

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02607

研究課題名(和文) TRIMファミリータンパク質によるユビキチンネットワーク制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of ubiquitin network regulation by TRIM family proteins

研究代表者

畠山 鎮次 (Hatakeyama, Shigetsugu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70294973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫反応やがん化、細胞分化を制御するシグナル伝達制御にTRIMファミリーユビキチンリガーゼが関与していることが示され、最近では細胞内情報伝達系の多くの分野において注目されている。本申請においては、網羅的ノックダウンスクリーニングやユビキチン化に特化したプロテオミクス的手法により、TRIMファミリーユビキチンリガーゼを基軸とした細胞内ネットワークシステムを網羅的に解析した。さらに、TRIMファミリーのがん化および免疫系での機能を解明することで、自己免疫疾患、アレルギー疾患及びがんの診断や治療に貢献する知見を得ることを進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは各TRIMタンパク質の機能が個別に報告されてきたが、本申請研究では網羅的にTRIMタンパク質に関するさまざまな細胞内シグナルを解析し、新たな基質タンパク質の同定に結び付いた。本研究成果により、TRIMファミリーによる翻訳後修飾(特にユビキチン化)の生理機能および疾患との関連の解明が進み、最終的にはがん化、細胞分化・個体発生・神経変性疾患・自己免疫疾患などの多様な方面における総合的理解にも貢献する可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that TRIM family ubiquitin ligases are involved in the regulation of signal transduction and autophagy that control immune response, oncogenesis and cell differentiation, and has recently attracted attention in many fields of intracellular signal transduction system. In this application, we comprehensively analyzed the intracellular network system based on TRIM family ubiquitin ligase by comprehensive knockdown screening and proteomics method specialized in ubiquitination. Furthermore, by elucidating the functions of TRIM family in oncogenesis and the immune system, we proceeded to obtain findings that contribute to the diagnosis and treatment of autoimmune diseases, allergic diseases and cancers.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン TRIMタンパク質 細胞内シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

「タンパク質」は、「からだ」を構成する主要な要素であるので、その量と機能の調節は非常に重要である。「ユビキチン化」はタンパク質分解を制御する化学修飾であり、多くの生命現象(タンパク質分解のみならず酵素の活性なども制御)を支える極めて重要な翻訳後修飾の一つである。(ユビキチン化反応)その反応系は、ユビキチンリガーゼ(E3)が選択的に基質タンパク質を認識することによって進む反応である。ヒト遺伝子上にE3と予想されるタンパク質の遺伝子は約600遺伝子あることが推測されており、申請者が解析してきたTRIM型E3ファミリーの遺伝子も、ヒトゲノムにおいて大きな遺伝子ファミリー(約70遺伝子)を形成していることが判明している[*Trends Biochem Sci* 42:296 (2017); *Nature Rev Cancer* 11:792 (2011)]。

1990年代までは酵母の細胞周期研究を中心に「ユビキチン化」研究が行われてきたが、21世紀直前になり、申請者らの発見によりヒトを含む哺乳類のユビキチン化酵素(特にRING型E3ユビキチンリガーゼの存在)の実態が明らかになった[*PNAS* 96:11364 (1999)]。その後、多くのE3ユビキチンリガーゼが報告され、ヒトでは約600種の遺伝子があると推測されている。TRIMファミリーはRING型E3ユビキチンリガーゼの一つのファミリー(ヒトでは約70種)であり、様々な機能(癌、免疫、発生、オートファジーなどの制御)に関与することが報告されている[*Trends Biochem Sci* 42:296 (2017)]。脊椎動物と節足動物を比べてみても、TRIMファミリーのドメイン構造の進化が異なっていることが判明している。特にヒトにおいてはSPRYドメインを有したTRIMタンパク質遺伝子が増加している。本研究申請における「問い」は、多彩に進化し、遺伝子数を増加させてきたTRIMファミリーが、ヒトの生体機能とどのように関連して進化してきたのかである。そのため、哺乳類で重要な細胞機能とTRIMファミリーの関係を俯瞰的かつ網羅的に解明することを試みる。

