

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390065

研究課題名(和文)細胞の増殖分化に関するTRIM型ユビキチンリガーゼの網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of TRIM type ubiquitin ligases in cell proliferation and differentiation

研究代表者

畠山 鎮次(Hatakeyama, Shigetsugu)

北海道大学・医学(系)研究科(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) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ある種の癌の癌化制御において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。特に細胞の増殖分化過程で重要な転写因子の制御に、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報告されている。今回、プロテオミクス的手法を使用し、転写因子のユビキチン化に関するTRIM型ユビキチンリガーゼを網羅的に解析した。その結果、いくつかの癌において、その癌化の機序に関することが明らかとなり、今後、これらの知見は癌の悪性度や早期診断等への臨床応用に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：TRIM family ubiquitin ligases are important for regulation of carcinogenesis in several cancers. It has been reported that TRIM family ubiquitin ligases regulate the activity of transcription factors in the process of cell proliferation and differentiation. By using proteomics analysis, we comprehensively analyzed TRIM family ubiquitin ligases which are related to ubiquitination of transcription factors. The analysis clarified the molecular mechanism in carcinogenesis of several cancers, maybe leading to the contribution to clinical applications for diagnosis and therapies.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞内シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

欧米と同様に、日本でも乳癌や前立腺癌などのホルモン依存性癌や大腸癌が増加している。最近、ホルモン受容体を含む多くの転写因子は生合成された後に、さまざまな化学修飾(ユビキチン化、リン酸化、アセチル化等)を受けることにより、その活性が調節されることが明らかになり、各種疾患との相関関係が注目され始めている。癌研究で最も重要視されている癌抑制遺伝子 p53 や細胞周期調節分子 p27 や癌遺伝子 c-Myc などユビキチン化の制御が重要であることが示されており、我々もこれまでに関連酵素の同定を報告してきた。

タンパク質の翻訳後修飾の一つであるユビキチン化は、主にタンパク質分解のシグナルとして機能しており、タンパク質の安定性の調節システムとして重要である。このユビキチン化修飾の酵素反応系のなかでユビキチンリガーゼ E3 は、分解すべき基質タンパク質を認識する重要な酵素サブユニットである。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数百あることが推測されており、我々が解析してきた 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を形成していることが判明している。最近になり、我々は TRIM32、TRIM68、TRIM21 及び TRIM40 がそれぞれ頭頸部扁平上皮癌、前立腺癌、多発性骨髄腫、大腸癌の癌化制御に関与することを報告している。さらに、TRIM タンパク質が多くの転写因子(核内受容体:アンドロゲン受容体 AR、エストロゲン受容体 ER、レチノイン酸受容体 RAR など)の活性やクロマチンリモデリングの制御に関する知見を報告している。

### 2. 研究の目的

癌化制御における TRIM ファミリーユビキチンリガーゼ群の重要性が報告されている。特に細胞の増殖及び分化過程で重要な核内受容体(転写因子)の制御に、TRIM ファミリーユビキチンリガーゼの関与していることが示唆された。実際、乳癌や前立腺癌などはホルモン依存性に増殖し、ある種のホルモンは核内受容体(転写因子)と相互作用することで多様な遺伝子発現を促すことが知られている。本申請においては、プロテオミクスの手法(質量分析計)により、核内受容体のユビキチン化に関する TRIM 型ユビキチンリガーゼを網羅的に解析することで、癌化の機序を解明し、癌の悪性度や早期診断等への応用に向けた検討(バイオマーカー検索)を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 転写因子翻訳後修飾に関するプロテオミクスの解析: ホルモン受容体(核内受容体)を発現した細胞もしくは FLAG タグを付けた AR、ER、GR、RAR などの発現ベクターを使用し、細胞にホルモン(生理活性物質)を添加した後のタンパク質翻訳後修飾状態を、質量分析計を利用して検索した。核内受容体の修飾状態(ユビキチン化やリン酸化やアセチル化など)の変化が検出された場合、その修飾部位の変異体を作製し、生物学的意

