

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24112006

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼによる選択的基質識別メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of selective substrate recognition by the ubiquitin ligase

研究代表者

嘉村 巧 (Kamura, Takumi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：40333455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 135,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン修飾系は、様々な生命現象に重要な働きを果たしている。本研究では、Cullin型およびTRIM型E3に対する基質を同定し、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の解明を目的とした。我々は、Cullin型E3のUcc1がクエン酸合成に、SSB4がシグナル伝達に、ASB7が紡錘体形成に、そしてPrmeが転写に関与していることを見出した。またTRIM型E3のTRIM45が癌抑制に、TRIM23が脂肪細胞分化に、TRIM29がDNA修復に、そしてRNF207が糖代謝に関与していることを発見した。本研究によりCullin型およびTRIM型E3の新たな機能が解明された。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin system controls a variety of cellular processes. In this research, we try to clarify the new substrates and function of Cullin-type and TRIM-type E3s. Now we show that, in the Cullin type E3s, Ucc1, SSB4, ASB7 and Prme is related to the regulation of citric acid composition, signal transduction, spindle formation and transcription, respectively. Furthermore, we demonstrate that, in the TRIM-type E3s, TRIM45, TRIM23, TRIM29 and RNF207 controls tumor suppression, fat cell differentiation, DNA repair and glucose metabolism, respectively. Our findings shed the light on the new function of Cullin-type and TRIM-type E3s.

研究分野：生物学

キーワード：ユビキチン修飾

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系は選択的にタンパク質を識別し、多彩な形態のユビキチン(ポリユビキチン鎖など)を結合させて分解のみならず多様な様式でその機能を制御することで、細胞周期進行・シグナル伝達・DNA複製・神経変性疾患・免疫応答など多岐にわたる生命現象において重要な役割を果たしている。ユビキチン系はユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の3種類の触媒酵素群によって、E3が特異的に認識する基質タンパク質に種々の様式のユビキチン鎖を結合させることで始動する。それゆえ、E3による基質識別メカニズムの理解はユビキチンネオバイオロジーの解明に不可欠な研究テーマである。ユビキチン修飾される標的タンパク質は非常に多く、それを特異的に認識するE3も非常に多数(ヒトで約600種類)存在する。E3は大きく分けて、HECT型、U-box型、RING-finger型に分類される。中でもRING-finger型E3は最も数が多く、様々な生命現象に重要な役割を果たすE3が数多く含まれている。RING-finger型E3には単量体型と複合体型がある。前者の中にTRIMファミリーと呼ばれる一群があり、哺乳類において70種類以上のメンバーから構成される。TRIMタンパク質は、RING-fingerドメイン、B-boxドメインそしてcoiled-coilドメインを有しており、C末端側に基質認識領域と考えられるユニークな配列が存在する。一方、後者の中にCullin型E3と称される複合体を形成する一群がある。Cullin型E3は基本的にRING-fingerタンパク質、Cullin、アダプタータンパク質、そして基質認識サブユニットからなる四量体で構成されており、哺乳類では、それぞれのCullinと複合体を形成する因子が明らかにされている。これらCullin型E3の最も特徴的な点は、RING-fingerタンパク質、Cullin、アダプタータンパク質は常に共通の構成因子であるのに対し、基質認識サブユニットは可変因子であり、これを交換することによって非常に多くの基質に対応できるようになっていることである。

データベース検索により、非常に多くのTRIM型E3やCullin型E3が存在することが明らかになっており、さらには個々のE3が複数の基質を認識しユビキチン化することにより、多彩な生命現象を制御していると考えられているが、これらE3の機能はほとんど解明されていないのが現状である。そこでこの分野の重要な課題はこれらE3の機能(選択的に識別する基質の同定と生理的及び病理的役割)を明らかにすることであり、本研究課題ではCullin型、TRIM型E3の機能解明に取り組む。

