

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03185

研究課題名(和文) PMQCにおけるユビキチン化制御分子の機能解明と治療的応用

研究課題名(英文) Elucidation and therapeutic application of ubiquitination mechanisms in the PMQC

研究代表者

沖米田 司 (Okiyoneda, Tsukasa)

関西学院大学・生命環境学部・教授

研究者番号：90398248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：形質膜に存在する構造異常タンパク質は、形質膜タンパク質品質管理機構(PMQC)によりユビキチン化され分解される。本研究では、嚢胞性線維症の原因タンパク質CFTR変異体をモデルとして、RFFL等PMQC関連ユビキチンリガーゼのCFTR認識機構を明らかにし、触媒されるユビキチン化シグナルの種類を明らかにした。さらに、CFTR変異体の形質膜発現や安定性、ユビキチン化を制御する脱ユビキチン化酵素(DUB)に加え、PMQCに関与するユビキチンリガーゼの発現や機能を制御するDUBを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

形質膜に存在する異常タンパク質は、形質膜タンパク質品質管理機構(PMQC)により除去される。本研究成果は、あまり理解が進んでいないPMQCにどのような分子が関与するのか、その分子メカニズムの理解に加えて、どのように形質膜の異常膜タンパク質がPMQC関連分子に認識され、どのようにユビキチン化が制御されるのか、PMQCの制御メカニズムの理解に貢献する。さらに、PMQCが関わる嚢胞性線維症などの難治性疾患の新しい治療戦略(治療標的分子)の提案に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Conformationally defective membrane proteins at the plasma membrane (PM) are ubiquitinated and degraded by a PM protein quality control mechanism (PMQC). In this study, using a CFTR mutant associated with cystic fibrosis, we have revealed the molecular mechanism of how the PMQC-related ubiquitin (Ub) ligases such as RFFL recognize the misfolded CFTR. The types of ubiquitination signal on the CFTR catalyzed by the PMQC-related Ub ligases were also revealed. Furthermore, we have identified deubiquitination enzymes (DUB) that regulate the PM expression, stability, and ubiquitination of the CFTR mutant or that regulate the expression and function of the PMQC-related Ub ligases.

研究分野：薬理学、分子細胞生物学、生化学

キーワード：タンパク質品質管理 ユビキチン化 ユビキチンリガーゼ DUB 嚢胞性線維症 CFTR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

形質膜タンパク質品質管理機構 (PMQC) は形質膜に存在する構造異常タンパク質を選択的にユビキチン化し、膜タンパク質の分解を促進する。PMQC は形質膜のタンパク質恒常性の維持に重要であるが、PMQC の過敏な活性は機能的な形質膜タンパク質を分解・除去する結果、嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis: CF) など種々な疾患の原因となる。研究代表者はこれまでに CF の原因タンパク質 CFTR  $\Delta$ F508 変異体をモデルとして、PMQC 分子機構を世界に先駆けて解明してきた (Okiyoneda et al, Science 2010, Okiyoneda et al, Dev Cell 2018)。構造異常を持つ形質膜の CFTR は分子シャペロン複合体を介してユビキチン (Ub) E3 リガーゼ CHIP や disordered 領域を持つ E3 リガーゼ RFFL により選択的にユビキチン化される。ユビキチン化された CFTR は速やかにエンドサイトーシスされ、初期エンドソームで Ub 結合アダプター ESCRT 複合体に認識される結果、リソソームで分解される。一方、野生型 CFTR はエンドサイトーシス後、脱ユビキチン化酵素 (DUB) USP10 により脱ユビキチン化され、形質膜へリサイクリングされる (Bomberger et al, J Biol Cell 2009)。従って、PMQC において、E3 リガーゼと DUB が膜タンパク質の構造状態に依存して競合的に作用し、膜タンパク質のユビキチン化と細胞内運命を決定する可能性が高い。構造異常を選択的に認識する E3 リガーゼ (CHIP, RFFL) は同定されているが、膜タンパク質の構造状態を認識し、脱ユビキチン化する DUB は不明である。研究代表者は RFFL インターラクトーム解析により、RFFL が DUB 分子と結合することを発見した (Sakai et al, J Cell Sci 2019)。これらの DUB は RFFL の機能制御を介して、PMQC に関与する可能性が高い。

