

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860201

研究課題名(和文)直鎖状ユビキチン化による脂質代謝制御転写因子PPARガンマー活性化制御機構の解明

研究課題名(英文)The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPARgamma

研究代表者

渡部 昌(watanabe, masashi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10632424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞分化は転写因子群によって厳密に制御されている。分化誘導刺激を行うと、まず早期転写因子群が誘導され、標的遺伝子上で早期エンハンソームが形成される。これは後に後期転写因子群に引き継がれ、脂肪細胞の成熟に必要な遺伝子の発現が誘導されることで分化が進行する。PPARガンマーは脂肪細胞分化のマスター遺伝子であり、後期転写因子の1つである。本研究では、新規ユビキチンリガーゼTRIM23がPPARガンマータンパク質の非定型ユビキチン化を促進し、安定化させることで脂肪細胞分化を円滑に進行させる機能を持っていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Adipocyte differentiation is a tightly controlled process regulated by complex transcriptional activators. Multiple adipogenic signals activate early adipogenic activators and facilitate the transient formation of early enhanceosomes at target genes. These enhancer regions are subsequently inherited by the late adipogenic activators, which coordinate the formation of late enhanceosomes. PPARgamma is one of the late adipogenic activators and is considered the master regulator of adipogenesis. We showed that a novel ubiquitin E3 ligase, tripartite motif protein 23 (TRIM23), stabilizes PPARgamma protein and mediates atypical polyubiquitin conjugation. TRIM23 knockdown caused a marked decrease in PPARgamma protein abundance during preadipocyte differentiation, resulting in a severe defect in late adipogenic differentiation, whereas it did not affect the formation of early enhanceosomes. This adipogenic defect is rescued by ectopic expression of PPARgamma.

研究分野：医化学一般

キーワード：ユビキチン PPARガンマー ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) PPAR $\gamma$  の機能とユビキチン化：ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 PPAR $\gamma$  は、脂肪細胞分化や脂質代謝、骨代謝、血管新生などを制御する核内受容体型の転写因子である。PPAR $\gamma$  は RXR $\alpha$  とヘテロダイマーを形成して、DR-1 タイプの認識配列である PPRE 配列に結合し、リガンド依存性に転写活性化を起こす。核内受容体をはじめとした転写因子では、ユビキチン・プロテアソーム系による制御が転写活性化に重要な過程であることが報告されている。PPAR $\gamma$  も同様の制御を受け、ポリユビキチン鎖の形成を受けていることがわかっているが、PPAR $\gamma$  にユビキチンを直接付加するユビキチンリガーゼは未だ同定されていなかった。

(2) PPAR $\gamma$  関連ユビキチン化酵素の同定の試み：本研究者は、ルシフェラーゼアッセイを用いたスクリーニングを行い、PPAR $\gamma$  の転写活性を正に制御するユビキチンリガーゼを検索したところ、TRIM23 を同定した。結合実験とユビキチン化アッセイを行ったところ、TRIM23 は PPAR $\gamma$  と結合し、ユビキチン化、特に直鎖状ユビキチン鎖の形成を促進した。さらに TRIM23 をノックダウンした白色脂肪前駆細胞 3T3-L1 では脂肪細胞への分化成熟が抑制されていたため、TRIM23 は脂肪細胞分化において必須の働きを担っているものと考えられた。