## 2. 研究の目的

ユビキチン修飾において基質特異性決定という重要な役割を担っているE3は精力的

に研究されており、現在までにE3の構造はほぼ明らかとなっている。現在のE3研究の重要な課題は個々のE3に対する特異的基質の同定とその機能の解明である。近年の質量分析法の技術進歩およびデータベースの充実により微量タンパク質の同定が可能になってきている。そこで本研究では、Cullin型E3やTRIM型E3に対する基質を免疫沈降法および質量分析法の組み合わせにより分離・同定し、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を目的とする。さらには、先行研究により同定しているCullin型E3やTRIM型E3の基質に関する解析を進め、これらの生理的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) E3ユビキチンリガーゼの新規基質の同定  
Cullin型E3は刺激伝達、細胞周期などに、またTRIM型E3は多くのガンや白血病や免疫応答に関与している。Cullin型およびTRIM型E3に対する新規ユビキチン化基質を免疫沈降法や酵母2ハイブリッド法などを用いて同定する。新たに同定した酵素・基質間の制御機構を細胞生物学的に明らかにする。さらに、領域内共同研究で新規基質の同定も進める。

(2) Cullin型E3ユビキチンリガーゼの機能解析

先行研究により、Cullin型E3であるSsb4やZyg11bの基質としてEphB2とMcl1をそれぞれ同定している。EphB2は細胞膜受容体型チロシンキナーゼで刺激伝達に機能し、Mcl1は抗アポトーシス作用を有する因子である。これらE3基質間の制御機構を細胞生物学的手法により明らかにする。

(3) TRIM型E3ユビキチンリガーゼの機能解析

TRIMタンパク質はガン化、免疫制御(自然免疫応答)、神経分化などに関与することは判明してきており、特にTRIM9/67(神経系特異的発現)やTRIM45(癌関連)などの基質タンパク質の同定を行い、細胞の増殖・分化等に関する生理機能の解明を進める。また、K48鎖以外のユビキチン鎖形成に関与するTRIMタンパク質が明らかとなってきており、多様なユビキチン鎖形成におけるTRIMタンパク質の役割を細胞生物学的手法により明らかにする。

## 4. 研究成果

本課題では、CullinファミリーとTRIMファミリーの機能解析に取り組んだ。

(1) Cullin型E3の機能解析

グリオキシル酸回路は微生物や植物に特有の代謝経路である。これらの生物はグルコースが不足すると、酢酸や脂肪酸を材料にして、グリオキシル酸回路・クエン酸回路・糖新生という一連の代謝反応によってグルコースを合成する。これまで回路の活性は、グルコースが豊富にあると「オフ」になり、グ

ルコースが不足して、炭素源として酢酸や脂肪酸が細胞内に取り込まれると「オン」になることが知られていたが、スイッチの詳細なメカニズムは明らかにされていなかった。我々は、回路の中で最初の反応を触媒するクエン酸合成酵素 (Cit2) に着目し、グルコースが豊富にあると Ucc1 が Cit2 の分解を促進して、回路の活性を抑制することを見出した (オフの状態)。また、グルコースが不足して酢酸や脂肪酸からグルコースを作る必要が生じると、Ucc1 が Cit2 から解離して、安定化した Cit2 が回路を活性化することも見出した (オンの状態)。本研究は、代謝経路の活性が代謝酵素の「分解」によって制御されるというユニークなスイッチ機構を明らかにしたものと見える。今後、バイオ燃料などの有用物質の生産を目指す代謝工学、感染症の克服を目指す医学などの分野で、Ucc1 は重要な「ツール」および「ターゲット」になると期待される。( *Mol Cell* 59, 22, 2015 )

適切な紡錘体形成は細胞分裂が正常に終結するために必須である。しかしながら、細胞分裂期における紡錘体形成の制御機構は完全には解明されていない。我々は Cullin5 に結合する機能未知のコピキチンリガーゼ ASB7 を解析する過程において基質分子 DDA3 を同定した。DDA3 はキネシンファミリーに属する Kif2a と協調して紡錘体形成を抑制することが知られている。興味深いことに微小管の存在は ASB7 と DDA3 の結合を阻害し、ASB7 依存的な DDA3 のポリコピキチン修飾も減少し、結果として DDA3 は安定化した。また、ASB7 をノックダウンすると DDA3 は蓄積し、細胞分裂期における染色体の整列に異常が見られたが、この異常は ASB7 の再導入で回復した。これらの結果をまとめると、ASB7 は DDA3 を不安定化し、微小管の伸長を誘導する。微小管が十分量形成すると ASB7 と DDA3 の結合が阻害され、DDA3 が安定化することが示唆された (図 2)。したがって ASB7 と DDA3 の間には微小管の存在量を介したフィードバック機構が存在し、適切な紡錘体の形成が保証されていると考えられる ( *J Cell Biol* 215, 95, 2016 )