PMQC は様々な病態発症に関与する。E3 リガーゼ RFFL は CF 治療薬 (Orkambi 等) により形質膜に発現した  $\Delta$ F508-CFTR をユビキチン化し、分解を促進することで、CF 治療薬の有効性を消失させる (Okiyoneda et al, Dev Cell 2018)。RFFL ノックダウン (KD) は CF 治療薬 Orkambi の薬効を 2 倍以上増強し、RFFL ノックアウト (KO) マウスは健常であることから、RFFL 阻害剤は新規 CF 治療薬として有望視されている (Fukuda & Okiyoneda, Front Pharmacol 2018)。研究代表者は E3 リガーゼ網羅的 siRNA 表現型スクリーニングにより、RFFL に加えて、E3 リガーゼ HECT-X 及び LON-E3 が膜タンパク質の PMQC に関与する可能性を見出した (未発表)。予備実験の結果、HECT-X はプロテアソームシャトル分子 UBQLN2 と結合すること、LON-E3 はオートファゴソームに局在し、アダプター分子の LC3 と結合することを見出した。従って、これらの E3 リガーゼは DUB と共に形質膜タンパク質のユビキチン化を介して、異なる分解経路 (プロテアソーム、オートファジー) へ導く可能性が高い。しかしながら、PMQC に関わる E3 リガーゼ RFFL, HECT-X 及び LON-E3 がどのように異常膜タンパク質を認識し、異なる分解経路へ導くのか、その分子機構は全く不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、PMQC に関わる E3 リガーゼの機能解析から、異常形質膜タンパク質がどのように認識され、どのような Ub コードが修飾された結果、異なる分解経路に導かれるのか、その分子機構を解明することを目的とした。また、PMQC 関連 DUB の同定と機能解析から、DUB が膜タンパク質の構造状態をどのように認識し、どのような脱ユビキチン化を行うことで、膜タンパク質の運命を制御するのか、その分子機構を解明することを目的とした。さらに、CF 患者気道初代培養細胞 (CF-HBE) 及び CF マウスの解析から、難治性疾患 CF の治療標的分子としての PMQC 関連 E3 リガーゼの有効性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) PMQC E3 リガーゼの異常 CFTR 認識機構の解析

大腸菌から精製した  $\Delta$ F508-CFTR 細胞質領域 NBD1 ( $\Delta$ F508-NBD1, Okiyoneda et al, Nat Chem Biol 2013) とコムギ無細胞タンパク質合成系により精製した HECT-X 及び LON-E3 の野生型および変異型を用いた AlphaScreen またはプルダウン実験により、分子間直接相互作用を定量した。

#### (2) PMQC E3 リガーゼの X 線結晶構造解析

RFFL を大腸菌よりアフィニティ精製し、微量結晶化装置を用いて、1,000 条件以上のスクリーニングを行い、結晶を得た。構造解析、精密化に用いる回折データの収集は、放射光施設 SPring-

8, Photon Factory で行い, より分解能の高い回折データを得た.

### (3) CFTR PMQC 関連 E3 ノックアウト (KO) 細胞の樹立と機能解析

RFFL, RNF34, HECT-X, LON-E3 KO 細胞を CRISPR-CAS9 法により樹立した. これらの細胞に  $\Delta$ F508-CFTR を発現させ, その分解やユビキチン化を CHX chase 実験, CFTR-HiBiT リアルタイム定量法, Ub ELISA (Kamada et al, Bio Protoc 2019) 等により評価した.

### (4) siRNA スクリーニングによる PMQC DUB の同定

PMQC に関連する DUB を同定するために,  $\Delta$ F508-CFTR 膜発現レベルを指標に, DUB siRNA スクリーニング (約 100 種類) を行なった. コントロールとして, 野生型 WT-CFTR 膜レベルを HRP assay により定量し, CFTR 変異型への選択性を評価した.

### (5) 過剰発現実験による PMQC DUB の同定

(4)と同様に, PMQC に関連する DUB を同定するために, DUB(約 100 種類)を過剰発現させ,  $\Delta$ F508-CFTR-HRP 膜発現レベルを増加させる DUB スクリーニングを行なった. コントロールとして, WT-CFTR 膜レベルを HRP assay により定量し, CFTR 変異型への選択性を評価した.

