

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02674

研究課題名（和文）TRIM型ユビキチンリガーゼファミリーによるシグナル伝達制御の解析

研究課題名（英文）Regulation of signal transduction by TRIM family ubiquitin ligases

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）：近年、免疫反応やがん化に関する細胞内シグナル伝達におけるTRIMファミリーユビキチンリガーゼ群の重要性が明らかとなっている。特に細胞増殖のみならず、細胞分化過程を制御するシグナル伝達系やオートファジー制御に、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。

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、本申請研究では全TRIMタンパク質のsiRNAやプロテオミクスの解析等を使用することで、さまざま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の解明を進めた。今後、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という点で、感染症、自己免疫疾患、がん化、細胞分化、個体発生、神経変性疾患など、医学における総合的理解に貢献する可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：Recently, the importance of TRIM family ubiquitin ligases in intracellular signal transduction related to immune responses and cancerization has been clarified. In particular, TRIM family ubiquitin ligases have been shown to be involved not only in cell proliferation but also in signal transduction systems that control cell differentiation processes and autophagy regulation, and have recently attracted attention in many fields of intracellular signal transduction systems. In this application, we comprehensively analyzed the intracellular network system centered on TRIM family ubiquitin ligases using comprehensive knockdown screening and proteomics methods specific to ubiquitination.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン TRIMタンパク質 シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 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。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。

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。自然免疫系のシグナルの例においても、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、がん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いる。特に申請者は、核内転写因子(AR、RAR、Myc、PPAR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。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。

### 2. 研究の目的

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。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(がん、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。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(表1参照:生物間でのTRIMファミリーの違い)。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、細胞内シグナル伝達などの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た。

### 3. 研究の方法

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を行った。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ことで、各シグナルに関与するTRIMタンパク質を網羅的に同定する。また、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を進めた。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「ユ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。また、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。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。

### 4. 研究成果

TRIMタンパク質群に関して、その結合タンパク質および基質タンパク質候補を同定し、その機

能的解析を進めた。特にがん化制御に関連する TRIM27 に関して解析を進めた。免疫組織化学染色法を用いた鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫（sinonasal mucosal melanoma：SNMM）における TRIM27 の発現と臨床経過の関連解析では、TRIM27 の発現は T4 と stage において TRIM27 の発現が有意に高かった。また、TRIM27 高発現群では、全生存期間および無病生存期間が有意に低下しており、また治療後に遠隔転移を来す割合が有意に高かった。全生存期間の単変量解析において、TRIM27 と T 分類が有意な予後不良因子であった。無病生存期間の単変量解析では、TRIM27、T 分類、頸部リンパ節転移が有意な予後不良因子であった。また、質量分析器を使用した生化学分析で TRIM27 の結合タンパク質を同定し、その機能解析を進めた。その結果、TRIM27 は細胞形態変化、発生制御、がん化の制御などに関与するシグナル伝達系に関与することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 3件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Tokuchi Keiko, Kitamura Shinya, Maeda Takuya, Watanabe Masashi, Hatakeyama Shigetsugu, Kano Satoshi, Tanaka Shinya, Ujiie Hideyuki, Yanagi Teruki  | 4. 巻<br>104                   |
| 2. 論文標題<br>Loss of FAM83H promotes cell migration and invasion in cutaneous squamous cell carcinoma via impaired keratin distribution  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Dermatological Science  | 6. 最初と最後の頁<br>112 ~ 121       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jdermsci.2021.09.007  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Nakazono Akira, Nakamaru Yuji, Ramezanpour Mahnaz, Kondo Takeshi, Watanabe Masashi, Hatakeyama Shigetsugu, Kimura Shogo, Honma Aya, Wormald P. J., Vreugde Sarah, Suzuki Masanobu, Homma Akihiro | 4. 巻<br>11                    |
| 2. 論文標題<br>Fluticasone Propionate Suppresses Poly(I:C)-Induced ACE2 in Primary Human Nasal Epithelial Cells  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology   | 6. 最初と最後の頁<br>655666          |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fcimb.2021.655666   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Suzuki Masanobu, Suzuki Takayoshi, Watanabe Masashi, Hatakeyama Shigetsugu, Kimura Shogo, Nakazono Akira, Honma Aya, Nakamaru Yuji, Vreugde Sarah, Homma Akihiro                                 | 4. 巻<br>70                    |
| 2. 論文標題<br>Role of intracellular zinc in molecular and cellular function in allergic inflammatory diseases   | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Allergology International  | 6. 最初と最後の頁<br>190 ~ 200       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.alit.2020.09.007  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Inoue Ayano, Watanabe Masashi, Kondo Takeshi, Hirano Satoshi, Hatakeyama Shigetsugu  | 4. 巻<br>1869                  |
| 2. 論文標題<br>TRIM22 negatively regulates MHC-II expression   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research  | 6. 最初と最後の頁<br>119318 ~ 119318 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbamcr.2022.119318  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Oki Nodoka, Yamada Shino, Tanaka Tamaki, Fukui Hiromi, Hatakeyama Shigetsugu, Okumura Fumihiko                      | 4. 巻<br>625            |
| 2. 論文標題<br>Curcumin partly prevents ISG15 activation via ubiquitin-activating enzyme E1-like protein and decreases ISGylation | 5. 発行年<br>2022年        |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>94 ~ 101 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2022.08.003  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kimura S, Suzuki M, Nakamaru Y, Kano S, Watanabe M, Honma A, Nakazono A, Tsushima N, Hatakeyama S, Homma A | 4. 巻<br>61            |
| 2. 論文標題<br>TRIM27 expression is associated with poor prognosis in sinonasal mucosal melanoma                         | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>Rhinology Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>263-271 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4193/Rhin22.405   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kasuga Yusuke, Ouda Ryota, Watanabe Masashi, Sun Xin, Kimura Miki, Hatakeyama Shigetsugu, Kobayashi Koichi S.               | 4. 巻<br>120               |
| 2. 論文標題<br>FBX011 constitutes a major negative regulator of MHC class II through ubiquitin-dependent proteasomal degradation of CIITA | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>e2218955120 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1073/pnas.2218955120   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Abe Megumi, Yaguchi Hiroaki, Kudo Akihiko, et.al. | 4. 巻<br>94              |
| 2. 論文標題<br>Sez612 autoimmunity in a large cohort study      | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry   | 6. 最初と最後の頁<br>667 ~ 668 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1136/jnnp-2022-330194        | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>畠山鎮次                                    |
| 2. 発表標題<br>TRIMタンパク質の機能と多様な疾患への関与                  |
| 3. 学会等名<br>ATAGO Respiratory Expert Seminar (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2022年                                    |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>渡部昌, 高橋正樹, 畠山鎮次        |
| 2. 発表標題<br>がん遺伝子産物PPM1Dのタンパク質分解機構 |
| 3. 学会等名<br>日本分子生物学会年会             |
| 4. 発表年<br>2023年                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>工藤 彰彦, 矢口 裕章, 渡部 昌, 上床 尚, 白井 慎一, 岩田 育子, 松島 理明, 高橋 秀尚, 畠山 鎮次, 矢部 一郎 |
| 2. 発表標題<br>自己免疫性小脳失調症に対する免疫沈降法と質量分析法を用いた網羅的自己抗体測定方法の開発                        |
| 3. 学会等名<br>日本神経免疫学会   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|