

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04690

研究課題名(和文) TRIMファミリータンパク質によるシグナル伝達制御

研究課題名(英文) Regulation of signal transduction by TRIM family proteins

研究代表者

畠山 鎮次 (Hatakeyama, Shigetsugu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70294973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らの研究により、細胞内シグナル伝達制御におけるTRIMファミリーユビキチンリガーゼ群の重要性が明らかとなった。特に、細胞増殖や細胞分化の過程を制御するシグナル伝達系に、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示された。そこで本研究申請においては、網羅的ノックダウンスクリーニングやプロテオミクス的手法により、さまざまな細胞内シグナル系におけるユビキチン化を制御するTRIM型ユビキチンリガーゼを同定・解析した。さらには、siRNAライブラリーを用いたTRIMファミリー遺伝子の網羅的ノックダウンにより、代謝や免疫シグナルに関する候補遺伝子を同定し、その機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have shown the importance of TRIM family ubiquitin ligase in intracellular signal transduction. Especially, we showed that TRIM family ubiquitin ligase regulates signal transduction involved in cell proliferation and differentiation. Therefore, in this application, we identified and analyzed TRIM family ubiquitin ligases which regulates the ubiquitination in various intracellular signalling pathways. Furthermore, we identified and analyzed candidate genes regulating metabolism and immune signal by comprehensive knockdown of TRIM family genes using their siRNA library.

研究分野：医化学

キーワード：ユビキチン シグナル伝達 タンパク質分解 タンパク質修飾 転写

## 1. 研究開始当初の背景

細胞間で行われるシグナル伝達を介して、様々な細胞機能が変化することが知られている。多くのシグナル伝達は、リガンド分子が細胞膜受容体もしくは核内受容体(細胞内受容体)と結合することで始まり、多くの仲介分子を介して、最終的には関連する遺伝子の発現が誘導されることが多い。細胞内のシグナル伝達過程において、多くの関連タンパク質は化学修飾(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、その生理活性が調節されることが明らかになっている。がん研究でのシグナルで最も重要視されているがん抑制遺伝子 p53、細胞周期調節分子 p27、がん遺伝子 c-Myc などユビキチン化による制御が重要であることが示されており、申請者もこれらに対する制御酵素の同定について報告してきた。

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(図1参照:ユビキチン化反応)。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 600 遺伝子あることが推測されており、申請者が解析してきた 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(約 70 遺伝子)を形成していることが判明している。これまでに申請者はがん化や免疫反応のシグナル制御における TRIM タンパク質の役割を報告している。さらに申請者は、多くの転写因子(AR, RAR, Myc など)が関与するシグナル伝達を TRIM タンパク質が制御することを報告している。

## 2. 研究の目的

本申請では、各 TRIM タンパク質の機能を解明するだけでなく、さまざまなシグナル伝達系における TRIM タンパク質群の網羅的解析を遂行することで、TRIM ファミリーが制御する生命システムを解明した。

(1) siRNA ライブラリーを使った TRIM ファミリー遺伝子の網羅的ノックダウンによる機能スクリーニング: さまざまなシグナル伝達系の下流で活性化される遺伝子の転写活性化領域を含んだルシフェラーゼレポーター系を使用し、各 TRIM 遺伝子をノックダウンさせた状態でのシグナル反応性の変動を調べた。

(2) FLAG タグを付けた TRIM ファミリーの発現ベクターを細胞に導入し、サイトカイン、ホルモン(生理活性物質)を添加した後の結合タンパク質(基質候補)及び結合タンパク質のタンパク質翻訳後修飾状態を、質量分析計を利用して同定した。結合タンパク質

の修飾状態(ユビキチン化の他にリン酸化やアセチル化などを含む)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、生物学的機能変化を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) siRNA を使った TRIM ファミリー遺伝子の網羅的ノックダウンによる機能スクリーニング: ステロイドホルモン系(PPRE など)STAT、NF- $\kappa$ B などシグナルの検出に最適化されたルシフェラーゼレポーターアッセイ系は準備済である。siRNA ライブラリーを使用し、各 TRIM 遺伝子(約 70 遺伝子)をノックダウンさせた状態でルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、各シグナルへの影響を検討した。