### (6) QC 関連 DUB スクリーニング

AlphaScreen により, CFTR  $\Delta$ F508-NBD1 に直接結合する DUB の探索を行なった. また, 構造依存性を示すため, NBD1 熱変性の有無で比較解析を行なった.

### (7) PMQC 関連 E3 結合 DUB の探索

PMQC に関与する RFFL, HECT-X, LON-E3 等の E3 リガーゼに結合する DUB の探索を行なった. Biotin 化タグ融合 E3 と Flag-DUB(約 100 種類)を COS7 細胞に共発現させ, ELISA で結合を評価した. 結合が見られた DUB はプルダウン実験で確認した. さらに, 結合した DUB 過剰発現による E3 発現量の影響も ELISA 等により評価した.

### (8) CF 患者気道上皮初代培養細胞 (CF-HBE) における CFTR 活性評価法の確立

CF 治療薬の前臨床試験最終評価系である CF-HBE を Snapwell 上で約 1 ヶ月間気液界面(ALI) 培養し, 短絡電流法により内在性  $\Delta$ F508-CFTR チャネル活性を測定した.

### (9) CF マウス単離組織における CFTR 活性評価法の確立

CF( $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508) マウスの単離腸管粘膜を用いて, 短絡電流法で CFTR チャネル機能を測定した. CF( $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508) マウスの単離膵管においても, fluid secretion を指標に CFTR 活性を測定した.

### (10) 生 CF マウス個体における CFTR 活性評価法の確立

CF( $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508) マウスの鼻粘膜電位測定により, 生マウスの上気道における CFTR 機能を評価した. RFFL KO マウスを樹立し, CF マウスとの交配により, RFFL KO/CF マウスを樹立した.

### (11) CF-HBE における RFFL ノックダウン法の確立

分化した CF-HBE において, RFFL 機能阻害による内在性  $\Delta$ F508-CFTR チャネル活性改善効果を評価するために, siRNA やアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) の導入法の最適化を行なった. RFFL ノックダウン効率率は qPCR 法で評価し, 内在性  $\Delta$ F508-CFTR チャネル活性改善効果は短絡電流法で評価した.

## 4. 研究成果

### (1) PMQC E3 リガーゼの異常 CFTR 認識機構の解析

精製タンパク質を用いた AlphaLISA の結果, RFFL は N 末領域を介して, 構造異常をもつ  $\Delta$ F508-CFTR の細胞質領域 NBD1 と直接相互作用することを明らかにした. 培養細胞を用いたプルダウン実験でも, 同様の結果が確認された. 構造異常タンパク質を模倣した変性 Luciferase を用いた RFFL の NMR 解析により, 異常タンパク質の認識に関わる領域を明らかにした. HECT-X について, 培養細胞を用いたプルダウン実験により, N 末端領域が  $\Delta$ F508-CFTR との結合に必須であることを明らかにした. LON-E3 に関しては, in vitro ubiquitination assay により, E3 活性

に関わる機能領域を見出し、 $\Delta F508$ -NBD1 と相互作用に關する機能領域を明らかにした。

#### (2) PMQC E3 リガーゼの X 線結晶構造解析

精製した RFFL タンパク質の動的散乱で解析した結果、disorder 領域が多いためか、様々な分子量の多量体を形成することが明らかとなった。RFFL の結晶化を試みたが、残念ながら結晶を得ることができなかった。RNF5, RNF185 についても同様に解析し、単分散性のタンパク質を得ることができた。RNF185 (一部配列の欠損体)は X 線結晶構造解析に成功した。

#### (3) CFTR PMQC 関連 E3 KO 細胞の樹立と機能解析

樹立した RFFL, RNF34(RFFL ホモログ), HECT-X, LON-E3 KO 細胞において、 $\Delta F508$ -CFTR 分解が抑制されることを明らかにした。RFFL, RNF34 double KO 細胞では、相乗的な安定化効果が見られた。従って、RFFL と RNF34 は機能的に重複した機能があると考えられた (Taniguchi et al, Front Mol Biosci 2022)。 $\Delta F508$ -CFTR コピキチン化を Ub ELISA 法で定量した結果、これらの E3 リガーゼ阻害により、K48 連結型ポリユビキチン化と K63 連結型ポリユビキチン化が阻害された。従って、リソソーム分解に関わる RFFL, RNF34 とプロテアソーム分解に関わる HECT-X, オートファジー分解に關する可能性がある LON-E3 において、 $\Delta F508$ -CFTR の分解経路を決定するユビキチンコードに大きな違いはない可能性が考えられた。ユビキチン鎖長や混合鎖等に関して、今後の解析が必要であると思われる。

