

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06213

研究課題名(和文) Elongin BC型ユビキチンリガーゼによる細胞分裂、細胞分化制御

研究課題名(英文) The regulation of cell division and cell differentiation by the Elongin BC-type ubiquitin ligase

研究代表者

奥村 文彦 (Okumura, Fumihiko)

福岡女子大学・国際文理学部・准教授

研究者番号：00507212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： Elongin BC型ユビキチン結合酵素による細胞分裂、細胞分化の制御メカニズムの解明を目的とした。

ZSWIM8は機能未知のユビキチン結合酵素であったが、ZSWIM8結合タンパク質を探索した結果、Cdoを同定した。Cdoは筋分化に必要なタンパク質であることが知られている。本研究結果より、ZSWIM8は筋分化に伴って発現が誘導され、Cdoと結合し、Cdoを阻害することで筋分化を抑制する新規タンパク質であることが示唆された。KLHDC1はセレノシステイン取り込みに失敗した不完全セレノプロテインSを特異的に認識し、ポリユビキチン修飾することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cdoは筋分化に必要なことが既に知られているが、その活性を制御するメカニズムは不明であった。本研究結果は、ZSWIM8がCdoの活性を抑制することを示唆している。ZSWIM8は筋分化誘導に伴って発現が亢進するため、ZSWIM8による筋分化の抑制はネガティブフィードバックループを示唆しており、過剰な筋形成が起きないようにしている可能性がある。

KLHDC1ノックダウンはセレノプロテインSの発現量を増加させ、小胞体ストレスを軽減した。したがって、不完全セレノプロテインSも小胞体ストレスを減弱させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism of cell division and cell differentiation by Elongin BC-type ubiquitin ligase. Although ZSWIM8 was an ubiquitin ligase with unknown function, a search for ZSWIM8 binding proteins identified Cdo. Cdo is known to induce myogenesis. As a result, it was suggested that ZSWIM8 is induced during myogenesis, binds to Cdo, and inhibits myogenesis by inhibiting Cdo. Therefore, ZSWIM8 should be a novel protein that suppresses myogenesis. KLHDC1 specifically recognizes truncated selenoprotein S that failed to incorporate selenocysteine, and mediates its polyubiquitination.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：筋分化 ユビキチン タンパク質分解 ZSWIM8 Cdo

1. 研究開始当初の背景

(1) Cdo は筋芽細胞から筋管細胞への分化に必要な一回膜貫通タンパク質である。Cdo は様々な転写因子を活性化することで筋分化を誘導する(1)。しかしながら、Cdo 活性を抑制する分子メカニズムは不明であった。私たちは機能未知ユビキチンリガーゼ ZSWIM8 が Cdo と結合することを見出した。

(2) 私たちは機能未知のタンパク質 KLHDC1 結合タンパク質として VCP-interacting membrane protein (VIMP、セレノプロテイン S) を同定した。セレノプロテイン S はセレノステインを含有するタンパク質であり VCP/Ufd1/Npl4 と複合体を形成し、小胞体関連タンパク質分解 (ERAD) や小胞体ストレスに関与している(2)。

2. 研究の目的

(1) ZSWIM8 が Cdo をポリユビキチン修飾し、Cdo を分解誘導するかを解析する。また、筋分化における ZSWIM8 の役割を明らかにする。

(2) KLHDC1 が VIMP をポリユビキチン修飾し、VIMP を分解誘導するかを解析する。また、VIMP の品質管理に関与している場合、その生理的な影響を解明する。

3. 研究の方法

(1) の方法

ZSWIM8 ノックダウン C2C12 細胞株を作製し、筋分化誘導する。ZSWIM8 ノックダウンにより筋分化が影響を受けるかを筋分化マーカータンパク質 Myosin などの発現量を指標に解析する。