義を検討した。さらに、その修飾を起こす酵素の検索には、結合力を利用した方法もしくは古典的な生化学的手法を利用した。

(2) 転写因子関連 TRIM タンパク質から転写因子の翻訳後修飾解析及び各種疾患との関係の解析: ヒトもしくはマウスに存在する転写因子(核内受容体)関連 TRIM タンパク質を生化学的及び細胞生物学的手法により網羅的に解析することを目的とした。これまで我々が示してきた知見から、解析すべき遺伝子として TRIM32 など複数のタンパク質を解析すべき候補と想定した。TRIM タンパク質の構造的特徴としては、RING ドメイン、B-box ドメインと coiled coil ドメインを有しており、さらに C 末端側には SPRY ドメインや BROMO ドメインや NHL ドメイン等を有しているものがあり、この領域は基質認識ドメインとして機能している可能性が高い。C 末端側に存在するドメインに注目して結合タンパク質の同定を試み、転写因子の活性化制御の分子メカニズムを解明を試みた。具体的には、酵母ツーハイブリッド法や pull-down 法(質量分析計)により相互作用するタンパク質(基質タンパク質の候補)を網羅的に同定した。

### 4. 研究成果

(1) TRIM45 の機能解析: NF- $\kappa$ B シグナルは免疫反応、炎症、癌化などに関して、重要な役割を有する。TRIM45 が NF- $\kappa$ B シグナルに対して抑制的に制御することが判明した。また、TRIM45 の過剰発現により細胞増殖が抑制されることも判明した。さらに、TRIM45 の結合タンパク質を酵母ツーハイブリッド法で試みたところ、RACK1 を同定した。これまでの知見から、RACK1 は、MAPK シグナルで重要な PCK を制御する分子として知られている。機能解析を進めたところ、TRIM45 は RACK1 と結合することで、PCK の活性化及び MAPK シグナルを抑制することが判明した。また、MAPK シグナルにより TRIM45 遺伝子からの転写量の上昇が起きることがわかり、MAPK シグナルにおいて抑制性制御ループを形成する分子であることが明らかとなった。

(2) TRIM59 の機能解析: TRIM59 の結合タンパク質として、ECSIT を同定した。ECSIT は、自然免疫系の活性化シグナルで重要な TLR の下流で働くことが知られている。自然免疫系シグナルの下流で働く NF- $\kappa$ B シグナルやインターフェロンシグナルを解析したところ、TRIM59 は抑制的に働くことが判明した。また生化学的解析により、TRIM59 は IRF3/IRF7 のリン酸化や二量体形成を抑制することも判明した。以上より、TRIM59 は自然免疫系シグナルに対して、多機能な制御分子として働くことが示唆された。

(3) TRIM29 の機能解析: TRIM29 が前立腺組織におけるバイオマーカーとして機能する可能性を見出した。正常な前立腺は、腺細胞及び基底細胞からなっており、腺細胞の周囲に基底細胞が存在する組織像が観察される。基底細胞は前立腺がんにおいて、消失

することが知られている。我々は正常前立腺組織の基底細胞に TRIM29 が特異的に発現していることを見出した。正常前立腺組織と前立腺がん組織を使った抗 TRIM29 抗体による免疫組織化学染色により、前立腺がん組織において TRIM29 陽性基底細胞が消失(減少)していることが判明した。したがって、前立腺がんにおいて、TRIM29 がバイオマーカーとして有効であることが示された。

さらに、TRIM29 が DNA 修復に関与するヒストンアセチル化酵素である TIP60 に結合し p53 の制御することで細胞死の制御に関することを既に報告しているが、今回 TRIM29 が TWIST とともに、上皮間葉転換 EMT を制御することも明らかにした。特に、乳癌において、TRIM29 は TWIST1 の機能を抑制することで EMT を抑制する癌抑制遺伝子として機能することが推測された。