VHL 病 (腫瘍が主症状) の発症メカニズムは解明されつつある。すなわち、pVHL がその基質分子である HIF をポリコピキチン修飾し、プロテアソーム依存的に分解し、HIF の量を制御する、という機構の破綻によるものである。我々は、pVHL の新規基質を探索した結果、転写因子 B-Myb を pVHL 結合タンパク質として同定した。B-Myb は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体や血小板由来成長因子 (PDGF) 受容体依存的にそのリン酸化されると pVHL に認識されにくくなり、安定化することが示唆された。次に、pVHL 欠損細胞株 786-0 の腫瘍形成能を指標に B-Myb の生物学的な役割を検討した。B-Myb をノックダウ

ンした 786-0 細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ、腫瘍形成能の著しい亢進が認められた。B-Myb は転写因子であるので、どのような遺伝子群の変動が腫瘍形成能の亢進に寄与しているのかをマイクロアレイ解析により検討した。その結果、HIF 経路で制御されている遺伝子群の有意な変動は認められなかったことから、HIF 経路「非依存性」の経路を制御していることが示された。これらの結果は B-Myb が HIF 経路とは別の経路を制御することで VHL 病の発症や進行を抑制していることを示唆している ( *Mol Cell Biol* 31, 1803, 2016 )

## (2) TRIM 型 E3 の機能解析

TRIM 型 E3 に関して、転写因子等の活性化制御に関与する TRIM タンパク質を生化学的手法により同定し、細胞生物学的解析により細胞増殖や分化に関するそれらの新たな機能が明らかになった。TRIM45 が RACK1 と相互作用することで PKC シグナルを抑制し、癌抑制遺伝子の機能を有することを明らかにした ( *Oncogene* 34, 1280, 2015 )。

網羅的な生化学的解析により、細胞分化や DNA 修復に関与する TRIM タンパク質を同定し、分子生物学的解析によりクロマチン制御に関する新たな機能を解明した。特に、TRIM23 が脂肪細胞分化制御因子 (転写因子) である PPAR $\gamma$  を安定化させることで、脂肪細胞の分化成熟を進めることが明らかとなった (計画研究代表研究者佐伯博士との共同研究) ( *eLIFE* 4, e05615, 2015 )。また、TRIM29 が DNA 修復因子群と相互作用し、DNA 修復の足場として機能することが判明した ( *Nature Commun* 6, 7299, 2015 )。さらに、TRIM29 は扁平上皮細胞に特異的に発現し、上皮細胞分化の制御因子である p63 や ZEB1 の発現調節に関与することが判明した ( *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 1853, 2296, 2015 )。すなわち、TRIM29 が扁平上皮系列細胞における上皮間葉転換 EMT に関与する因子であることが判明した。

さらに、TRIM ファミリーの中で Class V サブファミリーに属する RNF207 の機能を解析したところ、そのノックダウン実験により ATP 産生の低下及び還元型 NAD 量の減少が観察された。電子顕微鏡を使用した形態学的解析を行ったところ、RNF207 の発現低下によりオートファジーの亢進が認められた。これらの原因を解明するためにメタボローム解析を行ったところ、糖代謝経路の解糖系とクエン酸回路の中間に位置するピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が低下していることが明らかとなった ( *J Mol Cell Cardiol* 100, 43, 2017 )。今後は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼに対する RNF207 の影響を分子レベルで解明することが重要と考えられる。以上の研究成果に基づき、TRIM ファミリータンパク質に関する複数の総説の執筆依頼を受け、現在注目されている分野として評価されたと判断

できる。JAK-STAT誌には「幹細胞維持シグナルにおける TRIM タンパク質の関与」に関する総説を、J Biochem誌には「TRIM ファミリーが関与する疾患」に関する総説を、Trends in Biochem Sci誌 (Cell Press)には「最近注目されている TRIM ファミリーが関与する機能」に関する総説を発表した。