(2) TRIM ファミリー結合タンパク質(基質タンパク質候補)の同定と翻訳後修飾解析(プロテオミクス解析): 細胞株を各種刺激を加えた後、FLAG タグ TRIM タンパク質をアフィニティー精製した。SDS-PAGE により、結合タンパク質を分離し、バンドとして確認できるものは MALDI-TOF/TOF を使用し同定する。また、TRIM タンパク質の結合タンパク質に起きている翻訳後修飾(主にユビキチン化)をプロテオミクス解析により同定した。

(3) TRIM タンパク質の構造生物学的解析: X線結晶構造解析及びNMRを使用し、TRIM タンパク質と基質タンパク質の関係を分子構造レベルで解明することで、ミクロなレベルでの酵素基質関係を明らかにした。

(4) TRIM タンパク質に関する生化学的及び細胞生物学的機能解析: RNAi によってノックダウンさせた細胞株を作製し、酵素-基質対応から推測される機能に対して検討を試みた。

(5) ヒト疾患組織での TRIM タンパク質の発現プロファイル: 抗体を使用し、ヒトの各種疾患組織を使用した免疫組織化学的解析もしくはウエスタン解析(新鮮標本がある場合)を行い、臓器別、悪性度別、及び進行度別で発現レベルを調査した。この実験により、疾患特異的バイオマーカーとしての価値を有するタンパク質であるかを判定した。

## 4. 研究成果

(1) 糖代謝に関与する RNF207

本研究において RNF207 が糖代謝に関与することを同定した。RNF207 は 635 アミノ酸からなるタンパク質であり、その遺伝子は第一染色体短腕に存在している。ドメイン構造としては、N 末端側から RING フィンガードメイン、B-box ドメイン、そして Coiled-Coil ドメインを有している。この構造は、TRIM

ファミリーと類似しており、RNF の中には TRIM ファミリーに分類されるものもある。これまでの QT 延長症候群におけるゲノム解析において、RNF207 遺伝子に single nucleotide polymorphism (SNP) が有意に多いと報告されている。まず、遺伝子発現プロファイルのデータベースを用いてさまざまな RNF タンパク質の発現状況を検索したところ、RNF207 が心臓に強発現していることが判明した。次にマウスの主要臓器より RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて臓器毎の発現を調べたところ、データベースから得られた結果と一致して、心臓で強発現が確認された。HEK293T 細胞、C2C12 細胞、ラット単離心筋細胞から RNF207 結合タンパク質を分離し、質量分析で解析したところ、VDAC1 が同定された。ただし、RNF207 を細胞に高発現させても、VDAC1 の半減期は変動しなかった。RNF207 の心筋細胞での機能を解析するために、内在性の RNF207 を small interfering RNA (siRNA) を用いてノックダウンしたところ、ATP 濃度および NADH/NAD<sup>+</sup> 比の有意な低下が認められた。また、メタボローム解析の結果を詳細に解析したところ、ピルビン酸脱水素酵素活性が低下していることを判明した。VDAC1 は、これまでに Ca 代謝に関与することが知られているので、今後、RNF207 により VDAC1 がどのように糖代謝に影響するかを明らかにすることが重要となる。

(2) TRIM39 による NF- $\kappa$ B 経路制御  
NF- $\kappa$ B 経路は、細胞増殖や免疫・炎症反応を制御する重要な細胞内シグナル経路である。本研究で、NF- $\kappa$ B 経路に影響をもたらす TRIM タンパク質の一つとして TRIM39 を同定した。TRIM39 は TRIM ファミリータンパク質の一つであり、RING ドメイン、B-box ドメイン、Coiled-Coil ドメインに加え、カルボキシル末端側に SPRY (Spla kinase and ryanodine receptor) ドメインを有する。TRIM39 の遺伝子は、ゲノム上でヒト 6 番染色体の MHC (major histocompatibility complex) Class I 領域に存在する。これまでに TRIM39 遺伝子座のエキソン内に位置する SNP が、ベッチェット病の罹患率に相関することが報告されている。

