

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06119

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼUBR4の組織特異的生理機能と分子機構

研究課題名(英文) Studies on the tissue-specific role of the ubiquitin ligase UBR4 and its basic mechanisms

研究代表者

田崎 隆史 (TASAKI, Takafumi)

金沢医科大学・総合医学研究所・准教授

研究者番号：70629815

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)：本研究では、ユビキチンリガーゼUBR4の成体における生理学的役割、特に病態モデルでの役割を明らかにすることを目的とした。腸上皮特異的UBR4遺伝子欠損マウス(UBR4(-))は、野生型マウス(UBR4(+))と変わらない性状を示したが、AOM/DSSによる大腸炎関連大腸がんモデルでは、UBR4(-)群において、大腸炎が増悪する傾向がみられた。また、長期飼育後に大腸がん発症をみたところ、UBR4(+ )群に比べてUBR4(-)群では、発生率及び腫瘍数が増加していた。以上の事からUBR4は大腸炎と大腸がん発生において抑制的な役割を持っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AOM/DSSによる大腸炎関連大腸がん発症は、ヒトの大腸がん発症に近いモデルと考えられている。本研究によって、腸上皮特異的UBR4欠損マウスが新たな大腸炎関連大腸がんモデルマウスとなる可能性を示した。今後、このモデルマウスを用いて大腸炎及び大腸がん発症メカニズムにおけるUBR4の役割を解明することにより、UBR4は新規薬剤ターゲットとなりえる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the physiological role of the ubiquitin ligase UBR4 in the adult body, particularly in pathological models. Mice lacking the intestinal epithelial-specific UBR4 gene (UBR4(-)) showed properties similar to wild-type mice (UBR4(+)), but in the colitis-associated colorectal cancer model by AOM/DSS, there was a trend toward exacerbated colitis in the UBR4(-) group. In addition, the incidence of colorectal cancer after long-term rearing showed an increased incidence and number of tumors in the UBR4(-) group compared to the UBR4(+) group. These findings suggest that UBR4 has an inhibitory role in colitis and colorectal cancer development.

研究分野：ユビキチン・プロテアソームタンパク質分解システム

キーワード：大腸炎関連大腸がんモデル ユビキチンリガーゼ UBR4

### 1. 研究開始当初の背景

ユビキチンリガーゼ UBR4 はタンパク質のユビキチン化を担う翻訳後修飾酵素で、マウス発生、腎臓足細胞のポドシンやミトコンドリア PINK1 の安定性、オートファジー経路等、多種多様な生理現象に関わっていることが示唆されており、細胞機能において重要な分子であることが考えられている。一方、病態との関連性については、ヒトパピローマウイルスによる発がんとの関連性が報告されているが、その他の知見はほとんど報告されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、成体における生理学的役割、特に組織特異的な病態モデルでの UBR4 の役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) UBR4 遺伝子のコンディショナルノックアウト (CKO) マウスと各種 Cre driver マウスを用いて組織特異的 UBR4 遺伝子不活化 (UBR4KO) マウスを作製する。
- (2) 組織特異的 UBR4KO マウスを用いて病態モデルを作製し、その表現型を観察、解析する。
- (3) 組織特異的 UBR4KO マウスより RNA を抽出し、RNA-seq 法により遺伝子発現変化を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 腎臓足細胞特異的 Podocin-Cre、腸管上皮細胞特異的 Villin-Cre、肝細胞特異的 Albumin-Cre driver マウスと UBR4CKO マウスを交配し、腎臓足細胞、腸管上皮細胞、肝細胞特異的 UBR4KO マウスを作製した。腎臓足細胞特異的 UBR4KO マウスは成体マウスを得ることが出来なかった。また、肝細胞特異的 UBR4KO マウスは成体を得ることができたが、遺伝子不活化が不完全であった。腸上皮特異的 UBR4KO マウスでは、タモキシフェン投与により腸上皮細胞で Cre 酵素を誘導し UBR4 遺伝子を不活化されることをタンパク質発現量により確認した(図 1)。腸上皮特異的 UBR4KO マウスは体重変動などの異常はみられず、大腸上皮細胞の形態も野生型マウスと変わらなかった。したがって、通常の飼育環境下では *Ubr4* 遺伝子は腸上皮細胞において必要不可欠ではないことが示唆された。

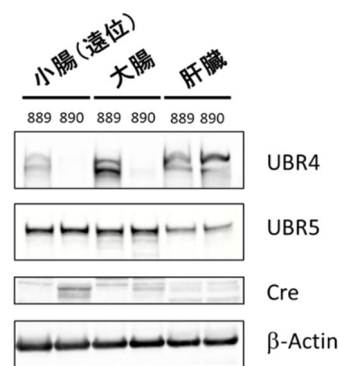


図 1 タモキシフェン投与による腸上皮特異的な UBR4 タンパク質欠損。889 は対照群、890 は UBR4KO 群。

(2) アゾキシメタン (AOM) および 1.5% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与により、大腸炎関連大腸がんモデルマウスを作製した。腸上皮特異的に UBR4 遺伝子を不活化したマウス群 (UBR4KO 群) は対照群 (野生型) と比較して、体重減少を伴う大腸炎が悪化する傾向がみられた (図 2)。一方、高濃度の DSS (2.5%) では、野生型、UBR4 欠損マウス共に大腸炎が劇症化し、その差がみられなかった。さらに低濃度の DSS 1.0% を用いたところ、対照群では体重減少 (大腸炎の指標の一つ) がみられなかったのに対し、UBR4KO 群では有意に体重が減少した。AOM/DSS 投与後、長期飼育することによって大腸がんを発生させたところ、UBR4KO 群では対照群と比較して、大腸がんの発生率および個数が増加していた。以上のことから、腸管上皮細胞の UBR4 が大腸炎と大腸がん発生において抑制的な役割を持っていることが示唆された。