#### (4) siRNA スクリーニングによる PMQC DUB の同定

CFBE 細胞を用いた HRP assay の結果、KD により、 $\Delta F508$ -CFTR の膜発現を低下させる DUB は見られなかった。一方で、KD により WT-CFTR の膜発現を半減させる DUB を 7 種類同定した。興味深いことに、予想と反して、KD により、 $\Delta F508$ -CFTR の膜発現を 1.5 倍以上増加させる DUB を 5 種類同定した。

#### (5) 過剰発現実験による PMQC DUB の同定

COS7 細胞を用いた HRP assay の結果、過剰発現により、 $\Delta F508$ -CFTR の膜発現を倍増させる DUB を 5 種類同定した。その内、3 種類の DUB は WT-CFTR の膜発現も倍増させた。2 種の DUB は、 $\Delta F508$ -CFTR の膜発現を選択的に倍増させた。 $\Delta F508$ -CFTR の膜発現を倍増させた DUB は、 $\Delta F508$ -CFTR のユビキチン化を抑制し、形質膜安定性を増加させた。従って、本 DUB は CFTR PMQC に關する可能性が考えられた。

#### (6) QC 関連 DUB スクリーニング

コムギ無細胞タンパク質合成系により合成した DUB(16 種)と  $\Delta F508$ -NBD1 の結合を AlphaScreen 評価した結果、5 種類の DUB の結合が見られた。これらの DUB は加熱により部分的に変性した NBD1 への結合はほとんど見られなかった。従って、これらの DUB は CFTR の構造状態に依存して、脱ユビキチン化を行う可能性が考えられた。

#### (7) PMQC 関連 E3 結合 DUB の探索

ELISA 法の結果、RFFL と結合する DUB を 7 種類、HECT-X に結合する DUB を 6 種類、LON-E3 に結合する DUB を 6 種類同定した。この内、2 種類の DUB は上記 2 種類以上の E3 リガーゼと結合した。プルダウン実験の結果、ELISA で結合が見られた E3-DUB の相互作用を確認した。これら E3 結合 DUB には、KD により  $\Delta F508$ -CFTR の膜発現を増加させるものが存在した。従って、今回同定した一部の E3 結合 DUB は、RFFL 等の E3 リガーゼの発現や活性の維持に重要である可能性が考えられた。

#### (8) CF 患者気道上皮初代培養細胞 (CF-HBE) における CFTR 活性評価法の確立

CF-HBE の培養、分化誘導法に加えて、短絡電流法により内在性  $\Delta F508$ -CFTR チャネル活性を測定する手法を確立した。さらに、CF 治療剤による  $\Delta F508$ -CFTR チャネル活性の回復も確認した。

#### (9) CF マウス単離組織における CFTR 活性評価法の確立

単離腸管粘膜を用いた短絡電流法で CFTR チャネル機能を測定する手法を確立した。単離膵管においても、fluid secretion を指標に CFTR 活性を測定することが可能となった。

#### (10) 生CFマウス個体におけるCFTR活性評価法の確立

鼻粘膜電位測定 (NPD)により,生マウスの上気道におけるCFTR機能を測定する手法を確立した.本手法により,CF治療剤による $\Delta F508$ -CFTR機能回復は現在確認できていない.RFFL KO/CFマウスを樹立した.RFFL KOによる $\Delta F508$ -CFTR機能回復効果は現在解析中である.