これまでに申請者を含め多くの研究者が個々のTRIMタンパク質の機能を報告してきた。自然免疫系の制御ネットワークの例においても、TRIMタンパク質が様々な段階で多様な制御をしていることが判明している。しかしながら、あるシステムにおいて、どのTRIMタンパク質がどの程度本当に重要であるかが不明のままである。したがって、ネットワークとしてTRIMファミリーの役割を解明することが重要である。

申請者を含め世界中の研究者が、癌化や免疫反応をはじめ多くの細胞機能におけるTRIMタンパク質の役割を報告してきた。特に申請者は、核内転写因子(AR、RAR、Myc、PPAR $\gamma$ など)や自然免疫制御に関与するシグナル伝達やDNA修復制御におけるTRIMタンパク質の機能を報告している[*Cancer Res* 68:3486 (2008); *J Cell Sci* 124:3492 (2011); *J Cell Sci* 125:1455 (2012); *Nature Commun* 6:7299 (2015)]。また最近では「オートファジー」の制御システムのひとつとしてもTRIMファミリーが注目されている。毎年ごとのTRIMファミリー関連論文の増加率は顕著であり、著名な総説雑誌にTRIMファミリーの総説が多く発表されており、注目されている研究分野であることがわかる。

## 2. 研究の目的

これまでは各TRIMタンパク質の機能が個別に報告されてきたが、本申請研究では全TRIMタンパク質のsiRNA等を使用することで、様々な細胞内シグナルを網羅的に解析し、TRIMファミリー全体のシステム構造を解明を進めた。また本実験結果により、TRIMファミリー遺伝子が各多細胞生物で固有の多様性を形成してきた理由が解明できるかもしれない。最終的には、TRIMファミリーによる翻訳後修飾(特にユビキチン化)の生理機能および疾患との関連の解明を目指すので、がん化、細胞分化・個体発生・神経変性疾患・自己免疫疾患などにおける総合的理解にも貢献する可能性が高い。

本研究では次に示す2つの方向性から、TRIMファミリーが関与するシグナルネットワーク、基質タンパク質、遺伝子発現制御に関する先進的な網羅的解析を行い、さらにそれらの知見を利用した疾患バイオマーカー検索と創薬研究への基盤を確立する。

(1) siRNAライブラリーを使用したTRIMファミリー遺伝子の網羅的ノックダウンによる機能スクリーニング: さまざまなシグナル伝達系の下流で活性化される遺伝子の転写活性化領域を含んだルシフェラーゼレポーター系を使用し、各TRIM遺伝子(約70遺伝子)をノックダウンさせた状態でのシグナル反応性の変動を調べる。

(2) TRIMファミリータンパク質の基質同定に関する画期的方法の樹立と利用(TUBE法): TUBE(Tandem Ubiquitin Binding Entity)はユビキチン化タンパク質を精製することに優れたポリユビキチン鎖に高親和性結合を示す人工タンパク質である[*EMBO Rep* 10:1250 (2009)]。本研究で用いる新規同定法は、FLAGタグ、ユビキチン高親和性人工タンパク質(TUBE)

TRIMタンパク質(E3酵素)の3つのドメイン、の3種のタンパク質(ペプチド)を融合した精製用プローブを用いることに特徴がある。「細胞内で」TRIMタンパク質がユビキチン化し

た直後の基質を「その場で」捕獲し、かつ「コビキチン化ペプチドのみ」を精製し網羅的に検出する点に斬新性がある（図3参照）。また、コビキチン化を受けた基質タンパク質のペプチド断片のみを「コビキチンレムナント抗体」で再精製するため、コビキチン化部位の同定も可能となる[*Nat Biotechnol* 28:868 (2010)]。TRIM タンパク質により細胞内で実際に起きる酵素反応を検出するため、偽陽性が少なく特異性が高い生理的な基質を定量的に同定することが可能である。

### 3. 研究の方法

(1) siRNA ライブラリーを使用した TRIM ファミリー遺伝子の網羅的ノックダウンによる機能スクリーニング:

核内受容体 (ARE、ERE、GRE、PPRE など)、GATA、p53、STAT、Wnt、NF- $\kappa$ B 及び Notch などの主要なシグナル系の検出に最適化されたルシフェラーゼレポーターアッセイ系は準備済である。AccuTarget<sup>®</sup>ライブラリーを使用し、各ヒトおよびマウス TRIM 遺伝子(約 70 遺伝子)をノックダウンさせた状態でルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、各シグナルへの影響を検討した。

(2) TRIM ファミリー結合タンパク質の同定と翻訳後修飾解析 (プロテオミクス解析):

TRIM タンパク質を発現させた細胞から FLAG タグ TRIM タンパク質を精製する。SDS-PAGE により、結合タンパク質を分離し、バンドとして確認できるものは質量分析器 (Hybrid IonTrap-Orbitrap LC-MS) を使用し同定した。また、TRIM タンパク質の結合タンパク質に起きている翻訳後修飾 (主にコビキチン化) もプロテオミクス解析により同定した。

(3) TUBE 法を用いた TRIM タンパク質のコビキチン化基質タンパク質の直接的同定:

本手法のパイロット実験として、E3 の 1 つである常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (AR-JP) 原因遺伝子 *Parkin* を用いたところ、過去に報告されている基質を含めミトコンドリア外膜 (MOM) に局在するタンパク質を多数同定できていた。本研究により、TRIM タンパク質のコビキチン化基質タンパク質の網羅的同定を進めた。

(4) TRIM タンパク質に関する細胞生物学的機能解析:

RNAi によってノックダウンもしくはゲノム編集 (CRISPR/Cas 使用予定: 既に譲受し、MTA 契約済み) によってノックアウトさせた細胞株を作製し、酵素-基質対応から推測される機能に対して、さまざまな検討を試みた: 細胞増殖アッセイ、細胞周期解析、転写活性化に関する解析 (ルシフェラーゼレポーターアッセイ)、がん化アッセイ、アポトーシスアッセイ、細胞運動能アッセイ (Wound healing assay や Transwell migration assay)、サイトカイン産生量の検出 (ELISA や FACS を使用) 等。

(5) ヒト疾患組織での TRIM タンパク質の発現プロファイル:

作製した (もしくは購入した) 抗体を使用し、ヒトの各種疾患組織を使用した免疫組織化学的解析もしくはウエスタン解析 (新鮮標本がある場合) を行い、臓器別、悪性度別、及び進行度別で発現レベルを調査した。この実験により、疾患特異的バイオマーカーとしての価値を有するタンパク質であるかを判定した。TRIM29 に関しては特許申請済み (特願 2012-277980 及び PCT/JP2013/083915) で、病理学教室及び臨床科と既に共同研究を進めた。

< 人権の保護及び法令等の遵守への対応 >

1. 科学研究費補助金の使用については、「研究者使用ルール (補助条件及び交付条件)」を遵守し行う。また、これまで通り毎年、学内の研究費使用不正・研究不正の防止に関する e-Learning を受講し、かつ日本学術振興会の研究倫理 e ラーニングコース「eL CoRE」を受講した。
2. 遺伝子組み換え体の取り扱いについては、「遺伝子組み換え等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」ならびに「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規則」を遵守し、施行した (承認番号: 2015-001)。また、遺伝子組み換え体についての実験は、既に大学内に申請及び許可済みの P1 (P1A) -P2 実験室にて行った。
3. 動物実験に際しては「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」を遵守した (承認番号: 13-0040)。また、マウスなどの生物資源の譲渡及び譲受に関しては、関係機関と生物遺伝資源提供同意書 (MTA) の契約を交わした。
4. ヒト検体等を使用する実験を遂行する場合は、インフォームド・コンセントを十分に考慮した上で、さらに「個人情報保護法」「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」等を遵守し、事前に患者様からの承諾をいただくとともに同意書を交わし、さらには大学もしくは本医学研究院の「医の倫理委員会」の承認を得た。