筋管細胞が形成されているかを細胞免疫染色により確認する。

ZSWIM8 ノックダウンにより Cdo が安定化されるかを Western blotting により解析する。タンパク質翻訳阻害剤 (シクロヘキシミド) 添加によりタンパク質合成が止まるので、タンパク質の分解速度をとらえることができる。

Cdo 結合タンパク質として知られている Bnip2 や JLP が、ZSWIM8 と複合体を形成しているかを免疫沈降法により解析する。

ZSWIM8 が Cdo などをポリユビキチン修飾するか、Western blotting により解析する。

ZSWIM8 と Cdo が共局在するか、細胞免疫染色により解析する。

(2) の方法

VIMP (全長あるいはセレノステイン欠損型) を HEK293T 細胞に発現させ KLHDC1 との結合を IP-Western blotting により解析する。

KLHDC1 の発現が VIMP (全長あるいはセレノステイン欠損型) の安定性に影響を及ぼすかをシクロヘキシミドを用いて解析する。

KLHDC1 が VIMP (全長あるいはセレノステイン欠損型) をポリユビキチン修飾するか、Western blotting により解析する。

KLHDC1 と VIMP (全長あるいはセレノステイン欠損型) が共局在するか、細胞免疫染色により解析する。

KLHDC1 ノックダウン細胞株を作製する。ツニカマイシン処理による小胞体ストレスを与えたとき、KLHDC1 が細胞死に影響を及ぼすかをアネキシン-V 染色と FACS により解析する

4. 研究成果

(1) Cdo は筋分化に必要なことが既に知られているが、その安定性を制御するメカニズムは不明であった。本申請課題では Cdo と結合するユビキチンリガーゼ ZSWIM8 を解析し、これまで知られていなかった筋分化制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。これまでの解析から ZSWIM8 は Cdo と結合するが、Cdo の分解を誘導しなかった。また、ZSWIM8 は筋分化を抑制することを明らかにした。さらに、ZSWIM8 は Cdo の活性に影響を及ぼすことが示唆された。

興味深いことに、ZSWIM8 は筋分化誘導に伴って発現が亢進することを見出した。したがって、ZSWIM8 による筋分化の抑制はネガティブフィードバックループを示唆しており、筋分化が厳密に制御されていることが示唆される。筋分化に伴って発現誘導されるユビキチ

ンリガーゼはあまり例がなく、今後、ZSWIM8 が認識し、分解誘導する基質タンパク質を同定することは重要である。(3)

(2) KLHDC1 はセレノシステイン取り込みに失敗した不完全セレノプロテイン S を特異的に認識し、ポリユビキチン修飾することを見出した。KLHDC1 は不完全セレノプロテイン S を不安定化することで、その品質管理を行っていると考えられる。興味深いことに、KLHDC1 ノックダウンはセレノプロテイン S の発現量を増加させ、小胞体ストレスを軽減した。したがって、不完全セレノプロテイン S も小胞体ストレスを減弱させることが示唆された。(4)

