

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390087

研究課題名（和文） TRIM 型ユビキチンリガーゼ介在性癌化制御の網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of the regulation of carcinogenesis through TRIM type ubiquitin ligases

研究代表者

島山 鎮次（HATAKEYAMA SHIGETSUGU）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70294973

研究成果の概要（和文）：

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。TRIM ファミリータンパク質のいくつかはユビキチンリガーゼ E3 として機能することが判明しており、ヒト及びマウスの遺伝子に70以上存在することが推測されている。本研究申請では、TRIM ファミリータンパク質と癌化との関係に焦点を当て、解析を進めた。

研究成果の概要（英文）： Ubiquitination is one of the posttranslational modifications used by eukaryotic cells, and the ubiquitin-mediated proteolytic pathway plays a crucial role in the elimination of short-lived regulatory proteins. Members of the family of tripartite motif (TRIM)-containing proteins are defined as E3 ubiquitin ligases. There are now more than 70 known TRIM proteins in humans and mice. In this study, we analyzed the relationship between TRIM proteins and carcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 5,700,000  | 1,710,000 | 7,410,000  |
| 2010年度 | 3,500,000  | 1,050,000 | 4,550,000  |
| 2011年度 | 5,200,000  | 1,560,000 | 6,760,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

多くの細胞質・核質に存在するタンパク質の分解にユビキチン-プロテアソーム系が関与している。ユビキチンは ATP 依存性に E1(ユビキチン活性化酵素)のシステイン残基と結合した後、E1 から E2(ユビキチン結合酵素)に転移され、E3(ユビキチンリガーゼ)によ

って認識される標的タンパク質のリジン側鎖のε-アミノ基にイソペプチド結合し、その後ユビキチン化された多くのタンパク質はプロテアソームにより分解される。したがって、標的タンパク質のユビキチン化に必要な酵素群の中で、特にユビキチンリガーゼ E3 は標

的タンパク質を認識し、最終的にユビキチンを付加する重要な酵素サブユニットである。この分解系により、細胞内シグナル伝達分子や癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物や転写因子などの発現量は厳密に調節されている。最近、RING ドメインを有するファミリータンパク質群として、TRIM ファミリータンパク質の存在が見出され、さまざまな疾患との関係が明らかになりつつある。現在までのところ、順行遺伝学的解析により、TRIM タンパク質はさまざまな種類の癌や白血病に関連していることが近年明らかになってきている。しかし、それぞれの TRIM タンパク質の機能に関して網羅的解析はなされておらず、未だ不明な点が多く残されている。したがって、ヒト (マウス) ゲノム中に存在する TRIM タンパク質群の cDNA を網羅的に同定し、それぞれの TRIM タンパク質に対する基質の同定およびその生理的機能の解析すること、さらには各種の疾患との病態生理学的解析を進めることは医学領域において重要性が高い研究と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、ヒトもしくはマウスに存在する TRIM タンパク質を生化学的及び細胞生物学的手法により網羅的に解析することを目的とした。TRIM タンパク質の多くは、RING ドメインを有しており、ユビキチンリガーゼ E3 活性を示すことが推測される。構造的特徴としては、RING ドメインの他、B-box ドメインと Coiled coil ドメインを有しており、さらに C 末端側には SPRY ドメインや BROMO ドメインや NHL ドメイン等を有しているものがあり、基質認識ドメインとして機能している可能性が高い。そのため、TRIM タンパク質は、ドメイン構造より RBCC タンパク質とも呼ばれている。また、癌や白血病に関連する TRIM タンパク質として、Leu5(白血病)、PML (白血病)、EFP (乳癌) や TRIM32 (頭頸部癌) などが報告されている。したがって、本研究申請においては、TRIM タンパク質によりユビキチン化される基質タンパク質の網羅的同定及び細胞生物学的解析を基に、癌化メカニズムへの関与の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

TRIM タンパク質(ヒト及びマウス)の cDNA を網羅的にクローニングし、組織発現プロファイル等を参考に結合タンパク質 (基質候補タンパク質) を網羅的に同定した。特に癌化関連 (細胞増殖関連) タンパク質と相互作用する TRIM タンパク質が同定された場合、特に詳細な解析を進める方針を取った。つまり、癌化との関連が指摘 (報告) されている結合

タンパク質にプライオリティーを持って研究方針を選択した。その後、注目される TRIM タンパク質と基質候補タンパク質の関係を調べるために、TRIM タンパク質による基質候補タンパク質のユビキチン化感受性変化及び安定性の変化を調べた。さらに、基質候補タンパク質の機能により、細胞骨格変動、細胞内の生化学的変化 (リン酸化など)、転写活性化、細胞周期、細胞増殖等に関する細胞生物学的実験を行った。また、基質候補タンパク質の安定性もしくは機能変化に関する分子論的根拠を解明するために、NMR や X 線構造解析を行った。その後、個体レベルでの TRIM タンパク質の機能を解明するために、トランスジェニックマウスもしくはノックアウトマウスを作製し、病理学的解析及び遺伝学的相互作用 (TRIM タンパク質と基質タンパク質) を検討した。さらに、臨床医学的応用を目指すため、癌組織を使用した TRIM タンパク質の発現変動を調べ、癌の悪性度や早期診断等への応用に向けた検討を行った。

