

令和 6 年 6 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：2021～2023

課題番号：21H02690

研究課題名（和文）新規に開発した基質同定法を用いたがんドライバーユビキチンリガーゼの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of cancer driver ubiquitin ligase using a newly developed substrate identification method.

研究代表者

渡部 昌（Watanabe, Masashi）

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：10632424

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）：がんの発生、悪性化及び転移などの各過程においてユビキチン化修飾が関与することが明らかになりつつあり、基質選択性を担うユビキチンリガーゼが薬剤標的として注目されている。本研究では、プロテオミクスを駆使してがんでは重要な役割を果たすユビキチンリガーゼ・基質関係、そして制御因子の解明を通じて、ユビキチンリガーゼがどのようなメカニズムでがんの進展に寄与するのかを明らかにすることを旨とし、いくつかのユビキチンリガーゼによるがん制御機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素基質関係の解明は、ユビキチンリガーゼ(E3)と基質の結合を阻害する薬剤標的としての意義と共に、近年注目を集めている標的タンパク質分解誘導剤の開発においても重要な情報と考えられている。しかし一方で、薬剤標的として利用可能なE3・基質関係の枯渇も指摘されつつあり、未だ明らかにされていない、がんでは重要なE3・基質関係の解明が強く望まれている。本研究結果はそのような要求に応えるものであり、がん生物学における学術的な意義と共に、がん治療基盤としての社会的意義を持つものと思われる。

研究成果の概要（英文）：It is increasingly clear that ubiquitination modifications are involved in cancer development, malignant transformation, and metastasis, and ubiquitin ligases responsible for substrate selectivity are attracting attention as drug targets. In this study, we aimed to elucidate the mechanisms by which ubiquitin ligases contribute to cancer progression through the elucidation of ubiquitin-substrate relationships and regulatory factors that play important roles in cancer using proteomics. We elucidated the mechanisms of cancer regulation by several ubiquitin ligases.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの発生、悪性化及び転移などの各過程においてユビキチン化修飾が関与することが明らかになりつつある。ユビキチン化修飾はユビキチン活性化酵素、ユビキチン連結酵素、ユビキチンリガーゼの三種の酵素が連携して進行する化学反応であるが、この中でユビキチンリガーゼがヒトゲノム中に約 600 遺伝子存在して多様性に富んでおり、基質選択性を担っている。そのため、ユビキチンリガーゼと基質の関係性が有望な薬剤標的であると考えられている。一部のユビキチンリガーゼについては基質との関係が解析されつつあり、その酵素基質関係ががんの発生・進展における機能で重要な役割を果たしていることが明らかとなっているものの、多くのユビキチンリガーゼについては明らかではない。

現在ユビキチンリガーゼと基質の関係は多対多、すなわち 1 つのユビキチンリガーゼが標的とする基質は複数存在することが多く、また 1 つの基質をユビキチン化するユビキチンリガーゼも複数存在する可能性があると考えられている。しかし、多くの研究者が取組んでいるにも関わらず、膨大なユビキチンリガーゼの数の存在に反して同定された基質の数は決して多くはない。これは基質を感度良く網羅的に同定する標準的な手法が確立されていなかったことが大きな 1 つの理由であった。これまでユビキチンリガーゼの基質を同定する手法として Ligase-trap 法、TR-TUBE 法などが開発されてきたが、ユビキチンリガーゼの大部分を占めるとされる、比較的活性の弱いユビキチンリガーゼでは基質の同定に至らぬことも多かった。そこでわれわれは新しい基質同定法の開発を行った。この方法をマイトファジー誘導時に活性が高く上昇する Parkin と、比較的酵素活性が強くはない TRIM 型ユビキチンリガーゼ TRIM28 へ応用したところ、Parkin では従来法の 2 倍近く感度が上昇し、従来法ではほとんど基質を同定することができなかった TRIM28 でも複数の基質を同定することができた (Commun Biol, 3, 592, 2020)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が開発した基質同定法を中心としたプロテオミクスを駆使し、がんでは重要な役割を果たすユビキチンリガーゼ・基質関係の解明を介して、ユビキチンリガーゼがどのようなメカニズムでがんの進展に寄与するのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)がん関連ユビキチンリガーゼ基質同定プローブの作製と安定発現細胞株の樹立：解析対象のユビキチンリガーゼ遺伝子を手し、基質を捕獲するためのユビキチンリガーゼプローブおよび結合分子を捕獲するためのユビキチンリガーゼプローブをそれぞれレトロウイルス発現ベクター上に組み込んだ。各プローブには FLAG タグが挿入されている。作製したプローブベクターを用いてレトロウイルスを作製し、各プローブを安定に発現する細胞株を作製した。