<引用文献>

1. J. S. Kang, G. U. Bae, M. J. Yi, Y. J. Yang, J. E. Oh, G. Takaesu, Y. T. Zhou, B. C. Low, R. S. Krauss. A Cdo-Bnip-2-Cdc42 signaling pathway regulates p38alpha/beta MAPK activity and myogenic differentiation. *J Cell Biol.* 2008;182(3):497-507.
2. Y. Ye, Y. Shibata, C. Yun, D. Ron, T. A. Rapoport. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature.* 2004;429(6994):841-847.
3. F. Okumura, N. Oki, Y. Fujiki, R. Ikuta, K. Osaki, S. Hamada, K. Nakatsukasa, N. Hisamoto, T. Hara, T. Kamura. ZSWIM8 is a myogenic protein that partly prevents C2C12 differentiation. *Scientific Reports.* 2021;11(1):20880.
4. F. Okumura, Y. Fujiki, N. Oki, K. Osaki, A. Nishikimi, Y. Fukui, K. Nakatsukasa, T. Kamura. Cul5-type Ubiquitin Ligase KLHDC1 Contributes to the Elimination of Truncated SELENOS Produced by Failed UGA/Sec Decoding. *iScience.* 2020;23(3):100970.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 5件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 奥村 文彦、嘉村 巧 | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 ユビキチンリガーゼKLHDC1によるセレノプロテインSの品質管理 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 月刊「細胞」2022年11月号 翻訳制御の最前線 | 6. 最初と最後の頁 - |
| 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 - |
| 1. 著者名 Oki Nodoka, Yamada Shino, Tanaka Tamaki, Fukui Hiromi, Hatakeyama Shigetsugu, Okumura Fumihiko | 4. 巻 625 |
| 2. 論文標題 Curcumin partly prevents ISG15 activation via ubiquitin-activating enzyme E1-like protein and decreases ISGylation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 94 ~ 101 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.08.003 | 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 Nakatsukasa Kunio, Fujisawa Munetaka, Yang Xiaotan, Kawarasaki Tomoyuki, Okumura Fumihiko, Kamura Takumi | 4. 巻 626 |
| 2. 論文標題 Triacylglycerol lipase Tgl4 is a stable protein and its dephosphorylation is regulated in a cell cycle-dependent manner in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 85 ~ 91 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.08.022 | 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 Okumura Fumihiko, Oki Nodoka, Fujiki Yuha, Ikuta Rio, Osaki Kana, Hamada Shun, Nakatsukasa Kunio, Hisamoto Naoki, Hara Taichi, Kamura Takumi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 ZSWIM8 is a myogenic protein that partly prevents C2C12 differentiation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 N/A |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00306-6 | 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 奥村 文彦・嘉村 巧 | 4. 巻 53(3) |
| 2. 論文標題 KLHDC1による不良SELENOSの除去 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 月刊「細胞」 | 6. 最初と最後の頁 28-31 |
| 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 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Okumura Fumihiko, Fujiki Yuha, Oki Nodoka, Osaki Kana, Nishikimi Akihiko, Fukui Yoshinori, Nakatsukasa Kunio, Kamura Takumi | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Cul5-type Ubiquitin Ligase KLHDC1 Contributes to the Elimination of Truncated SELENOS Produced by Failed UGA/Sec Decoding | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 100970 ~ 100970 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100970 | 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 奥村 文彦、嘉村 巧 | 4. 巻 91 |
| 2. 論文標題 1回膜貫通タンパク質EphB2のコピキチン-プロテアソーム系による分解 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 生化学 | 6. 最初と最後の頁 681 ~ 685 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910681 | 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 奥村 文彦 | 4. 巻 69(5) |
| 2. 論文標題 ISG15 修飾 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 生体の科学 | 6. 最初と最後の頁 462 463 |
| 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 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Tognon, C. E., Rafn, B., Cetinbas, N. M., Kamura, T., Trigo, G., Rotblat, B., Okumura, F., Matsumoto, M., Chow, C., Davare, M., Pollak, M., Mayor, T., and Sorensen, P. H. | 4. 巻 293 |
