

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32714

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870908

研究課題名(和文) TRIM/RBCC E3リガーゼを介したインスリンシグナル新規制御機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of novel insulin signal via TRIM/RBCC E3 ligase

研究代表者

井上 英樹 (Inoue, Hideki)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・准教授

研究者番号：20550156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：フォークヘッド型転写因子DAF-16/FOXO1はインスリンシグナルの中心的な制御因子である。線虫や哺乳動物において寿命制御、細胞増殖や恒常性の維持などに寄与しているが、DAF-16/FOXO1制御の全体像が完全に分かったわけではなかった。我々はTRIM/RBCC E3リガーゼであるNHL-1/TRIM3がDAF-16/FOXOを安定化することでDAF-16/FOXO標的遺伝子の制御により寿命延長や細胞増殖抑制等をもたらすことを明らかにした。さらに酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、ユビキチン化に関与するE1およびE2酵素等を発見し、種横断的なインスリンシグナル新規制御機構を見出した。

研究成果の概要(英文)：The forkhead transcription factor, DAF-16/FOXO, is a central regulator of the insulin signaling. DAF-16/FOXO proteins are indispensable for many cellular and biological processes such as lifespan regulation, proliferation and homeostasis. However, the entire molecular mechanisms involved in regulating DAF-16/FOXO transcriptional activation remain undefined. We found that NHL-1/TRIM3, TRIM/RBCC E3 ligase, positively regulates DAF-16/FOXO activity via stabilizing these proteins. NHL-1 positively regulates longevity, whereas TRIM3 increases oxidative stress resistance and suppresses cell proliferation. Moreover, we found some regulators including E1 and E2 enzymes by yeast two hybrid screening. These results delineate that the conserved NHL-1/TRIM3 regulates insulin/IGF signaling.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：インスリンシグナル 寿命制御 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

インスリンシグナル伝達機構は進化的に保存されたシグナル伝達経路である。インスリンがリガンドとしてインスリン受容体に結合すると、細胞質内で PI3K/AKT 経路が活性化された結果フォークヘッド型転写因子 FOXO が核外移行し、標的遺伝子群の発現調節が行われる。インスリンシグナルは線虫においては寿命制御等に関与することが知られており、哺乳動物においてはグルコース代謝や、細胞分化など、多彩な生理的役割を担うことが報告されている。ヒトにおいてインスリンシグナルの異常は糖尿病をはじめとした様々なメタボリックシンドロームの原因となっているほか、老化や癌の発生にも関与している。FOXO 活性の上昇は線虫等のモデル動物を用いた研究により寿命延長に作用するほか、細胞周期やアポトーシスの制御を介して癌抑制シグナルとして機能することが知られている (Zhang, Y et al. *Cancer Biol. Ther.* 12:253-159(2011), Kloet, D. E. et al. *Biochem. Biophys. Acta.* 1813:1926-1937(2011))。このような FOXO が持つ多様な生理的機構の制御には、細胞内での FOXO タンパク質の発現量や局在などの緻密な制御が必要である。これまでに、脱アセチル化酵素 SIRT による FOXO タンパク質の脱アセチル化による活性制御について報告されているほか、ユビキチンリガーゼ Skp2 が FOXO1 の分解を介した腫瘍抑制能を阻害することが報告されている (Wang, F. et al. *Oncogene* 31:1546-1557(2012))。しかしながら、FOXO を介したインスリンシグナル制御機構の全体像は十分に明らかになっていない。このため、インスリンシグナル伝達機構の解明はメタボリックシンドロームや癌など様々な疾患の病態解明と治療法の発見に貢献すると考えられ、そのシグナル伝達機構の全容解明が強く期待されている。