(4) TRIM32 の機能解析: TRIM32 は細胞の分化増殖に関して重要な制御分子であることが報告されている。今回、TRIM32 の結合タンパク質として 14-3-3 を同定した。14-3-3 は TRIM32 と結合することで、TRIM32 の凝集体形成を抑制することがわかった。すなわち、TRIM32 の機能は、リン酸化依存性に 14-3-3 と結合することで、細胞内で制御されていることが判明した。

(5) TRIM67 の機能解析: 神経特異的発現を示す TRIM ファミリータンパク質として TRIM67 を同定した。TRIM67 の結合タンパク質を検索したところ、80K-H を同定した。80K-H は細胞増殖で重要な Ras のシグナルを制御する分子として知られている。TRIM67 は、80K-H の発現を減少させることで、細胞増殖を抑制し、神経突起身長を促進させる機能を有することが判明した。すなわち、TRIM67 は 80K-H を分解することで、神経細胞分化を促す作用があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

Tsukiyama, T., Fukui, A., Terai, S., Fujioka, Y., Shinada, K., Takahashi, H., Yamaguchi, T.P., Ohba, Y. and Hatakeyama, S.: Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.*, 査読有, in press  
DOI: MCB.00159-15

Kanno, Y., Mitsui, T., Kitta, T., Moriya, K., Tsukiyama, T., Hatakeyama, S., Nonomura, K.: The Inflammatory Cytokine IL-1b is Involved in Bladder Remodeling After Bladder Outlet Obstruction in Mice, *Neurouro. Urodyn.*, 査読有, in press.  
DOI: 10.1002/nau.22721

Takahashi, H., Takigawa, I., Watanabe, M., Anwar, D., Shibata, M., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Ranjan, A., Seidel, C.W., Tsukiyama, T., Mizushima, W., Hayashi, M., Ohkawa, Y., Conaway, J.W., Conaway, R.C. and Hatakeyama, S.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex, *Nature Commun.*, 査読有, 5,5941, 2015  
DOI: 10.1038/ncomms6941

Sato, T., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Iguchi, A. and Ariga, T.: The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. *Oncogene*, 査読有, 34, 1280-1291, 2015  
DOI: 10.1038/onc.2014.68

Nakamaru, Y., Takagi, D., Homma, A., Hatakeyama, S., Fukuda, S.: Oxidative stress regulates IL-4 gene expression in mast cells through the reduction of histone deacetylase. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 査読有, 152, 48-52, 2015  
DOI: 10.1177/01945998114559189

Kameda, Y., Takahata, M., Mikuni, S., Shimizu, T., Hamano, H., Angata, T., Hatakeyama, S., Kinjo, M. and Iwasaki, N.: Siglec-15 is a potential therapeutic target for postmenopausal osteoporosis, *Bone*, 査読有, 71, 217-226, 2014  
DOI: 10.1016/j.bone.2014.10.027

Yabe, I., Tanino, M., Yaguchi, H., Takiyama, A., Cai, H., Kanno, H., Takahashi, I., Hayashi, Y., Watanabe, M., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Tanaka, S. and Sasaki, H.: Pathology of frontotemporal dementia with limb girdle muscular dystrophy caused by a DNAJB6 mutation. *Clin. Neurol. Neurosur.*, 査読有, 127, 10-12, 2014.  
DOI: 10.1016/j.clineuro.2014.09.013

Ai, L., Wan-Ju Kim, W., Alpay, M., Tang, M., Pardo, C.E., Hatakeyama, S., May, W.S., Klade, M.P., Heldermon, C.D., Siegel, E.M. and Brown, K.D.: TRIM29 suppresses TWIST1 and invasive breast cancer behavior. *Cancer Res.*, 査読有, 74, 4875-4887, 2014  
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3579

Kanno, Y., Watanabe, M., Kimura, T., Nonomura, K., Tanaka, S. and Hatakeyama, S.: TRIM29 as a novel prostate basal cell marker for diagnosis of prostate cancer. *Acta*