## 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 39 件)

1. \*Hatakeyama, S.: TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity and Carcinogenesis. (2017) *Trends Biochem. Sci.* 42, 297-311. 査読有
2. Watanabe, M. and \*Hatakeyama, S. (2017) TRIM proteins and diseases. *J. Biochem.* 161, 135-144. 査読有
3. Uematsu, K., \*Okumura, F., Tonogai, S., Okumura, A.J., Alemayehu, D.H., Nishikimi, A., Fukui, Y., Nakatsukasa, K., and \*Kamura, T. (2016) ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation. *J Cell Biol* 215, 95-106. doi: 10.1083/jcb.201603062. 査読有
4. \*Okumura, F., Uematsu, K., Byrne, S.D., Hirano, M., Joo-Okumura, A., Nishikimi, A., Shuin, T., Fukui, Y., Nakatsukasa, K. and \*Kamura, T. (2016) Parallel regulation of VHL disease by pVHL-mediated degradation of B-Myb and HIF- $\alpha$ . *Mol.Cell.Biol.* 36, 1803-17. doi: 10.1128/MCB.00067-16. 査読有
5. \*Okumura, F., Okumura, A.J., Nakatsukasa, K. and \*Kamura, T. (2016) The role of cullin 5-containing ubiquitin ligases. *Cell Division* 11, 1 doi: 10.1186/s13008-016-0016-3. 査読有
6. \*Nakatsukasa, K. and \*Kamura, T. (2016) Subcellular Fractionation Analysis of the Extraction of Ubiquitinated Polytopic Membrane Substrate during ER-Associated Degradation. *PLoS One* 11, e0148327. doi: 10.1371/journal.pone.0148327. 査読有
7. \*Hatakeyama, S. (2016) Early evidence for the role of TRIM29 in multiple cancer models. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 20, 767-770. 査読有
8. Mizushima, W., Takahashi, H., Watanabe, M., Kinugawa, S., Matsushima, S., Takada, S., Yokota, T., Furihata, T., Matsumoto, J., Tsuda, M., Chiba, I., Nagashima, S., Yanagi, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Tsutsui, H. and \*Hatakeyama, S. (2016) The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 100, 43-53. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.09.013. 査読有
9. Anwar, D., Takahashia, H., Watanabe, M., Suzuki, M., Fukuda, S. and \*Hatakeyama, S. (2016) p53 represses the transcription of snRNA genes by preventing the formation of little elongation complex. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* 1859, 975-982. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.06.001. 査読有
10. Suzuki, M., Watanabe, M., Nakamaru, Y., Takagi, D., Takahashi, H., Fukuda, S. and \*Hatakeyama, S. (2016) TRIM39 negatively regulates the NF $\kappa$ B-mediated signaling pathway through stabilization of Cactin. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1085-1101. doi: 10.1007/s00018-015-2040-x. 査読有
11. \*Nakatsukasa, K., Nishimura, T., Byrne, D., Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Chibana, H., Okumura, F. and \*Kamura, T. (2015) The ubiquitin ligase SCFUcc1 acts as a metabolic switch for the glyoxylate cycle. *Molecular Cell* 59, 22-34 doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.013. 査読有
12. \*Nakatsukasa, K., Okumura, F. and \*Kamura, T. (2015) Proteolytic regulation of metabolic enzymes by E3 ubiquitin ligase complexes: lessons from yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 50, 489-502. doi: 10.3109/10409238.2015.1081869. 査読有
13. Masuda, Y., Takahashi, H. and \*Hatakeyama, S. (2015) TRIM29 regulates the p63-mediated pathway in cervical cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1853, 2296-2305. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.035. 査読有
14. Masuda, Y., Takahashi, H., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Saraf, A., Washburn, W.P., Florens, L., Conaway, R.C., Conaway, J.W. and \*Hatakeyama, S. (2015) TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. *Nature Commun.* 6, 7299. doi: 10.1038/ncomms8299. 査読有
15. Watanabe, M., Takahashi, H., Saeki, Y., Ozaki, T., Itoh, S., Suzuki, M., Mizushima, W., Tanaka, K. and \*Hatakeyama, S. (2015) The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR $\gamma$ . *eLIFE* 4, e05615. doi: 10.7554/eLife.05615. 査読有
16. Tsukiyama, T., Fukui, A., Terai, S., Fujioka, Y., Shinada, K., Takahashi, H., Yamaguchi, T.P., Ohba, Y. and \*Hatakeyama, S. (2015) Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2007-2023. doi: 10.1128/MCB.00159-15. 査読有
17. 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. (2015) MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. *Nature Commun.* 6, 5941. doi: 10.1038/ncomms6941. 査読有
18. \*Nakatsukasa, K., Kanada, A., Matsuzaki, M., Byrne, S.D., Okumura, F. and \*Kamura, T. (2014) The nutrient stress-induced small GTPase Rab5 contributes to the activation of vesicle trafficking and vacuolar activity. *J Biol Chem.* 289, 20970-8. doi: 10.1074/jbc.M114.548297. 査読有
19. Kanno, Y., Watanabe, M., Kimura, T., Nonomura, K., Tanaka, S. and \*Hatakeyama, S. (2014) TRIM29 as a novel prostate basal cell marker for diagnosis of prostate cancer. *Acta Histochem.* 116, 708-712. doi: 10.1016/j.acthis.2013.12.009. 査読有
20. \*Nakatsukasa, K., Brodsky, J.L. and \*Kamura, T. (2013) A stalled