種々の遺伝病やがん、ウイルス感染に関与することが知られている TRIM/RBCC (Tripartite motif/RING Box Coiled-coil) タンパク質は、N 末端側に RING ドメインや B-box、C 末端側にタンパク質結合モチーフを持つ E3 リガーゼとして知られている。TRIM/RBCC E3 リガーゼは基質タンパク質のリジン残基のユビキチン化による基質タンパク質分解誘導のほか、SUMO 化や Nedd 化等の修飾により基質タンパク質の発現量および細胞内局在を制御することも報告されており、細胞内タンパク質の多様な制御に関与していると考えられている。TRIM/RBCC E3 リガーゼは生物種間で広く保存されており、線虫 *C. elegans* で 10 遺伝子程度、哺乳動物では 70 遺伝子以上存在すると報告されている。これまでに TRIM/RBCC タンパク質はレトロウイルスのほか病原微生物に対する感染防御に関与することが報告されている (Ozato, K et al. *Nature rev. Immunol.* 8: 849-860 (2008))。そのほか、TRIM/RBCC E3 リガーゼはアポトーシス、細胞周期、細胞分化など多彩な制御を行っているため、これらをコードする遺伝子の変異は発癌の原因となることが知られている (Hatakeyama, S *Nature Rev. Cancer* 11:792-804(2011))。しかしながらその基質、および生理的役割については未知の部分が多く、TRIM/RBCC E3 リガーゼが関与するシグナル伝達制御機構の全容は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が NHL-1 遺伝子の変異系統 (*nhl-1(gk15)*) がインスリンシグナルの中心的な転写因子 DAF-16 依存的に寿命延長を行うこと、また、NHL-1 と DAF-16 が *in vitro* で相互作用するという知見に基づいている。NHL-1 のアミノ酸配列解析からヒトにおいて最もよく一致した E3 リガーゼである TRIM3 と FOXO1 の関係を調べた結果、TRIM3 と FOXO1

が相互作用することを見出した。このことから進化的に保存された TRIM/RBCC E3 リガーゼ NHL-1/TRIM3 による DAF-16/FOXO の新規制御機構があると考え、線虫と哺乳動物を用いてこれを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

最初に NHL-1 が DAF-16 タンパク質を安定化する分子的なメカニズムを明らかにする。これとともに NHL-1 が DAF-16 を安定化する機構に関する新規因子を単離・同定し、NHL-1 および DAF-16 との関係を解析する。続いて哺乳動物において TRIM3 による FOXO1 の制御機構を明らかにするとともにインスリンシグナルとの関係性を解析する。さらに細胞レベルでの TRIM3 の役割を明らかにするとともにマウスを用いて TRIM3 トランスジェニックマウスの作出および in vivo RNAi を行い、個体レベルでの働きを明らかにする。最終的にメタボリックシンドロームの発症や発癌に関与する新しい分子機構の解明を目指す。

4. 研究成果

最初に、E3 リガーゼ NHL-1 と DAF-16 との関係の解析について in vitro ユビキチン化アッセイによって NHL-1 による DAF-16 ユビキチン化の有無について解析した。その結果、NHL-1 は DAF-16 を直接ユビキチン化しないことが示唆された。NHL-1 の共発現が in vitro、in vivo それぞれにおいて DAF-16 のポリユビキチン化を抑制することを確認したため、NHL-1 は間接的に DAF-16 のユビキチン化を抑制することが考えられる。

続いて、NHL-1 と相互作用する因子の解析について解析を行った。GST プルダウンアッセイに代え、線虫 cDNA ライブラリを用いた Yeast Two Hybrid スクリーニングによって NHL-1 と相互作用する因子を探索した。NHL-1 相互作用因子を得るために Yeast Two Hybrid

