット病感受性遺伝子TRIM39RにおけるIFN制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms regulating IFN responses in the novel susceptible gene of Bechet's disease, TRIM39R.

研究代表者

倉田 里穂 (Kurata, Riho)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70711729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ベーチェット病の疾患関連遺伝子領域から3つの蛋白質、TRIM39、TRIM39R、およびRPP21が作られる。これらのうちTRIM39Rのみ、過剰発現によってNF- $\kappa$ BおよびIRFを誘導することを確認した。TRIM39とTRIM39Rは類似した立体構造をとるが、ホモ二量体においてC末端ドメインの配置に相違があることが、3次元立体構造解析によって予測された。さらに、TRIM39Rの遺伝子欠損およびヒトTRIM39R遺伝子導入マウスの作出に成功した。TRIM39Rが制御する炎症応答について、*in silico*、*in vitro*および*in vivo*の多様な視点から解析を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ベーチェット病(BD)感受性遺伝子として同定したTRIM39Rが炎症性サイトカイン産生および型IFN応答を制御することを明らかにした。TRIM39RはBDだけでなく、全身性エリテマトーデスや炎症性腸疾患および乾癬などとの関連も報告されている。また炎症性サイトカイン産生および型IFN応答はウイルス感染防御に重要で、TRIM39Rはウイルス感染後の炎症応答を開始させる重要な分子の1つである可能性が考えられる。今後TRIM39Rの炎症応答における機能解析を進めることで、炎症を伴う様々な感染症や疾患の病態解明に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Three proteins, TRIM39, TRIM39R, and RPP21, are generated from genes in the susceptible genetic region of Bechet's disease. Among these, only TRIM39R was shown to induce NF- $\kappa$ B and IRF by overexpression. Although TRIM39 and TRIM39R have relative similar three-dimensional structures, but the difference of the C-terminal domain in homodimers was showed by three-dimensional structural analysis. Furthermore, we succeeded in establishing TRIM39R-deficient and human TRIM39R transgenic mice. We are going to continue to analyze molecular mechanism of TRIM39R using various approaches such as, *in silico*, *in vitro* and *in vivo*.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 炎症 自己免疫疾患 ベーチェット病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ベーチェット病 (Bechet's disease: BD) は、口腔粘膜や外陰部の潰瘍および皮膚やぶどう膜の炎症を主症状とする全身性の炎症性疾患である。近年では、抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤が奏功しているが、ぶどう膜炎または腸管炎の症状を示す症例のみでしか治療の適応が認可されていない。度重なる炎症症状によって Quality of life が著しく低下することから、新規治療法は社会的に要求性が高い。その一方で、BD の病態は十分に理解されていない。

遺伝的要因として、ヒト白血球抗原 (HLA) -B\*51、HLA-A\*26 が報告されている。特に、HLA-B\*51 アリルはメタ解析により、民族に関係なく共通の遺伝的要因である。さらに、ゲノムワイドな関連解析により、Interleukin (IL)-10 および IL23R-IL12RB2 が報告された。我々は、これらに加えて、HLA 領域の SNP 関連解析により、隣接する tripartite motif-containing (TRIM) 39 から ribonuclease P/mitochondrial RNA processing 21 kDa subunit (RPP21) の領域に感受性を見出した (Kurata R et al. *Biochem Biophys Res Commun* 401:533-537, 2010)。

TRIM39 は p53 を制御し、細胞周期を G1/S 期に留める (Lei Z et al. *PNAS*. 109:20937-20942, 2012)。Rpp21 はリボヌクレオタンパク質で、tRNA の 5' 末端を修飾する RNaseP のサブユニットである (Jarrous N et al. *RNA*. 7:1153-1164, 2001)。