retrotranslocation complex reveals physical linkage between substrate recognition and proteasomal degradation during ER associated degradation. *Mol. Biol. Cell* 24, 1765-1775. doi: 10.1091/mbc.E12-12-0907. 査読有

21. \*Okumura, F., Okumura, A.J., Uematsu, K., Hatakeyama, S., Zhang, D.E. and \*Kamura, T. (2013) Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *J. Biol. Chem.* 288, 2839-2847. doi: 10.1074/jbc.M112.401851. 査読有
22. \*Hatakeyama, S. (2012) Ubiquitin-mediated regulation of JAK-STAT signaling in embryonic stem cells. *JAK-STAT* 1, 168-175. doi: 10.4161/jkst.21560. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Shigetsugu Hatakeyama: Functions of TRIM family proteins in metabolism and carcinogenesis. International Symposium for New Aspects of the Ubiquitin Research, 2016 年 12 月 6 日、Kyoto
2. 畠山鎮次: TRIM ファミリーユビキチンリガーゼによる生体制御機構. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、ワークショップセッション: ユビキチンシステムが切り開く新たな生命現象) 2015 年 12 月 1-4 日、神戸
3. 中務 邦雄、嘉村 巧: F ボックスタンパク質 Ucc1 による代謝制御機構の解析. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会、ワークショップセッション: ユビキチンシステムが切り開く新たな生命現象) 2015 年 12 月 1-4 日、神戸
4. 中務邦雄、西村崇、嘉村巧: 複合体型 SCFYlr224w E3 リガーゼの新規基質 p40 の同定. 第 86 回日本生化学会大会(シンポジウムセッション: 拡大するユビキチンネオバイオロジーの可能性) 2013 年 9 月 12 日、横浜
5. 畠山鎮次: TRIM タンパク質の多彩な機能. 第 86 回日本生化学会大会(シンポジウムセッション: 拡大するユビキチンネオバイオロジーの可能性) 2013 年 9 月 12 日、横浜
6. Shigetsugu Hatakeyama: Regulation of cellular functions by TRIM proteins. The 35<sup>th</sup> Naito Conference: The Ubiquitin-Proteasome System: from Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles (Session B: Regulation of Ubiquitylation), 2013 年 7 月 9-12 日、Sapporo
7. Takumi Kamura: Functional analysis of budding yeast SCFYlr224w E3 ligase. The 35th Naito Conference: The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanism to Pathophysiological Roles 2013 年 7 月 9-12 日、Sapporo
8. Shigetsugu Hatakeyama: TRIM proteins and cancers. 第 71 回日本癌学会学術総会(セッション名: Autophagy, Proteostasis and Cancer Research オートファジー・プロテオスタシスとがん) 2012 年 9 月 19 日、札幌
9. 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、2012 年 9 月 28 日、東京

10. 嘉村巧: ユビキチンリガーゼによる選択的基質識別メカニズム. 「ユビキチンネオバイオロジー: 拡大するタンパク質制御システム」kick-off シンポジウム、2012 年 9 月 26 日、京都

〔図書〕(計 2 件)

1. Watanabe, M. and \*Hatakeyama, S. (2017) Ubiquitin-conjugating enzymes (E2s). *Advances in Medicine and Biology Vol 120*, Nova Science Publishers, New York. 査読有
2. 畠山鎮次: ユビキチン関連酵素を標的としたがん治療シーズの開発(清木元治編: 次世代がん戦略研究 がん基盤生物学 -革新的シーズ育成に向けて-、南山堂、東京) 288-293, 2013

〔その他〕

ホームページ

<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~2kamura/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

畠山 鎮次 (Shigetsugu Hatakeyama)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 70294973