スクリーニングを行い、約 20 万クローンから 55 の独立したポジティブクローンを単離し、28 の候補遺伝子を同定した (Table 1)。

Table 1. Summary of yeast two hybrid screening

| Identity | Occurrence | function | human ortholog |
|----------|------------|--|-------------------------------|
| ZK930.2 | 2 | C4H2 zinc finger | ZC4H2 |
| LNTL-1 | 1 | encodes a novel protein, conserved amongst nematodes | - |
| F4252.9 | 5 | Actin | Actin |
| RLA-0 | 1 | ribosomal protein large subunit | RPLP0 |
| GTA-1 | 1 | Gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase; involved in the 4-aminobutyrate and glutamate degradation pathways | GABAT |
| T19D12.6 | 1 | laminin | LAMB3, EGFLAM |
| T11B7.1 | 1 | uncharacterized | - |
| TBA-1 | 1 | α -tubulin | α -tubulin |
| ZK632.4 | 1 | phosphomannose isomerase | Mannose-6-phosphate isomerase |
| FLH-1 | 4 | FLYWCH zinc finger transcription factor | - |
| ZK1025.3 | 1 | uncharacterized | - |
| RPL-2 | 1 | ribosome subunit L8 | 60S ribosomal protein L8 |
| UNC-15 | 1 | paramyosin | Myosin-7 |
| M01F1.4 | 1 | transmembrane protein | TMEM245 |
| ZC434.8 | 1 | creatine kinase | CKB(creatine kinase B) |
| T05F1.2 | 1 | uncharacterized | - |
| MIG-5 | 1 | cell migration; <i>C. elegans</i> Dishevelled homologs; as part of both canonical and non-canonical Wnt signaling pathways | Dvl3 |
| UNC-96 | 1 | a novel protein with no recognizable domains; involved in muscle cell structure | - |
| UBA-5 | 1 | E1 ubiquitin ligase | UBA5 |
| UBC-25 | 1 | E2 ubiquitin ligase | UBE2O2 |
| ASP-6 | 1 | aspartic protease | CTSE(Cathepsin E) |
| ASP-10 | 1 | aspartic-type endopeptidase | CTSD(Cathepsin D) |
| UNC-54 | 1 | muscle myosin class II heavy chain | Myosin-3 |
| COL-166 | 2 | Collagen | MARCO |
| COL-167 | 1 | Collagen | MARCO |
| COL-168 | 2 | Collagen | MARCO |
| COL-170 | 1 | Collagen | MARCO |
| COL-180 | 1 | Collagen | MARCO |

このうち、転写因子 FLH-1、E1 および E2 ユビキチン化酵素、アスパラギン酸プロテアーゼ ASP-10 について着目し、各遺伝子のクローニングおよび機能解析を行った。E1 および E2 ユビキチン化酵素、ASP-10 については哺乳動物まで保存されているため、線虫および哺乳動物の系を用いて解析を行った。FLH-1 については NHL-1 と in vitro でタンパク質の相互作用を確認するとともに FLH-1 がインスリンシグナルと遺伝学的に相互作用する結果が得られており、引き続き解析を進める。線虫および哺乳動物それぞれの E1 および E2 ユビキチン化酵素についてクローニングを行い、NHL-1/TRIM3 ユビキチン化機構とその基質について解析を行う。アスパラギン酸プロテアーゼ ASP-10 については、その哺乳類ホモログ、カセプシン E (CTSE) をクローニングし、TRIM3 との関係について解析を行った結果、CTSE が TRIM3 を in vitro の系で切断した (図 1)。

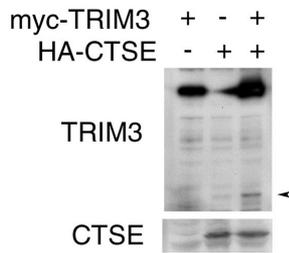


図 1 : TRIM3 は CTSE によって切断される

この結果から、CTSE が NHL-1/TRIM3 活性化機構に重要な役割を果たすことが強く示唆された。また、アスパラギン酸プロテアーゼが TRIM3 を切断する。NHL-1 の変異アレル gk15 は寿命延長の表現型を示す。gk15 は NHL-1 タンパク質の C 末端側が変異によって翻訳されない、N 末端側だけの NHL-1 タンパク質を産生する。NHL-1 はタンパク質相互作用に参与する NHL リピートをその C 末端側に保有しており、TRIM3 も同様である。通常、NHL-1/TRIM3 タンパク質はそれらの C 末端側が他のタンパク質と結合することで活性が抑制されているが、CTSE によって切断を受け、N 末端側が活性 NHL-1/TRIM3 タンパク質として機能するかもしれない。