*Histochem.*, 査読有, 116, 708-712, 2014

DOI: 10.1016/j.acthis.2013.12.009

Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Okumura, F., Takeuchi, A., Horiuchi, K., Kan, T., Kanda, A., Saito, W., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S. and Sasaki H.: Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *J. Neurol.*, 査読有, 261, 224-226, 2014

DOI: 10.1007/s00415-013-7134-5

Ichimura, T., Taoka, M., Shoji, I., Kato, H., Sato, T., Hatakeyama, S., Isobe, T. and Hachiya, N.: 14-3-3 proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation. *J. Cell Sci.*, 査読有, 126, 2014-2026, 2013

DOI: 10.1242/jcs.122069

Kameda, Y., Takahata, M., Komatsu, M., Mikuni, S., Hatakeyama, S., Shimizu, T., Angata, T., Kinjo, M., Minami, A. and Iwasaki, N.: Siglec-15 Regulates Osteoclast Cytoskeletal Organization in Association with Signaling Adaptor DAP12. *J. Bone Mineral Res.*, 査読有, 28, 2463-2475, 2013

DOI: 10.1002/jbmr.1989

Okumura, F., Okumura, A.J., Uematsu, K., Hatakeyama, S., Zhang, D.E. and Kamura, T.: Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 288, 2839-2847, 2013

DOI: 10.1074/jbc.M112.401851.

Hatakeyama, S.: Ubiquitin-mediated regulation of JAK-STAT signaling in embryonic stem cells. *JAK-STAT*, 査読有, 1, 168-175, 2012

DOI: 10.4161/jkst.21560

Shibata, M., Sato, T., Nukiwa, R., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM45 negatively regulates NF- $\kappa$ B-mediated transcription and suppresses cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 423, 104-109, 2012

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.090

Kondo, T., Watanabe, M. and Hatakeyama, S.: TRIM59 interacts with ECSIT and negatively regulates NF- $\kappa$ B and IRF-3/7-mediated signal pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 422, 501-507, 2012

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.028

Tsukiyama, T., Matsuda-Tsukiyama, M., Bohgaki, M., Terai, S., Tanaka, S. and Hatakeyama, S.: Ymer acts as a multifunctional regulator in NF- $\kappa$ B and Fas signaling pathways. *Mol. Med.*, 査読有, 18, 587-597, 2012

DOI: 10.2119/molmed.2011.00435

Yaguchi, H., Okumura, F., Takahashi, H., Kano, T., Kameda, H., Uchigashima, M., Tanaka, S., Watanabe, M., Sasaki, H. and Hatakeyama, S.: TRIM67 protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuritogenesis. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 287, 12050-12059 (2012)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.090

〔学会発表〕(計20件)

高橋秀尚, 瀧川一学, 渡部昌, Delnur Anwar, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Amol Ranjan, Chris W Seidel, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Joan W Conaway, Ronald C Conaway, 畠山鎮次, メディエーター複合体による転写伸長制御、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25~27日、パシフィコ横浜 (横浜)

高橋秀尚, 瀧川一学, 渡部昌, Anwar Delnur, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Ranjan Amol, Seidel Chris, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Conaway Joan, Conaway Ronald, 畠山鎮次, Med26はLittle elongation complexをリクルートすることでsmall nuclear RNA遺伝子の発現を制御する、第87回日本生化学会、2014年10月15~18日、京都国際会議場 (京都)

渡部昌, 高橋秀尚, 畠山鎮次, TRIMタンパク質による脂肪細胞分化制御、第87回日本生化学会、2014年10月15~18日、京都国際会議場 (京都)

柘田安志, 高橋秀尚, Conaway Ronald C., Conaway Joan W., 畠山鎮次, TRIM29はヒストンH2AXのリン酸化を介してDNA二本鎖切断修復を制御する、第87回日本生化学会、2014年10月15~18日、京都国際会議場 (京都)