2. 研究の目的

PPAR $\gamma$  は脂肪細胞分化・脂質代謝などを制御する核内受容体型転写因子であり、そのリガンドは抗糖尿病作用を有する。PPAR $\gamma$  はユビキチン化修飾を受けることで、その転写活性が正に制御されるが、修飾酵素であるユビキチンリガーゼは未だ同定されていない。本研究者はルシフェラーゼアッセイを用いたスクリーニングを行い、PPAR $\gamma$  の転写活性を正に制御し、細胞内及び試験管内で PPAR $\gamma$  の直鎖状ポリユビキチン化を促進するユビキチンリガーゼとして、TRIM23 を同定している。本研究は、TRIM23 による PPAR $\gamma$  転写活性化の詳細なメカニズムの解明を行い、糖尿病治療への研究基盤の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) TRIM23 による脂肪細胞分化制御メカニズムの詳細な検討。3T3-L1 細胞はホルモンカクテルの刺激によりまず C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  が誘導され、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  が PPAR $\gamma$  プロモーター上へリクルートされ、早期エンハンソームを形成し PPAR $\gamma$  の弱い発現を誘導する。誘導された PPAR $\gamma$  は C/EBP $\alpha$  と共に自身のプロモーター上へリクルートされ、後期エンハンソームを形成し、PPAR $\gamma$  を強力に発現誘導する。誘導された PPAR $\gamma$  は成熟脂肪細胞を特徴づける標的遺伝子の発現を誘導し、脂肪細胞の分化が完了

する。定量的 PCR 法、ウエスタンブロット法、ChIP-qPCR 法、FAIRE 法などを用いて、これらのどの過程で TRIM23 が機能しているのかを検討した。

(2) TRIM23 による PPAR $\gamma$  転写活性化の詳細な検討を、ルシフェラーゼアッセイを用いて行った。

(3) TRIM23 による PPAR $\gamma$  タンパク質の安定性の変化を、プロテアソーム阻害剤やタンパク質合成阻害剤を用いて検討した。

(4) TRIM23 による PPAR $\gamma$  ユビキチン化の詳細な検討。本研究者は TRIM23 が細胞内及び試験管内で PPAR $\gamma$  の直鎖状ポリユビキチン化を促進することを同定しているが、他のポリユビキチン鎖を形成する可能性について、特定のポリユビキチン鎖のみ形成可能な変異ユビキチンを用いてユビキチン化アッセイを行い検討した。

(5) TRIM23 によって修飾を受けた PPAR $\gamma$  が、プロテアソームによる認識に与える影響をプロテアソームのユビキチン受容体である S5a/Rpn10 を用いたプルダウンアッセイによって検討した。

4. 研究成果

(1) TRIM23 は脂肪細胞分化プログラムの早期過程には必須ではないが、後期過程において必須であることを明らかにした。

(2) 当初 TRIM23 はルシフェラーゼアッセイによって PPAR $\gamma$  の転写活性を正に制御する遺伝子として同定した。しかし、TRIM23 導入時のルシフェラーゼ活性、ルシフェラーゼタンパク質量、ルシフェラーゼ mRNA を詳細に検討した結果、ルシフェラーゼ活性とタンパク質量は増加していたが、ルシフェラーゼ mRNA 量は増加していなかった。また、TRIM23 はルシフェラーゼタンパク質の安定性に対して影響を与えなかったことから、ルシフェラーゼアッセイによる TRIM23 による PPAR $\gamma$  の転写活性の促進は、ルシフェラーゼの翻訳を促進する活性を持つための人為的な結果であることが明らかとなった。一方、TRIM23 は脂肪細胞分化に対しては必須の役割を持っていたことから (図 1 参照)、

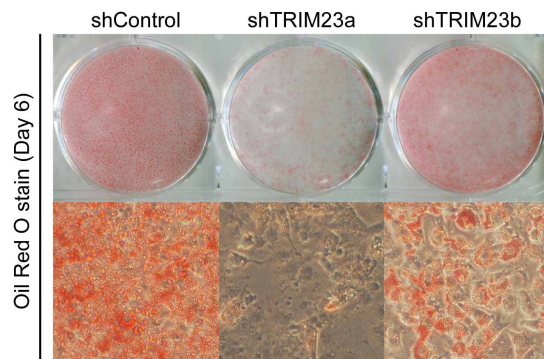


図 1 参照: TRIM23 は脂肪細胞分化に必須である。TRIM23 ノックダウンした脂肪前駆細胞を分化誘導したところ、成熟分化が阻害された。

他のメカニズムの可能性を検討したところ下記の結果を得た。

(3) TRIM23 は脂肪細胞分化プログラム後期過程でマスター遺伝子として働く PPAR $\gamma$  タンパク質を安定化することを明らかにした。(図2参照)