さらに、TRIM3 による FOXO1 の制御機構について、哺乳動物で保存されている NHL-1 ホモログ TRIM3 と、DAF-16 ホモログ FOXO1 の関係について生化学的解析を行った。TRIM3 の過剰発現およびノックダウン実験の結果、哺乳動物において TRIM3 の発現は FOXO1 タンパク質の増加および安定化に寄与することを見出した。さらに、TRIM3 の発現により FOXO1 のポリユビキチン化の抑制が確認され、TRIM3 は FOXO1 の分解を抑制することを見出した(図 2)。この分解抑制は FOXO をポリユビキチン化する Skp2 等の E3 ユビキチンリガーゼとの競合による可能性もある。

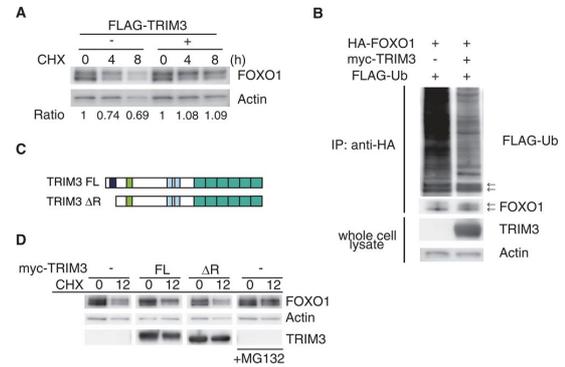


図 2 : TRIM3 は FOXO1 タンパク質の安定化を促進し、ポリユビキチン化を抑制する

さらに、これらの活性は TRIM3 の E3 リガーゼ活性に依存することを見出した(図 3)。

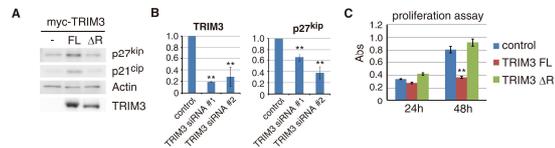


図 3 : TRIM3 は p21cip および p27kip の発現を促進し、細胞増殖を抑制する

また、TRIM3 の生理的役割について哺乳動物培養細胞を用いて解析を行った結果、TRIM3 の発現が細胞増殖抑制とストレス耐性の増加を引き起こすこと、TRIM3 が p21 や p27 など細胞周期抑制遺伝子及び FOXO1 依存的に MnSOD や GADD45 等抗ストレス遺伝子の転写を促進することを見出した(図 4)。

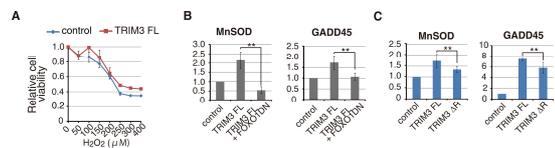


図 4 : TRIM3 はストレス応答遺伝子の発現を通してストレス耐性を上昇させる

これまでのスクリーニングで得られた 28 の候補遺伝子のうち、ユビキチンシステムに参与すると考えられる E1 ユビキチン活性化酵素である UBA5、E2 ユビキチン結合酵素である UBE2Q2 をクローニングし、TRIM3 の E3 リガーゼ活性と FOXO タンパク質の関係を調

べるため哺乳動物培養細胞を用いて解析を行った。その結果、FOXO タンパク質のうち FOXO1 および FOXO3 へのユビキチン化は見られず、FOXO4 にモノユビキチン化が誘導された。この結果から、ユビキチン酵素群 UBA5、UBE2Q2 および TRIM3 は FOXO4 のモノユビキチン化に関与すると考えられる。一方、これらの酵素は FOXO1 や FOXO3 とは結合するが直接の基質としないことが分かった。このため、TRIM3 による FOXO1 および FOXO3 タンパク質の安定化は別の仕組みによって生じることが示唆された(図 5)。