鈴木正宣, 渡部昌, 中丸裕爾, 福田諭, 畠山鎮次, Tripartite motif protein39(TRIM39)の機能解析、第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2014年6月19~20日、北海道大学 (札幌)

築山忠維, 福井彰雅, 寺井小百合, 藤岡容一朗, 品田恵佐, Yamaguchi Terry, 大場雄介, 畠山鎮次, がん抑制遺伝子RNF43は異なるメカニズムによってWnt/beta-catenin経路とnoncanonical Wnt経路を抑制する、第36回日本分子生

物学会年会、2013年12月3~6日、神戸ポートアイランド(神戸)

築山忠維、畠山鎮次、がん抑制遺伝子RNF43は異なるメカニズムによってWnt/beta-catenin経路とnoncanonical Wnt経路を抑制する、第72回日本がん学会学術総会、2013年10月3~5日、パシフィコ横浜(横浜)

畠山鎮次、TRIMタンパク質の多彩な機能、第86回日本生化学会、2013年9月11~13日、パシフィコ横浜(横浜)

榊田安志、畠山鎮次、ATDCはヒストンH2A.Xのリン酸化とヒストンH4のアセチル化を介してDNA二本鎖切断修復を制御する、第86回日本生化学会、2013年9月11~13日、パシフィコ横浜(横浜)

Hatakeyama, S., Regulation of cellular function by TRIM proteins, The 35th Naito Conference (The Ubiquitin-Proteasome System: from Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles), Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo (Japan), 2013年7月9~12日

Watanabe, M., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Involvement of linear polyubiquitination in PPAR $\gamma$  transcriptional activity, The 35th Naito Conference (The Ubiquitin-Proteasome System: from Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles), Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo (Japan), 2013年7月9~12日

Matsuda, Y., Takahashi, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S., Functional analysis of a novel multiprotein complex containing ataxia telangiectasia group D-complementing (ATDC) gene product, TRIM29, The 35th Naito Conference (The Ubiquitin-Proteasome System: from Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles), Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo (Japan), 2013年7月9~12日

高橋秀尚、Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway、畠山鎮次、Med26はLittle elongation complexをリクルートすることでsmall nuclear RNA遺伝子の発現を制御する、第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡)

榊田安志、高橋秀尚、畠山鎮次、TRIM29によるTRRAP/Tip60複合体の機能制御とがん化との関わり、第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡)

畠山鎮次、TRIMタンパク質の多様性と機能、第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡)

高橋秀尚、佐藤智信、Conaway, J.W., Conaway, R.C., 畠山鎮次、Med26はLittle elongation complexをリクルートすることでsmall nuclear RNA遺伝子の発現を制御する、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11~14日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡)

奥村文彦、畠山鎮次、ドンガーザン、嘉村巧、double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) はinterferonstimulated gene 15 (ISG15)修飾により活性化され、キャップ構造依存性のタンパク質翻訳を抑制する、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11~14日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡)

畠山鎮次、免疫と癌を制御するTRIM型ユビキチンリガーゼ、第40回日本臨床免疫学会総会、2012年9月27-29日、京王プラザホテル(東京)

築山忠維、畠山鎮次、RNF43はNEDL1と結合し、p53依存性の転写を調節する、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19~21日、ロイトン札幌(札幌)

Hatakeyama, S., TRIM proteins and cancer, 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19~21日、ロイトン札幌(札幌)

〔図書〕(計 2件)

清木元治 他、南山堂、がん基盤生物学-革新的シーズ育成に向けて-、2013、336

藤田道也 他、医学書院、標準生化学、2012、351

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 前立腺基底細胞の検出方法  
発明者: 畠山鎮次、田中伸哉  
権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2012-277980

出願年月日: 2012/12/20

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~d20505/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

畠山 鎮次 ( HATAKEYAMA,  
Shigetsugu )

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70294973

(3)連携研究者

築山 忠維 ( TSUKIYAMA, Tadasuke )

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20399819

高橋 秀尚 ( TAKAHASHI, Hidehisa )

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20399819