TRIM はヒトゲノム上に約 70 存在する分子ファミリーで、特徴的な構造として、N 末端側から RING、B-box および Coiled-coil の 3 つを含むドメイン構造 (RBCC) を保持する (Nisole S et al. *Nat Rev Microbiol*. 3:799-808, 2005)。C 末端側には様々なドメインが保持され、それらのドメインによって、11 のサブクラスに分けられる (Ozato K et al. *Nat Rev Immunol*. 8:849-860, 2008)。分子機能としては、RING を介した E3 ユビキチン (Ub) リガーゼが重要で、多くの TRIM がこの活性を保持していることが予想されている (Meroni G et al. *BioEssays* 27:1147-1157, 2005)。また、C 末端側のドメイン構造も機能に重要で、近年、TRIM39 が属する SPRY を保持するサブクラスにおいて、HIV などのウイルスに対する感染防御、IFN 応答および自己免疫疾患への関与が報告された (Versteeg GA et al. *Immunity*. 38:384-398, 2013 and Gack MU et al. *Nature*. 446:916-920, 2007)。加えて、TRIM39 と Rpp21 遺伝子間のインタージェニックプライミングにより、mRNA からキメラタンパク質 TRIM39-RPP21 (TRIM39R) が翻訳される (Roberts Jr JD et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 293:903-912, 2007)。TRIM39R は TRIM39 の C 末端に位置する SPRY ドメインが欠損し、代わりに RPP21 の機能ドメイン RPR を有する構造をとる。TRIM39、TRIM39R、RPP21 各遺伝子の機能は、ほとんど明らかにされていないため、各遺伝子の過剰発現系 HEK293T 細胞を樹立し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析を行い、TRIM39R がインターフェロン (IFN) 誘導性遺伝子、ケモカインおよびインターロイキンなどを誘導することに加え、有意にウイルスや細菌感染防御および I 型 IFN 応答に関与する遺伝子を調節することも明らかにした (Kurata R et al. *BBRC*. 436:90-5, 2013)。BD の発症は病原微生物の感染が引き金となり、白血球をはじめとした免疫系の異常活性化により、強い炎症症状を引き起こすことが原因であると考えられており、TRIM39R が BD の病態に重要である可能性が高い。

### 2. 研究の目的

BD の病態に炎症が重要であることと、TRIM39R が炎症応答に関与することから、TRIM39R を取り巻く炎症応答を解明することが BD の病態を理解するために必要であると考えた。

TRIM39R の分子機能はほとんど明らかにされていないため、本研究は TRIM39R 蛋白の基礎的な機能解析を中心に推進した。

### 3. 研究の方法

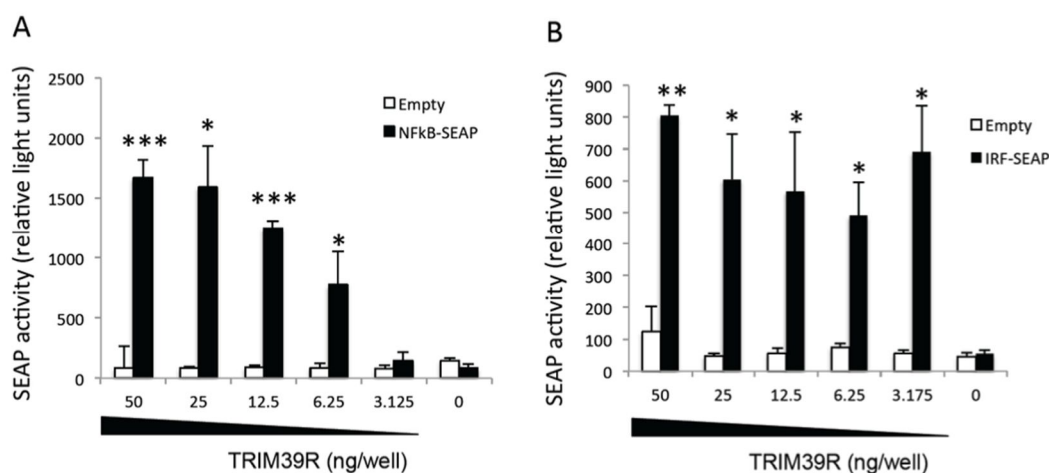
NF- $\kappa$ B および IRF 誘導性の検討については、分泌型アルカリホスファターゼを連結したエピソーマルベクター (NF $\kappa$ B-SEAP および IRF-SEAP) を HEK293T 培養細胞に導入し、レポーター遺伝子恒常発現細胞株をそれぞれ樹立した。次に、樹立したレポーター細胞にヒト由来の TRIM39、TRIM39R および RPP21 遺伝子を過剰発現し、48 時間培養した。この時、遺伝子発現ベクターの添加量を段階的に振り、アルカリホスファターゼの分泌量から NF- $\kappa$ B および IRF の誘導性を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) NF- $\kappa$ B および IRF 誘導性の検討

TRIM ファミリーのほとんどが NF- $\kappa$ B 誘導性を有するが、TRIM39 にはないことが報告されている (Tomar D et al. Biol Cell 107:22-40, 2015)。また、TRIM39R については知見がない。そこで、BD 感受性ゲノム領域における 3 つの発現蛋白、TRIM39、TRIM39R および RPP21 について、炎症性サイトカイン産生に重要な NF- $\kappa$ B および Ⅱ型 IFN 誘導に重要な IRF 誘導性について検討した。

