

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18076001

研究課題名（和文） ユビキチンリガーゼの多様性の解析

研究課題名（英文） Analysis of diversity of ubiquitin ligase

研究代表者

嘉村 巧 (Takumi Kamura)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40333455

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タンパク質分解

### 1. 研究計画の概要

ユビキチン化修飾による分解制御系が、様々な生命現象に重要な働きを果たしていることが明らかになり、注目を集めてきている。中でも、この分解システムの多様性を決めるユビキチンリガーゼ (E3) の研究が盛んに行われてきており、現在までに E3 本体に関してははかり明らかになってきている。この領域の次の課題は個々の E3 に対する特異的基質の同定に移ってきている。そこで本研究では、様々な E3 に対する基質を酵母 2 ハイブリッド法や pull-down 法により分離・同定し、さらにはこれら酵素・基質関係により制御される生命現象を解明すること (Degradome 解析) を目的とする。

### 2. 研究の進捗状況

本課題では、出芽酵母および哺乳類におけるユビキチンリガーゼの多様性を Cullin ファミリーと TRIM ファミリーを解析している。Cullin 型 E3 の解析では、出芽酵母やヒト Cullin 型 E3 に対する相互作用タンパク質の網羅的探索を進めている。出芽酵母 SCF 型 E3 において Dia2 が Mrc1、CTF4 と、Met30 が Cad1 と、Ufo1 が Rpi1 と、Mdm30 が Gup1 と、YJL149w が Swd1 と、さらには Ymr258c が Ypt52 と相互作用することを見出し解析中である。出芽酵母 Cul3 および Cul8 型 E3 に関してはこれらの構成因子を生化学的に調べ、基質候補を検討中である。また出芽酵母 cdc53 の結合因子として Lag2 を同定しその機能解析を進めている。哺乳類 Cullin 型 E3 においては、Fem1B が Nek2 と、そして Zyg11B が AIF とさらには ElonginA が RNA ポリメラーゼ II と相互作用することを見出し解析中である。TRIM

タンパク質を網羅的に解析し、ユビキチン化される基質タンパク質の同定および分子論的解明を行った。現在までのところ、約 22 種類の TRIM タンパク質の cDNA をクローニングし、その生化学的解析を進め、いくつかの TRIM タンパク質において相互作用タンパク質を同定している。TRIM25 と TRIM68 はそれぞれエストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体の活性化に関与し、TRIM21 は B 細胞における抗体産生の際のタンパク質品質管理に関与していることを見いだしている。また、TRIM32 は Abl 関連分子 Abi2 のユビキチン化依存性分解に関与し、その発現レベルが頭頸部癌の悪性度と相関関係があることが判明した。その他にも、転写因子の活性化やクロマチンリモデリングの制御に、多くの TRIM タンパク質が関与している知見を見出している。

### 3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

われわれは、E3 なかでもユビキチンシステムにおいて重要な役割を担っている Cullin 型 E3 と TRIM 型 E3 に対する基質の同定さらにはこれら E3-基質関係により制御される生命現象の解明を目的に研究を進めている。まず E3 に相互作用するタンパク質の同定を行ない現在までに出芽酵母や哺乳類 Cullin 型 E3 に対する複数の基質候補を同定している。また出芽酵母 SCF 型 E3 の基質探索を行なうことにより新たに Cdc53 と結合し SCF 型 E3 の機能を制御するタンパク質 Lag2 を発見することができた。さらに出芽酵母 Cul8 型 E3 と結合するタンパク質 CTF4 を同定

し解析を進めているところである。このように網羅的解析を行なうことにより基質に加えて E3 の制御因子の同定にもつながり、非常に有用な研究であると考えられる。ヒトおよびマウスにおける TRIM タンパク質を網羅的に同定することを試みた。特に既存の情報があった TRIM32 に関して結合タンパク質として癌関連遺伝子である c-Abl 制御分子である Abi2 を同定した。さらに、TRIM32 依存性の Abi2 分解が扁平上皮癌の増殖能や浸潤能に関することを報告した。また、シェーグレン症候群に関係する自己抗原 Ro52/TRIM21 の結合タンパク質が抗体タンパク質 IgG1 であることを同定し、TRIM21 が B 細胞における抗体タンパク質の品質管理に関係することを報告した。TRIM25 がエストロゲン受容体と相互作用し、エストロゲン依存性転写活性化を制御することを明らかにし、TRIM 型 E3 のいくつかの酵素は転写制御系に関与する可能性を示した。また、これまで機能が未知の自己抗原タンパク質であった SS-56 が実は TRIM68 として分類され、機能的にアンドロゲン受容体の活性化を制御し、前立腺癌細胞及びヒト前立腺癌組織において高発現していることを見出した。さらに、アンドロゲン受容体の結合するユビキチンリガーゼ PIRH2 が膜輸送系の制御分子の分解に関与することを発見し、前立腺癌において重要な PSA の分泌に関与することを示した。現在のところ、新たに同定したタンパク質の機能解析を進めるとともにさらに別の E3 と相互作用するタンパク質の同定も平行して進めており、おおむね順調に研究は進んでいる。

#### 4. 今後の研究の推進方策

われわれは、現在までに複数の E3 に対する基質候補を同定し細胞生物学的解析を進めているが、今後もこれと平行して新たな基質候補の同定・解析を行なっていく。手順を以下に示す。

- (1) Cullin 型および TRIM 型 E3 ユビキチンリガーゼに対する基質の網羅的解析
- (2) ホルモン依存性癌に関与する分子のユビキチン化解析
- (3) 新規基質のクローニングおよび抗体の作製
- (4) E3 の新規基質候補タンパク質の安定性に及ぼす影響の検討
- (5) 新規 E3 タンパク質の性ホルモン受容体の安定性に及ぼす影響の検討
- (6) 4. および 5. で同定した E3—基質関係により制御される細胞生物学現象の検討

#### 5. 代表的な研究成果

(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 19 件)

- ① Kano, S., Miyajima, N., Fukuda, S. and Hatakeyama, S.: TRIM32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2, *Cancer Res.*, 68, 5572-5580, 2008. 査読: 有
- ② Yasukawa, T., Kamura, T., Kitajima, S., Conaway, RC., Conaway, JW., Aso T.: Mammalian Elongin A complex mediates DNA-damage-induced ubiquitylation and degradation of Rpb1. *EMBO J.* 27:3256-66, 2008. 査読: 有
- ③ Miyajima, N., Maruyama, S., Bohgaki, M., Kano, S., Shigemura, M., Shinohara, N., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: TRIM68 regulates ligand-dependent transcription of androgen receptor in prostate cancer cells, *Cancer Res.*, 68, 3486-3494, 2008. 査読: 有
- ④ Takahata, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Kondo, T., Asaka, M. and Hatakeyama, S.: Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system, *Mol. Immunol.*, 45, 2045-2054, 2008. 査読: 有
- ⑤ Maruyama, S., Miyajima, N., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Shigemura, M., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: Ubiquitylation of  $\epsilon$ -COP by PIRH2 and regulation of the secretion of PSA, *Mol. Cell. Biochem.*, 307, 73-82, 2008. 査読: 有

[学会発表] (計 22 件)

[図書] (計 3 件)

[産業財産権]

[その他]

ホームページ

<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/%7e2kamura/index.html>