(2)イオントラップ・オービトラップ型質量分析器による基質・結合分子同定：それぞれの細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、第一段階の精製を行った。トリプシンにてペプチドへと分解後、脱塩処理を行った。さらに抗ユビキチンレムナント抗体で再度免疫沈降を行い、第二段階の精製を行い、再度脱塩処理を行った。得られたサンプルについて質量分析を行った。実験は全て 3 回以上繰り返した。得られた結果は、過去に我々が蓄積している同様の基質同定結果と比較してスコアを算出することで、個々のユビキチンリガーゼ特異的な基質候補を抽出した。また、結合分子同定用に樹立した細胞から結合分子を精製し、高感度質量分析計にて網羅的な同定を行った。具体的には、それぞれの細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体での免疫沈降により精製を行った。トリクロロ酢酸を用いて沈殿後、アセトンによる洗浄、乾燥、ジチオスレイトールにて還元、ヨードアセタミドにてアルキル化を行った後にトリプシンにてペプチドへと分解後、脱塩処理を行った。得られたサンプルについて質量分析を行った。実験は 3 回以上繰り返した。得られた結果は、過去に我々が蓄積している同様の基質同定結果と比較してスコアを算出することで、個々のユビキチンリガーゼ特異的な結合分子候補を抽出した。

(3)がん関連ユビキチンリガーゼ・基質・結合分子関係に関する機能解析：同定されたユビキチンリガーゼ・基質関係について、あらためて細胞内ユビキチン化アッセイを行い妥当性の評価を行い、真の基質を決定する。ユビキチンリガーゼの野生型、ノックアウトまたはノックダウン細胞株を作製し、がん機能について検討を行った。公共データベースの情報を取得し、ユビキチンリガーゼと基質の発現レベルの違いまたは変異の有無を組み合わせた生存時間解析を行った。さらに個々の基質に応じた機能解析を行った。MHC クラス II の発現の変動についてウエスタンブロット法および蛍光免疫染色法によって細胞内タンパク質の総量を、フローサイトメトリーによって表面タンパク質量を測定した。mRNA レベルでの発現量はリアルタイム PCR 法によって測定した。CITTA を介した転写活性の測定はルシフェラーゼアッセイ法を用いた。一次繊毛の形成効率の測定は、各細胞を血清飢餓によって繊毛形成を誘導後固定し、一次繊毛のマーカー抗体 (アセチル化アルファチューブリン) によって蛍光免疫染色して行った。ヘッジホッグシグナリングの変動については、一次繊毛内外に局在が変化する分子 (SMO、PTCH1 など) を蛍光免疫染色法により観察し、標的遺伝子 (Gli1、Ptch1 など) の mRNA をリアルタイム PCR 法で測定した。

4. 研究成果

(1)がん関連ユビキチンリガーゼ基質・結合分子同定プローブの作製と安定発現細胞株の樹立：解析対象のユビキチンリガーゼ遺伝子を入手し、基質を捕獲するためのユビキチンリガーゼプローブおよび結合分子を捕獲するためのプローブを別途レトロウイルス発現ベクター上に組み込んだ。作製したプローブベクターを用いてレトロウイルスを作製し、プローブを安定に発現する細胞株作製を試みたところ、7割程度のプローブについて作製に成功した。残りのプローブについては細胞毒性のために作製できなかった。

(2)イオントラップ・オービトラップ型質量分析器による基質・結合分子同定：樹立した細胞からユビキチン化タンパク質・結合分子を免疫沈降にて精製し、高感度質量分析計にて網羅的に同定を行った。抗ユビキチンレムナント抗体について、これまではアガロースビーズに結合したものを使用していたが、マグネットビーズに結合した抗体についても検討を行い、アガロースビーズと同等またはそれ以上の結果が得られることを確認した。

(3)がん関連ユビキチンリガーゼおよび基質・結合分子を介したがんにおける機能の解析

ユビキチンリガーゼ TRIM22 による MHC クラス II 発現の制御

乳がんなどのある種の癌で MHC クラス II 発現は生存期間と負の相関があることが知られている。また、免疫チェックポイント療法の有効性にも重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究では、ユビキチンリガーゼ TRIM22 が MHC クラス II の発現を負に制御していることを見出した。MHC クラス II の発現はマスターレギュレーターである CIITA を介した転写機構や分解によって制御を受けていることが過去に知られているが、TRIM22 による MHC クラス II の負の制御は転写や分解によるものではなく、翻訳制御にあるものと思われた。直接の基質候補として翻訳制御因子である mTOR を得たが、少なくともユビキチン化は介していないという結果を得ている。

ユビキチンリガーゼ FBX011 による CIITA のユビキチン依存的分解

MHC クラス II のマスターレギュレーターである CIITA のユビキチンリガーゼとして FBX011 を同定した。FBX011 の発現量依存的に CIITA タンパク質量は減少し、FBX011 のノックアウトにより逆に増加した。FBX011 は CIITA をユビキチン化し、プロテアソームによる分解を促進していた。CIITA 量の変動に応じて MHC クラス II 発現量も変動していた。公開がんゲノムデータベースを用いて、乳がん患者における FBX011 と CIITA 発現量と生存期間との関係を調べたところ、FBX011 発現が低く CIITA 発現が高い患者群は、FBX011 発現が高く CIITA 発現が低い患者群に比べて生存期間が長いことが明らかとなった。