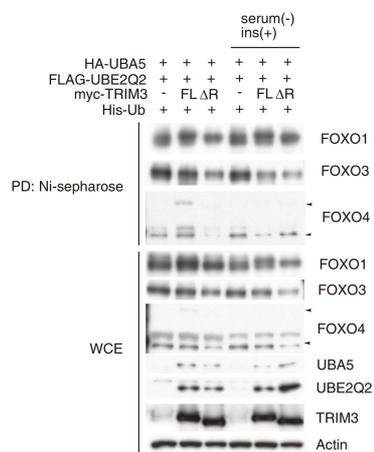


図 5: 各 FOXO タンパク質と TRIM3 によるモノユビキチン化

スクリーニングによって得られた他の候補遺伝子のうち、Dishevelled(Dvl3)についてもクローニングし、哺乳動物培養細胞を用いて TRIM3 との関係とインスリンシグナルへの関与を生化学的手法によって調べた。その結果、Dvl3 は TRIM3 と内在性レベルで相互作用するが、インスリンシグナルには影響を与えていなかった。また、ユビキチン酵素群 UBA5、UBE2Q2 および TRIM3 と Dvl3 を発現させ、これらの基質として働くかを調べた結果、Dvl3 がポリユビキチン化を受けていた。この結果から、本研究で得られた UBA5、UBE2Q2 および TRIM3 からなるユビキチン化酵素群は基質に応じてモノ/ポリユビキチン化を使い

分けていることが予想された(図 6)。

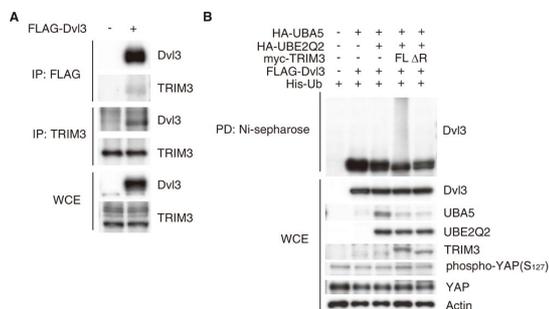


図 6: Dvl3 は TRIM3 によってポリユビキチン化される

以上の結果から、線虫および哺乳動物を用いた本研究により、E3 ユビキチンリガーゼ NHL-1/TRIM3 が FOXO 転写因子 DAF-16/FOXO1 と相互作用し、ユビキチン化を伴わない機構によって DAF-16/FOXO1 の分解を抑制すると考えられる。これによって DAF-16/FOXO1 は細胞内での活性を維持しやすくなり、結果として細胞周期やストレス応答などに関与する遺伝子群の転写に影響を与えられ。現在、これらの結果について学術誌への投稿を進めている。

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 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

The conserved TRIM/RBCC E3 ligase, NHL-1/TRIM3, regulates insulin/IGF signaling by stabilizing DAF-16/FOXO proteins. Hideki Inoue, Tomonori Kakura, Atsushi Takeshima and Toshiyuki Hori 第 72 回日本癌学会学術総会(2013、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))

TRIM3-LATS2 相互作用を介する Hippo 経路の制御機構 大島遥香、前田木実、渡辺大悟、道上康平、竹島淳史、香座知典、井上英樹、堀利行 第 37 回日本分子生物学会年会(2014、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))

The conserved TRIM/RBCC E3 ligase,

NHL-1/TRIM3 regulates lifespan and cell proliferation via stabilization of DAF-16/FOXO1 Hideki Inoue,

Tomonori Kakura, Atsushi Takeshima and Toshiyuki Hori 第 37 回日本分子生物学会年会(2014、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))

Identification and functional analysis of TRIM/RBCC E3 ligase, NHL-1/TRIM3, interacting proteins Hideki Inoue and Toshiyuki Hori 第 74 回日本癌学会学術総会(2015、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))

Ankrd17 interacts with LATS2 and regulates YAP-dependent gene expression Yukihiro Deguchi, Daigo Watanabe, Tomonori Kakura, Hideki Inoue, Toshiyuki Hori 第 74 回日本癌学会学術総会(2015、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 英樹 (INOUE HIDEKI)
神奈川工科大学・応用バイオ科学部・准教授
研究者番号：20550156

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

堀 利行 (HORI TOSHIYUKI)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：70243102