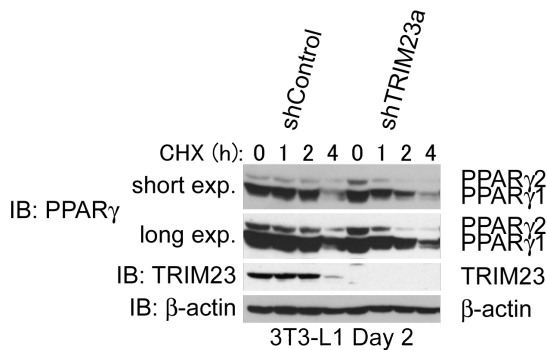


図2参照: TRIM23 は PPAR $\gamma$  タンパク質を安定化する。タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)を用いて PPAR $\gamma$  タンパク質の分解実験を行ったところ、TRIM23 ノックダウンにより PPAR $\gamma$  タンパク質の分解速度が上昇した。

- (4) TRIM23 は PPAR $\gamma$  をユビキチン化し、特に直鎖状ポリユビキチン化と K27 ポリユビキチン化を促進することを明らかにした。  
 (5) TRIM23 によって修飾を受けた PPAR $\gamma$  は、プロテアソームによる認識を回避し分解を受けにくくなることを明らかにした。  
 (6) 以上より、TRIM23 は PPAR $\gamma$  タンパク質を直鎖状および K27 ポリユビキチン化修飾し、安定化を促すことで、脂肪細胞分化プログラム後期を円滑に進行させる役割を担っているものと思われる。(図3参照)

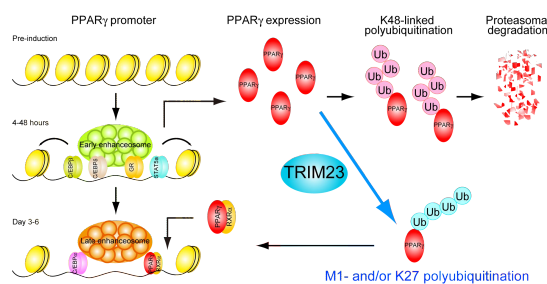


図3参照: TRIM23 は PPAR $\gamma$  タンパク質を直鎖状および K27 ポリユビキチン化修飾し、安定化を促すことで、脂肪細胞分化プログラム後期を円滑に進行させる。

## 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4件)

Watanabe M, Takahashi H, Saeki Y, Ozaki T, Itoh S, Suzuki M, Mizushima W, Tanaka K, Hatakeyama S.: The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR $\gamma$ . *Elife.*, 査

読有, 2015 Apr 23;4.

Doi: 10.7554/eLife.05615

Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, 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

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 DNAJB6 mutation. *Clin. Neurol. Neurosur.*, 査読有, 127, 10-12, 2014.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2014.09.013>

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

[学会発表](計5件)

Masashi Watanabe: The ubiquitin E3 ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR $\gamma$ . Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on the ubiquitin family, April 21-25, 2015, Cold Spring Harbor, New York, USA

Masashi Watanabe, Hidehisa Takahashi, Shigetsugu Hatakeyama: TRIM23 is required for expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and for subsequent adipocyte differentiation. 日本分子生物学会, 2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Masashi Watanabe: Tripartite motif protein 23 regulates adipocyte differentiation via stabilizing PPAR $\gamma$ . Symposium for young ubiquitin researchers in Japan "New Era in the Ubiquitin Research", 2014年11月11日、国際高等研究所(京都府・木津川市)

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、日本生化学会、2014年10月18日、国立京都国際会館(京都府京都市)

Masashi Watanabe: Involvement of linear polyubiquitylation in PPAR

transcriptional activity. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on the ubiquitin family, May 14-18, 2013, Cold Spring Harbor, New York, USA

〔図書〕(計0件)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 昌 (WATANABE, Masashi)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10632424

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：