本研究において、TRIM ファミリー (TRIM39 を中心に) の生化学的および免疫学的検討を進めた。ヒト B 細胞 cDNA ライブラリーを用いて TRIM39 結合タンパク質のスクリーニングを行い、陽性クローンを得た。その一つの Cactin は炎症シグナルへの関与が報告されている遺伝子であったため、この遺伝子の解析を進めた。HEK293T 細胞で、FLAG-TRIM39 と Myc-Cactin が細胞内相互作用が確認できた。TRIM39 をノックダウンした細胞で、シクロヘキシミドを用いた細胞内タンパク質安定性実験を行ったところ、TRIM39 は Cactin タンパク質を安定化

する活性を有すると判明した。Cactin は NF- $\kappa$ B シグナルの抑制因子であることから、HEK293T 細胞を TNF $\alpha$  で刺激してその mRNA 量を測定したところ、Cactin の mRNA が TNF $\alpha$  刺激で増加することが判明した。TRIM39 が NF- $\kappa$ B シグナルの活性化に与える影響を、ルシフェラーゼアッセイにて評価した。RNAi によって TRIM39 をノックダウンしたあと、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TNF $\alpha$  刺激による NF- $\kappa$ B 活性の亢進が認められた。次に、TRIM39 が NF- $\kappa$ B シグナルの下流遺伝子に与える影響を確認するために、NF- $\kappa$ B の代表的な下流遺伝子である IL-6 と IL-8 の mRNA の発現量を確認したところ、TRIM39 ノックダウンで、TNF $\alpha$  刺激による IL-6 と IL-8 の mRNA の転写が促進されることが明らかとなった。以上より、TRIM39 は NF- $\kappa$ B を負に制御していると考えられた。

TRIM39 や Cactin は炎症性疾患の発症に関連している可能性があり、これらの分子の生化学的解析を進めることで、炎症性疾患の病態の解明、新規治療法の開発に結びつく可能性がある。

(3) TRIM29 の病理学的生化学的解析  
ウエスタンブロット法やリアルタイム PCR 法を使って、さまざまな細胞株の TRIM29 の発現を検討したところ、皮膚がんや子宮頸がんなどの扁平上皮細胞系列の細胞株に発現が高いことが判明した。細胞株の発現パターンとしては、多くが細胞質に発現していたが、HeLa 細胞においては核内発現が強いことが判明した。また、さまざまな皮膚がんに関して病理学的な解析を進めたところ、その分化度により発現変動が起きていることが判明したが、今後、症例数を増やして統計学的に解析することが重要と考えている。さらに、正常前立腺組織、前立腺がんおよび PIN を病理組織学的に解析したところ、正常前立腺では基底細胞に特的な発現が認められた。前立腺がんでは基底細胞が消失し、TRIM29 陽性細胞は消失 (減少) した。基底細胞層が破壊されていない PIN においては TRIM29 陽性細胞が存在しており、TRIM29 による免疫染色は前立腺がん と PIN を区別するための有用なバイオマーカーになることが推測された。

次に HeLa 細胞を使用して、FLAG タグ TRIM29 を発現する安定細胞株を樹立した。それを大量培養し、生化学的に核抽出液を分離し、その中から TRIM29 と結合するタンパク質を網羅的に同定したところ、DNA 修復関連タンパク質が多数同定された。免疫沈降法を使って確認したところ、実際にそれらの DNA 修復関連タンパク質と TRIM29 の結合が検出された。さらに TRIM29 の欠損変異体を作製し、DNA 修復タンパク質との結合部位を解析したところ、TRIM29 の C 末端側がその結合に重要であることが判明した。さら