### 4. 研究成果

(1) 新規のコビキチンリガーゼ特異的基質の同定法の確立

TRIM ファミリーコビキチンリガーゼ (E3) の基質タンパク質の新規同定法の樹立とそのス

クリーニングを行った。TUBE ( Tandem Ubiquitin Binding Entity ) はユビキチン化タンパク質を精製することに優れたポリユビキチン鎖に高親和性結合を示す人工タンパク質である。本研究では、 FLAG タグ、 ユビキチン高親和性人工タンパク質 ( TUBE )、 解析したい任意の E3 酵素の 3 種のタンパク質 ( ペプチド ) を融合した精製用プローブを用いた。この手法により「細胞内で」E3 がユビキチン化した直後の基質を「その場で」捕獲し、かつ「ユビキチン化ペプチドのみ」を精製し網羅的に検出することが可能となる。また、E3 のすぐそばでユビキチン化を受けた基質タンパク質のペプチド断片のみを「ユビキチンレムナント抗体」で再精製するため、ユビキチン化部位の同定も可能となる。実際に Parkin といくつかの TRIM ファミリーユビキチンリガーゼに関して、この新規方法を行ったところ、多くの基質タンパク質候補が同定され、この基質候補タンパク質に関して生化学的機能解析を行った。

#### ( 2 ) TRIM28 の基質同定と機能解析

上記のユビキチン化基質同定法を使用することで、TRIM28 の基質候補を網羅的に同定した。その中で、細胞周期調節因子であるサイクリン A と転写制御因子である TFIIB に注目し、TRIM28 との関連性に関する機能解析を行った。TRIM28 のノックダウンにより、サイクリン A および TFIIB の発現量の増加が認められ、TRIM28 はサイクリン A および TFIIB のユビキチン化を介して、それらの発現量を調節していることが判明した。また、細胞周期に依存して、TRIM28 に結合しているサイクリン A の量が変化し、またサイクリン A の安定性も変化することが明らかとなった。一方、TFIIB に関しては細胞周期による影響はなく、TRIM28 によってユビキチン化され分解されることが判明した。さらに細胞周期における TRIM28 の役割を明らかにするために、TRIM28 をノックダウンさせた細胞における細胞周期の変化を調べたところ、TRIM28 ノックダウンにより、S 期に進行する細胞数の増加が認められた。したがって、TRIM28 ノックダウンによりサイクリン A の発現量が増加し、その結果 S 期への進行が増えたことが示唆された[*Commun. Biol.* 3:529 (2020)]。

#### ( 3 ) TRIM29 の病理学的・生化学的機能解析

皮膚・頭頸部扁平上皮がんにおいて、DNA のメチル化制御によって TRIM29 の発現が抑制されていることが判明した。また、TRIM29 の結合タンパク質に関するプロテオミクス解析を遂行したところ、細胞骨格を制御するケラチン関連タンパク質が同定された。実際に TRIM29 をノックダウンさせた皮膚がん細胞株を作製し、機能解析を行ったところ、細胞浸潤や細胞骨格の変化が観察された。以上より臨床医学の領域において、TRIM29 が皮膚がんの病理学的検査および創薬のシーズとして役立つ可能性が示された[*Cancer Res.* 78:6795 (2018)]。