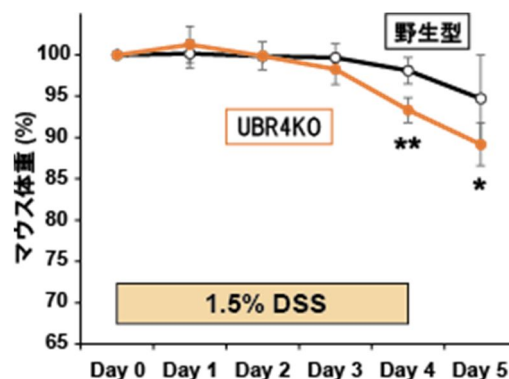


図 2 AOM/DSS 投与によるマウス体重の変化。タモキシフェンおよび AOM 投与後、1.5% DSS を含む蒸留水を 4 日間与えた。

(3) 野生型群 (WT)、腸上皮特異的 UBR4KO 群 (KO)、WT 群に DSS を 2 日間投与群 (WT-DSS)、KO 群に DSS を 2 日間投与群 (KO-DSS) それぞれから RNA を調整し、RNA-seq 法による、Differential Expression 解析を行った (図 3)。少なくとも 29 個の遺伝子が KO-DSS

群で特異的に変化したことが示され、これらの遺伝子の内、14 の減少遺伝子が炎症と自然免疫応答に関係していた。以上の結果から、腸上皮特異的な *Ubr4* 遺伝子欠損は、インフラマソームの低下により、DSS 誘導大腸炎が悪化することが示唆された。

本研究によって、腸上皮特異的 UBR4KO マウスが、新たな大腸炎関連大腸がんモデルになりうることを示した。今後、このモデルマウスを用いることによって、大腸炎及び大腸がん発症メカニズムにおける UBR4 の役割を解明し、UBR4 が新規薬剤ターゲットとなる可能性を見出した。

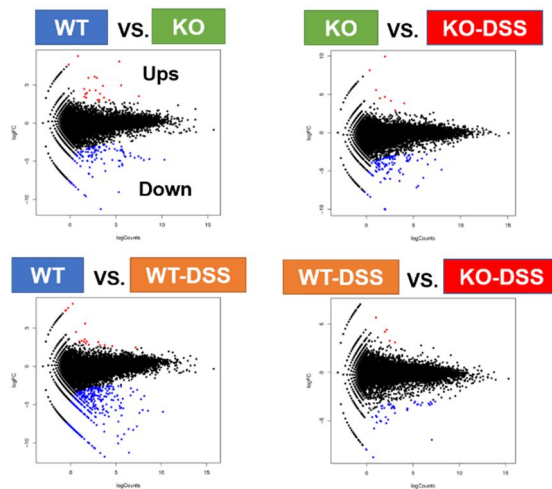


図 3 Differential Expression 解析。赤い点は有意（2 倍以上）発現量が上昇した遺伝子、青い点は有意に発現量が減少した遺伝子を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kim Sung Tae, Lee Yoon Jee, Tasaki Takafumi, Hwang Joonsung, Kang Min Jueng, Yi Eugene C., Kim Bo Yeon, Kwon Yong Tae	4. 巻 13
2. 論文標題 The N-recognin UBR4 of the N-end rule pathway is required for neurogenesis and homeostasis of cell surface proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0202260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0202260	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 Kim Sung Tae, Lee Yoon Jee, Tasaki Takafumi, Mun Su Ran, Hwang Joonsung, Kang Min Jueng, Ganipiseti Srinivasrao, Yi Eugene C., Kim Bo Yeon, Kwon Yong Tae	4. 巻 131
2. 論文標題 The N-recognin UBR4 of the N-end rule pathway is targeted to and required for the biogenesis of the early endosome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs217646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.217646	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田崎隆史、佐々木隼人、佐々木宣哉
2. 発表標題 DSS誘導大腸炎モデルにおけるユピキチンリガーゼUBR4の役割
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoon Jee Lee, Sung Tae Kim, Joonsung Hwang, Takafumi Tasaki, Bo Yeon Kim, and Yong Tae Kwon
2. 発表標題 The role of N-recognin UBR4 in endosomal-lysosomal system
3. 学会等名 1st Annual meeting of the International Society of Protein Termini, Protein Termini 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田崎 隆史, 佐々木隼人, 佐々木宣哉
2. 発表標題 腸管上皮細胞特異的UBR4ノックアウトマウスはAOM/DSS誘導大腸炎を悪化させる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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	佐々木 宣哉  (SASAKI Nobuya)  (20302614)	北里大学・獣医学部・教授    (32607)	

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
---------	---------