に、TRIM29 をノックダウンした細胞では X 腺照射後の DNA 障害に対して、細胞死を起こしやすいことが判明した。

DNA 修復タンパク質の一つである MSH2/6 は DNA 結合することが知られている。TRIM29 は MSH2 と直接に結合し、DNA に相互作用できることが判明した。さらに、TRIM29 の N 末端側を介して、特定に修飾を受けたヒストンタンパク質と結合することも判明した。

さらに現在、TRIM29 の一部のドメインに関する構造決定が成功しており、これまで解明が進んだ結果との関係を調べている段階である。

また、TRIM29 の病理学的解析で、皮膚がんの分化度・悪性度に対して TRIM29 のバイオマーカーとしての有用性の可能性が示された。また、前立腺がんやトリプルネガティブタイプ乳がんにおいて TRIM29 がバイオマーカーとして使える可能性も示された。

以上、TRIM29 に分子生物学的機能解析から得られた情報を元に、TRIM29 の機能を阻害する化合物が得られた場合、それは抗がん剤として機能する可能性が高いと思われる。今後は、これらの情報を元に創薬研究を進めることは重要と思われる。

#### (4) まとめ

ヒトゲノムの解明により、ドメイン構造の検索によりユビキチンリガーゼ活性に關与するタンパク質は 300 以上の存在が示唆されている。その中でも約 70 遺伝子を占めるのが TRIM ファミリータンパク質である。これまでさまざまな疾患と TRIM タンパク質との関係が明らかにされているが、今回の研究成果よりさらに拡大することが想定され、今後もさらなる機能解析を進める必要がある。特に酵素活性及び基質との関係を生化学的に明らかにすることで、各種疾患(がんや免疫疾患等)に対する分子標的治療のシーズとして貢献する可能性があると思われる。

#### 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 17 件)

Sang, Y., Li, Y., Song, L., Alvarez, A.A., Zhang, W., Lv, D., Tang, J., Liu, F., Chang, Z., Hatakeyama, S., Hu, B., Cheng, S. and Feng, H, TRIM59 promotes gliomagenesis by inhibiting TC45 dephosphorylation of STAT3, *Cancer Res.* 査読有, 78, 1792-1804, 2018.  
DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-2774

Fujimoto, K., Kinoshita, M., Tanaka, H., Okuzaki, D., Shimada, Y., Kayama, H., Okumura, R., Furuta, Y.,

Narazaki, M., Tamura, A., Hatakeyama, S., Ikawa, M., Tsuchiya, K., Watanabe, M., Kumanogoh, A., Tsukita, S. and Takeda, K., Regulation of intestinal homeostasis by the ulcerative colitis-associated gene RNF186, *Mucosal Immunol.*, 査読有, 10, 2017, 446-459  
DOI:10.1038/mi.2016.58

Ibata, M., Iwasaki, J., Fujioka, Y., Nakagawa, K., Darmanin, S., Onozawa, M., Hashimoto, D., Ohba, Y., Hatakeyama, S., Teshima, T. and Kondo, T., A leukemogenic kinase, FIP1L1-PDGFR $\alpha$ , and a SUMO E3 ligase, PIAS1, form a positive-crosstalk via their enzymatic activities, *Cancer Sci.*, 査読有, 108, 200-207, 2017.  
DOI:10.1111/cas.13129

Hatakeyama, S.: TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity and Carcinogenesis, *Trends Biochem. Sci.*, 査読有, 42, 2017, 297-311, 2017  
DOI:10.1016/j.tibs.2017.01.002

Watanabe, M. and Hatakeyama, S., TRIM proteins and diseases, *J. Biochem.*, 査読有, 161, 2017, 135-144  
DOI:10.1093/jb/mvw087

Hatakeyama, S., Early evidence for the role of TRIM29 in multiple cancer models., *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 査読有, 20,, 2016, 767-770  
DOI: 10.1517/14728222.2016.1148687

Suzuki, M., Watanabe, M., Nakamaru, Y., Takagi, D., Takahashi, H., Fukuda, S. and Hatakeyama, S., TRIM39 negatively regulates the NF $\kappa$ B-mediated signaling pathway through stabilization of Cactin, *Cell. Mol. Life Sci.*, 査読有, 73, 2016, 1085-1101  
DOI:10.1007/s00018-015-2040-x