#### ( 4 ) まとめ

ヒトゲノムの解明により、TRIM タンパク質が約 70 遺伝子存在していることが判明し、各タンパク質の機能の解明が進んでいる。しかしながら、各論的研究の発展はあるが、網羅的な機能解析には至っていない。本研究成果により、TRIM タンパク質をはじめ多くのユビキチンリガーゼの真の基質の同定が進むことが期待できる。これまでも多くの疾患と TRIM タンパク質との関係が明らかにされているが、今回の研究成果よりさらに機能解析が発展することが想定される。特に酵素活性及び基質との関係を生化学的に明らかにすることで、各種疾患 (がんや免疫疾患等) に対する分子標的治療のシーズとして貢献する知見の蓄積が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8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 Takahashi Hidehisa, Ranjan Amol, Hatakeyama Shigetsugu, et.al.	4. 巻 11
2. 論文標題 The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1063
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14849-1	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 Sugawara Eri, Kato Masaru, Kudo Yuki, Lee Wenshi, Hisada Ryo, Fujieda Yuichiro, Oku Kenji, Bohgaki Toshiyuki, Amengual Olga, Yasuda Shinsuke, Onodera Tomohiro, Hatakeyama Shigetsugu, Atsumi Tatsuya	4. 巻 16
2. 論文標題 Autophagy promotes citrullination of VIM (vimentin) and its interaction with major histocompatibility complex class II in synovial fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 946-955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2019.1664144	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 -
1. 著者名 Yanagi Teruki, Watanabe Masashi, Hata Hiroo, Kitamura Shinya, Imafuku Keisuke, Yanagi Hiroko, Homma Akihiro, Wang Lei, Takahashi Hidehisa, Shimizu Hiroshi, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 78
2. 論文標題 Loss of TRIM29 Alters Keratin Distribution to Promote Cell Invasion in Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6795 ~ 6806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-1495	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 -
1. 著者名 2. Matsumoto, J., Takada, S., Kinugawa, S., Furihata, T., Nambu, H., Kakutani, N., Tsuda, M., Fukushima, A., Yokota, T., Tanaka, S., Takahashi, H., Watanabe, M., Hatakeyama, S., et.al.	4. 巻 138
2. 論文標題 Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Limited Exercise Capacity in Mice With Heart Failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2064 ~ 2066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035212	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 -

1. 著者名 Yaguchi Hiroaki, Yabe Ichiro, Takahashi Hidehisa, Watanabe Masashi, Nomura Taichi, Kano Takahiro, Watanabe Masahiko, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 265
2. 論文標題 Anti-Sez612 antibody detected in a patient with immune-mediated cerebellar ataxia inhibits complex formation of GluR1 and Sez612	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 962 ~ 965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-018-8785-z	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 -

1. 著者名 Sang Youzhou, Li Yanxin, Song Lina, Alvarez Angel A., Zhang Weiwei, Lv Deguan, Tang Jianming, Liu Feng, Chang Zhijie, Hatakeyama Shigetsugu, Hu Bo, Cheng Shi-Yuan, Feng Haizhong	4. 巻 78
2. 論文標題 TRIM59 Promotes Gliomagenesis by Inhibiting TC45 Dephosphorylation of STAT3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1792 ~ 1804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-2774	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 該当する

1. 著者名 Watanabe Masashi, Saeki Yasushi, Takahashi Hidehisa, Ohtake Fumiaki, Yoshida Yukiko, Kasuga Yusuke, Kondo Takeshi, Yaguchi Hiroaki, Suzuki Masanobu, Ishida Hiroki, Tanaka Keiji, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 3
2. 論文標題 A substrate-trapping strategy to find E3 ubiquitin ligase substrates identifies Parkin and TRIM28 targets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01328-y	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 -

1. 著者名 Sugisawa Erika, Takayama Yasunori, Takemura Naoki, Kondo Takeshi, Hatakeyama Shigetsugu, Kumagai Yutaro, Sunagawa Masataka, Tominaga Makoto, Maruyama Kenta	4. 巻 182
2. 論文標題 RNA Sensing by Gut Piezo1 Is Essential for Systemic Serotonin Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 609 ~ 624.e21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.06.022	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 -

1. 著者名 LIANG SHANSHAN, TAKAHASHI HIDEHISA, HIROSE TETSURO, KURAMITSU YASUHIRO, HATAKEYAMA SHIGETSUGU, YOSHIYAMA HIRONORI, WANG RUOYU, HAMADA JUN-ICHI, IIZASA HISASHI	4. 巻 17
2. 論文標題 NONO Is a Negative Regulator of SOX2 Promoter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 359 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20195	査読の有無 無
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 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masashi watanabe, Shigetsugu Hatakeyama
2. 発表標題 Comprehensive identification of E3 ubiquitin ligase substrates by fusion of TUBE and ligase trapping methods
3. 学会等名 The 2nd GI-CoRE GSQ, GSB & IGM Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山 鎮次
2. 発表標題 TRIMファミリーの機能解析
3. 学会等名 第2回ユビキチン研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 畠山 鎮次	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 304
3. 書名 人体の構造と機能[2] 生化学 第14版	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------