一次繊毛の形成や機能を制御するタンパク質を基質候補とするユビキチンリガーゼ

あるユビキチンリガーゼについて、一次繊毛の形成や機能を制御するタンパク質を基質候補としていたため、各ユビキチンリガーゼが一次繊毛の形成や機能にどのような影響を与えるかについて解析を行った。一次繊毛の形成効率の高いマウス線維芽細胞 NIH3T3、腎臓内髄質集合管細胞 mIMCD3、ヒト不死化網膜色素上皮細胞 hTERT-RPE1 を用いて、各ユビキチンリガーゼのノックダウンまたはノックアウト細胞株を樹立し一次繊毛の形成効率を解析した。一次繊毛はヘッジホッグシグナルの足場として重要であることが知られているため、ヘッジホッグシグナルへの影響を解析したところ、ユビキチンリガーゼの有無による機能の変化を認めている。また、Alphafold2 を用いて詳細な結合様式の推定を試みたが、妥当な予測構造を得ることができなかった。次にクロスリンク質量分析法によって近接する両分子のアミノ酸残基の決定を試みたがクロスリンクしたペプチドを得ることができなかったため、現在クライオ電子顕微鏡による構造解析を目指し、サンプル調製を行っている。一次繊毛の形成や機能の不全により、腎嚢胞、内臓逆位、網膜色素変性症といった多岐に渡る異常が生じることが明らかになっており、ヒトでは繊毛病と呼ばれている。本ユビキチンリガーゼが個体レベルでどのような機能を担っているかを明らかにすべく、ゼブラフィッシュでの検討を行った。ゼブラフィッシュにおけるホモログと推定された遺伝子をモルフォリノアンチセンスオリゴによってノックダウンしたところ、対照群と比べて胚の生存率が低下し、生存した胚において体の湾曲、耳石の異常、目や手の形態異常といった繊毛病に特徴的な異常が出現することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue Ayano, Watanabe Masashi, Kondo Takeshi, Hirano Satoshi, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 1869
2. 論文標題 TRIM22 negatively regulates MHC-II expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119318 ~ 119318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2022.119318	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 Kimura S, Suzuki M, Nakamaru Y, Kano S, Watanabe M, Honma A, Nakazono A, Tsushima N, Hatakeyama S, Homma A	4. 巻 -
2. 論文標題 TRIM27 expression is associated with poor prognosis in sinonasal mucosal melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Rhinology Journal	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) 10.4193/Rhin22.405	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 Nakazono Akira, Nakamaru Yuji, Ramezanzpour Mahnaz, Kondo Takeshi, Watanabe Masashi, Hatakeyama Shigetsugu, Kimura Shogo, Honma Aya, Wormald P. J., Vreugde Sarah, Suzuki Masanobu, Homma Akihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Fluticasone Propionate Suppresses Poly(I:C)-Induced ACE2 in Primary Human Nasal Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 655666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.655666	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 Tokuchi Keiko, Kitamura Shinya, Maeda Takuya, Watanabe Masashi, Hatakeyama Shigetsugu, Kano Satoshi, Tanaka Shinya, Ujiie Hideyuki, Yanagi Teruki	4. 巻 104
2. 論文標題 Loss of FAM83H promotes cell migration and invasion in cutaneous squamous cell carcinoma via impaired keratin distribution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 112 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.09.007	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 Kasuga Yusuke, Ouda Ryota, Watanabe Masashi, Sun Xin, Kimura Miki, Hatakeyama Shigetsugu, Kobayashi Koichi S.	4. 巻 120
2. 論文標題 FBX011 constitutes a major negative regulator of MHC class II through ubiquitin-dependent proteasomal degradation of CIITA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2218955120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2218955120	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 Abe M, Yaguchi H, Kudo A, Nagai A, Shirai S, Takahashi-Iwata I, Matsushima M, Nakamura N, Isahaya K, Yamano Y, Ashida S, Kasai T, Tanaka K, Watanabe M, Kondo T, Takahashi H, Hatakeyama S, Takekoshi A, Kimura A, Shimohata T, Yabe I	4. 巻 94
2. 論文標題 Sez6l2 autoimmunity in a large cohort study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry	6. 最初と最後の頁 667 ~ 668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2022-330194	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡部 昌, 畠山鎮次
2. 発表標題 さまざまなユビキチン結合ドメインを用いたTUBEs (Tandem Ubiquitin-Binding Entities)の作製
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Watanabe Masashi
2. 発表標題 A substrate-trapping strategy to find E3 ubiquitin ligase substrates.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on the Ubiquitin Family (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部 昌, 畠山鎮次
2. 発表標題 TRIM28はサイクリンA2のコピキチン化を介しS期への早期進行を抑制する
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 渡部 昌, 畠山鎮次
2. 発表標題 基質トラップ戦略によるユビキチンリガーゼParkin、TRIM28の網羅的な基質同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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	近藤 豪 (Kondo Takeshi) (10712705)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

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