Kanno, Y., Mitsui, T., Kitta, T., Moriya, K., Tsukiyama, T., Hatakeyama, S., Nonomura, K., The Inflammatory Cytokine IL-1 $\beta$  is Involved in Bladder Remodeling After Bladder Outlet Obstruction in Mice., *Neurouro. Urodyn.*, 査読有, 35, 2016, 377-381  
DOI:10.1002/nau.22721

Fujieda, Y., Amengual, O., Matsumoto, M., Kuroki, K., Takahashi, H., Kono, M., Kurita, T., Otomo, K., Kato, M., Oku, K., Bohgaki, T., Horita, T., Yasuda, S., Maenaka, K., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I. and Atsumi, T., Ribophorin II is involved in the tissue factor expression mediated by phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on monocytes, *Rheumatology*, 査読有, 55, 2016, 1117-1126  
DOI: 10.1093/rheumatology/kew005

Otomo, K., Amengual, O., Fujieda, Y., Nakagawa, H., Kato, M., Oku, K., Horita, T., Yasuda, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S., Koike, T. and Atsumi, T., Role of apolipoprotein B100 and oxidized low-density lipoprotein in the monocyte tissue factor induction mediated by anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies, *Lupus*, 査読有, 25, 1288-1298, 2016.  
DOI:10.1177/0961203316638165

Anwar, D., Takahashi, H., Watanabe, M., Suzuki, M., Fukuda, S. and Hatakeyama, S.: p53 represses the transcription of snRNA genes by preventing the formation of little elongation complex, *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.*, 査読有, 1859, 2016, 975-982  
DOI:10.1016/j.bbagr.2016.06.001

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.: The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 査読有, 100, 2016, 43-53  
DOI:10.1016/j.yjmcc.2016.09.013

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, 2015, 1280-1291  
DOI: 10.1038/onc.2014.68

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, 35, 2015, 2007-2023  
DOI: 10.1128/MCB.00159-15

Watanabe, M., Takahashi, H., Saeki, Y., Ozaki, T., Itoh, S., Suzuki, M., Mizushima, W., Tanaka, K. and Hatakeyama, S., The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR $\gamma$ , *eLife*, 査読有, 4, 2015, e05615, 2015  
DOI:10.7554/eLife.05615

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., TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin, *Nature Commun.*, 査読有, 6, 2015, 7299  
DOI:10.1038/ncomms8299

Masuda, Y., Takahashi, H. and Hatakeyama, S., TRIM29 regulates the p63-mediated pathway in cervical cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, 査読有, 1853, 2015, 2296-2305  
DOI:10.1016/j.bbamcr.2015.05.035

〔学会発表〕(計 5件)

畠山鎮次, TRIM タンパク質の機能と病理学的解析、第1回コビキチン研究会、2018

畠山鎮次, TRIMファミリータンパク質が関与する疾患、第24回分子皮膚科学フォーラム、2017

畠山鎮次, TRIMファミリータンパク質による細胞機能制御、GU Cancer Forum 2017、2017

Shigetsugu Hatakeyama, Functions of TRIM family proteins in metabolism and carcinogenesis, International Symposium for New Aspects of the Ubiquitin Research, 2016

畠山鎮次, TRIMファミリーコビキチンリガーゼによる生体制御機構、日本生化学

学会、2015

〔図書〕(計 1 件)

Watanabe, M. and Hatakeyama, S.,  
Nova Science Publishers,  
Ubiquitin-conjugating enzymes (E2s):  
Advances in Medicine and Biology Vol  
120, 2017, 23

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕なし  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

畠山 鎮次 (HATAKEYAMA,  
Shigetsugu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70294973

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

高橋 秀尚 (TAKAHASHI, Hidehisa)

横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20399819

渡部 昌 (WATANABE, Masashi)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：10632424

(4)研究協力者

なし