#### (11) CF-HBEにおけるRFFLノックダウン法の確立

Lipofectamine RNAiMax, endoporter等のtransfection試薬を用いてsiRNA, ASOの導入を行なったが,RFFL KD効果は部分的であった.また,RFFL KDによる内在性 $\Delta F508$ -CFTRチャネル活性改善効果も部分的であり,低いKD効率が原因であると考えられた.今後,脂質ナノ粒子の利用等,KD効率を改善する必要があると考えられた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukuda Ryosuke, Okiyoneda Tsukasa	4. 巻 13
2. 論文標題 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Ubiquitylation as a Novel Pharmaceutical Target for Cystic Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 75 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ph13040075	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 福田 亮介、沖米田 司	4. 巻 92
2. 論文標題 嚢胞性線維症原因遺伝子産物CFTRの品質管理機構と機能制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 179 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920179	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 Kamada Yuka, Fukuda Ryosuke, Okiyoneda Tsukasa	4. 巻 9
2. 論文標題 ELISA Based Protein Ubiquitylation Measurement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3430	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 福田亮介、沖米田司	4. 巻 3
2. 論文標題 嚢胞性線維症における上皮細胞の水の輸送障害を理解する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 消化器病学サイエンス	6. 最初と最後の頁 82 ~ 86
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 沖米田 司	4. 巻 56
2. 論文標題 嚢胞性線維症のコピキチン創薬	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 31～35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.1_31	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 Taniguchi Shogo, Ito Yukiko, Kiritani Hibiki, Maruo Asuka, Sakai Ryohei, Ono Yuji, Fukuda Ryosuke, Okiyoneda Tsukasa	4. 巻 9
2. 論文標題 The Ubiquitin Ligase RNF34 Participates in the Peripheral Quality Control of CFTR (RNF34 Role in CFTR PeriQC)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	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) 10.3389/fmolb.2022.840649	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 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 6件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鎌田優香、中島千雅子、福田亮介、沖米田司
2. 発表標題 塩素イオンチャネル CFTR 変異体の小胞体関連分解における HECT 型ユビキチンリガーゼの機能解析
3. 学会等名 2020年度生理研研究会 『上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出』
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖米田司
2. 発表標題 CFTR ユビキチン化を標的とした嚢胞性線維症の治療薬開発
3. 学会等名 第 93 回日本生化学会大会シンポジウム ケモテクノロジーが拓くユビキチン ニューフロンティア
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖米田司
2. 発表標題 CFTR ユビキチン化機構を標的とした嚢胞性線維症の治療戦略
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsukasa Okiyoneda
2. 発表標題 New insights in peripheral quality control of CFTR
3. 学会等名 42st European Cystic Fibrosis Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖米田司、酒井了平、宗岡聡、永平亜佐子、富森嘉晃、東桃子、宇仁田伸、小野裕司、福田亮介
2. 発表標題 嚢胞性線維症治療薬開発を目指した RFFL ユビキチンリガーゼ PPI 阻害剤の探索
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖米田司
2. 発表標題 ミスフォールディングが誘発する嚢胞性線維症の理解
3. 学会等名 第 92 回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 沖米田司
2. 発表標題 CFTR 品質管理機構と嚢胞性線維症創薬への応用
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukasa Okiyoneda
2. 発表標題 CFTR protein quality control mechanism and its application to CF drug discovery
3. 学会等名 日本薬学会140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口正伍、酒井了平、丸尾明日香、桐谷響暉、福田亮介、沖米田司
2. 発表標題 CFTR 形質膜品質管理における RING 型 E3 Ligase CARP1 の機能解析
3. 学会等名 2021年度生理研研究会 『上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出』
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦佑大、谷口幸穂、小野裕司、土井由佳子、近藤恭光、本田香織、長田裕之、井上敬太郎、山口美穂、田代杏樹、青木俊介、福田亮介、沖米田司
2. 発表標題 CFTR 関連ユビキチンリガーゼの阻害剤探索と治療的応用.
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

沖米田研究室  
<https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~okiyoneda/okilab.html>

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	中村 照也 (Nakamura Teruya) (40433015)	熊本大学・大学院先導機構・准教授  (17401)	
研究分担者	高橋 宏隆 (Takahashi Hirotaka) (70432804)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授  (16301)	
研究分担者	石黒 洋 (Ishiguro Hiroshi) (90303651)	名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授  (13901)	
研究分担者	福田 亮介 (Fukuda Ryosuke) (90825308)	関西学院大学・生命環境学部・助教  (34504)	

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