NF- $\kappa$ B-SEAP および IRF-SEAP を導入したレポーター細胞に TRIM39、TRIM39R および RPP21 を過剰発現したところ、TRIM39R のみが NF- $\kappa$ B および IFN を惹起した。TRIM39R について遺伝子発現ベクターの添加量を段階的に振ったところ、NF- $\kappa$ B については、ベクター添加量依存的にアルカリホスファターゼの分泌量が増えた (図 A)。一方、IFN については、ベクター添加量との依存性は見られなかったが、空ベクター導入コントロールと比較して、顕著にアルカリホスファターゼ分泌が見られた (図 B)。これらの結果から、TRIM39R が炎症性サイトカイン産生や Ⅱ型 IFN 誘導に重要であることが明らかとなった (Kurata R et al. Curr Pharm Biotechnol 19:224-231, 2018)。



##### (2) 3次元立体構造の予測

これまでに3次元立体構造が予測された TRIM ファミリー蛋白は、共通して、N 末端に保有する 3 つのドメインから成る RBCC によって、基本的な蛋白の立体構造が形成される。また、RING, B-box ドメインが両末端に位置するように、互いに逆向きになり、Coiled-coil ドメイン同士で結合してホモ二量体を形成される。TRIM ファミリー蛋白の3次元立体構造解析は一部の TRIM でしか進んでおらず、TRIM39 および TRIM39R については報告がない。

N 末端のドメイン構造を共有する TRIM39 と TRIM39R で NF- $\kappa$ B および IRF 誘導性に違いがあることから、それぞれの蛋白質の3次元立体構造を予測し、相違点を検討した。

TRIM39 および TRIM39R は共に、他の TRIM 蛋白と同様に RBCC によって基本的な立体構造を形成することと、ホモ二量体を形成することが予測された。しかしながら、ホモ二量体に置いて、C 末端ドメインの配置に違いが予測された。

##### (3) 遺伝子改変マウスの作出

TRIM39R は TRIM39 と RPP21 のインタージェニックプライシングによって成る遺伝子で、その大部分の領域を TRIM39 および RPP21 と共有しているため、特異的に欠損させることが難しい。そのため、TRIM39R と TRIM39 に共通の N 末端側の領域を標的とし、TRIM39 および TRIM39R の両方が欠損するようにデザインした guide RNA を作製した。この guide RNA を用いて、TRIM39 遺伝子改変マウスを C57BL/6 および BALB 近郊系マウスで作製し、ライン化に成功した。遺伝子導入マウスについては、Rosa26 遺伝子座に標的遺伝子を導入する実験系を樹立し、ヒト TRIM39R の Tg マウスの作製に成功した。今後、これらの遺伝子改変マウスを用いた病態解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Riho Kurata, Asuka Kumagai, Xiaofeng Cui, Masamitsu Harada, Jun Nagai, Yasuhiro Yoshida, Kei-ichi Ozaki, Yoshimasa Tanaka and Tomo Yonezawa.	4. 巻 19
2. 論文標題 Establishment of Novel Reporter Cells Stably Maintaining Transcription Factor-driven Human Secreted Alkaline Phosphatase Expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Pharm Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 224-231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1389201019666180418093334.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Asuka Kumagai, Kenji Shimizu, Riho Kurata, Xiaofeng Cui, Takayuki Isagawa, Masamitsu Harada, Jun Nagai, Yasuhiro Yoshida, Kei-ichi Ozaki, Norihiko Takeda, Hiroaki Semba and Tomo Yonezawa.	4. 巻 20
2. 論文標題 Establishment of Novel Cells Stably Secreting Various Human IL-18 Recombinant Proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Pharm Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 47-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1389201020666190206203640.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 倉田 里穂, 熊谷 飛鳥, 尾崎 恵一, 米澤 朋.	4. 巻 34
2. 論文標題 多発性硬化症等の自己免疫疾患治療薬作出のための化合物スクリーニング.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica.	6. 最初と最後の頁 52-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉田 里穂, 熊谷 飛鳥, Xiaofeng Cui, 原田 将光, 永井 潤, 吉田 安宏, 尾崎 恵一, 米澤 朋.
2. 発表標題 ヒト分泌型アルカリホスファターゼ発現を安定に維持する新規レポーター細胞の樹立.
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷 飛鳥, 清水 謙次, 倉田 里穂, Xiaofeng Cui, 砂河 孝行, 原田 政光, 永井 潤, 吉田 安宏, 尾崎 恵一, 米澤 朋.
2. 発表標題 多様なヒトIL18組換えタンパク質を安定に分泌する新規細胞の樹立.
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----