| 2. 論文標題 Insulin-like growth factor 1 receptor stabilizes the ETV6-NTRK3 chimeric oncoprotein by blocking its KPC1/Rnf123-mediated proteasomal degradation | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Biol Chem | 6. 最初と最後の頁 12502-12515 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA117.000321. | 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 Nakatsukasa, K., Sone, M., Alemayehu, D. H., Okumura, F., and Kamura, T. | 4. 巻 592 |
| 2. 論文標題 The HECT-type ubiquitin ligase Tom1 contributes to the turnover of Spo12, a component of the FEAR network, in G2/M phase | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 FEBS letters | 6. 最初と最後の頁 1716-1724 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468. | 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18件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥村 文彦、大木 のどか、山田 詩乃、田中 環、福井 裕美、畠山 鎮次 |
| 2. 発表標題 クルクミンはISG15活性化酵素を抑制しISG15修飾を減弱する |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大木 のどか、山田 詩乃、田中 環、福井 裕美、畠山 鎮次、奥村 文彦 |
| 2. 発表標題 香辛料はISG15活性化酵素を阻害してISG15修飾を抑制する |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大木 のどか、山田 詩乃、田中 環、福井 裕美、畠山 鎮次、奥村 文彦 |
| 2. 発表標題 香辛料によるISG15修飾の抑制 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥村 文彦、大木 のどか、藤木 結葉、生田 李緒、濱田 俊、中務 邦雄、久本 直毅、原 太一、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 筋分化で誘導されるタンパク質ZSWIM8はC2C12筋芽細胞の分化を抑制する |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥村 文彦、大木 のどか、藤木 結葉、生田 李緒、濱田 俊、中務 邦雄、久本 直毅、原 太一、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 Cul2結合タンパク質ZSWIM8はC2C12筋芽細胞の分化を抑制する |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥村 文彦、大木 のどか、藤木 結葉、生田 李緒、濱田 俊、中務 邦雄、久本 直毅、原 太一、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 Cul2結合タンパク質ZSWIM8はC2C12筋芽細胞分化に伴い発現誘導される |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 奥村文彦 |
| 2. 発表標題 ユビキチンリガーゼKLHDC1は不完全なSELENOSを除去する |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 奥村 文彦, 藤木 結葉, 大木 のどか, 尾崎 加奈, 錦見 昭彦, 福井 宣規, 中務 邦雄, 嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 SELENOSはセレノシステイン取り込みにより安定化する |
| 3. 学会等名 生命金属に関する合同年会（ConMetal 2020）（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 奥村 文彦, 藤木 結葉, 大木 のどか, 尾崎 加奈, 錦見 昭彦, 福井 宣規, 中務 邦雄, 嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 ユビキチンリガーゼKLHDC1によるSELENOSの品質管理と小胞体ストレスの蓄積 |
| 3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（MBSJ2020）（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 奥村 文彦, 藤木 結葉, 大木 のどか, 尾崎 加奈, 錦見 昭彦, 福井 宣規, 中務 邦雄, 嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 必須微量元素セレンによる小胞体ストレス応答タンパク質SELENOSの安定化 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 奥村 文彦、藤木 結葉、大木 のどか、尾崎 加奈、中務 邦雄、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 低酸素応答因子HIF-2 α はVHL病抑制因子B-Mybを安定化する |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥村 文彦、奥村 晶子、中務 邦雄、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 HIF-2 α によるフォン・ヒッペル・リンドウ病抑制因子B-Mybの安定化 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 渡邊 祥太郎、小原 圭介、奥村 文彦、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 出芽酵母のストレス応答因子 Wta1の制御機構の解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 酒井 洋二、小原 圭介、奥村 文彦、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 飢餓状態におけるRrn3の分解制御機構の解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉川 拓、小原 圭介、奥村 文彦、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 アダプタータンパク質 Mmr1の選択的分解によるミトコンドリア の局在制御機構 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 森田 敏基、小原 圭介、奥村 文彦、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 出芽酵母転写抑制因子Mt t24の分解制御機構 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥村 文彦、奥村(城尾) 晶子、小原 圭介、Alexander Petersen、錦見 昭彦、福井 宣規、中務 邦雄、嘉村 巧 |
| 2. 発表標題 ユビキチンリガーゼSPSB4はEphB2を介した細胞間反発運動を抑制する |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥村 文彦 |
| 2. 発表標題 セレン(Se)によるユビキチン化抑制と小胞体ストレス応答効率化メカニズムの解明 |
| 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 |
|---------------|---|-------------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 原 太一 (Hara Taichi) (00392374) | 早稲田大学・人間科学学術院・教授 (32689) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|