## 4. 研究成果

本研究において TRIM ファミリーの細胞生物学的機能、特に細胞増殖と癌化に関する網羅的解析を遂行した。以下の本研究の成果をもとに Nature Reviews Cancer から TRIM タンパク質と癌に関する総説の執筆依頼 (査読有) を受けた [*Nature Rev Cancer* 11:792(2011) ; *Nature Med* 17:347 (2011); *J Cell Sci* 124:3492 (2011); *Carcinogenesis* 32:995 (2011); *BBA-MCR* 1813:1245 (2011); *J Cell Sci* 123:2238 (2010); *BBA-MCR* 1793:1828 (2009); *Mol Cancer Res* 7:1553 (2009)]。この研究課題の遂行により、癌化過程において細胞の増殖及び分化における TRIM タンパク質の重要性が判明したので、さらに転写因子の制御を中心に分子レベルに掘り下げた TRIM ファミリーユビキチンリガーゼの機能を解明する方向へのきっかけができた。

## 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 25 件)

1. Yaguchi, H., Okumura, E., Takahashi, H., Kano, T., Kameda, H., Uchigashima, M., Tanaka, S., Watanabe, M., Sasaki, H. and Hatakeyama, S.: TRIM67 protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuritogenesis. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 287, 12050-12059, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.307678

2. Tsukiyama, T., Matsuda-Tsukiyama, M., Bohgaki, M., Terai, S., Tanaka, S. and Hatakeyama, S.: Ymer acts as a multifunctional regulator in NF- $\kappa$ B and Fas signaling pathways. *Mol. Med.*, 査読有, in press.
3. Sato, T., Okumura, F., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM6 interacts with Myc and maintains the pluripotency of mouse embryonal stem cells. *J. Cell Sci.*, 査読有, 125, 1544-1555, 2012. DOI: 10.1242/jcs.088799
4. Sato, T., Okumura, F., Iguchi, A., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM32 promotes retinoic acid receptor  $\alpha$ -mediated differentiation in human promyelogenous leukemic cell line HL60. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 417, 594-600, 2012. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.12.012
5. Hatakeyama, S.: TRIM proteins and cancer. *Nature Rev. Cancer*, 査読有, 11, 792-804, 2011. DOI: 10.1038/nrc3139
6. Sato, T., Okumura, F., Kano, S., Kondo, T., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM32 promotes neural differentiation through retinoic acid receptor-mediated transcription. *J. Cell Sci.*, 査読有, 24, 3492-3502, 2011. DOI: 10.1242/jcs.088799
7. Okumura, F., Okumura, A.J., Matsumoto, M., Nakayama, K.I. and Hatakeyama, S.: TRIM8 regulates Nanog via Hsp90  $\beta$ -mediated nuclear translocation of STAT3 in embryonic stem cells. *BBA-Mol. Cell Res.* 査読有, 1813, 1784-1792, 2011. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.05.013
8. Noguchi, K., Okumura, F., Takahashi, N., Kataoka, A., Kamiyama, T., Todo, S. and Hatakeyama, S.: TRM40 promotes neddylation of IKK  $\gamma$  and is downregulated in gastrointestinal cancers. *Carcinogenesis*, 査読有, 32, 995-1004, 2011. DOI: 10.1093/carcin/bgr068
9. Sho, T., Tsukiyama, T., Sato, T., Kondo, T., Cheng, J., Saku, T., Asaka, M. and Hatakeyama, S.: TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *BBA-Mol. Cell Res.*, 査読有, 1813, 1245-1253, 2011. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.018
10. Okumura, F., Yoshida, K., Liang, F. and Hatakeyama, S.: MDA-9/syntenin interacts with ubiquitin via a novel ubiquitin binding motif. *Mol. Cell. Biochem.*, 査読有, 352, 163-172, 2011.
11. Wu, H., Pomeroy, S.L., Ferreira, M., Teider, N., Mariani, J., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S., Tron, V.A., Saltibus, L.F., Spyracopoulos, L. and Leng, R.P.: UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53. *Nature Med.*, 査読有, 17, 347-355, 2011.
12. Bohgaki, M., Matsumoto, M., Atsumi, T., Kondo, T., Yasuda, S., Horita, T., Nakayama, K.I., Okumura, F., \*Hatakeyama, S. and Koike, T.: Plasma gelsolin facilitates interaction between  $\beta$ 2 glycoprotein I and  $\alpha$ 5  $\beta$ 1 integrin. *J. Cell. Mol. Med.*, 査読有, 15, 141-151, 2011. \*corresponding autor
13. Shinada, K., Tsukiyama, T., Sho, T., Okumura, F., Asaka, M., Hatakeyama, S.: RNF43 interacts with NEDL1 and regulates p53-mediated transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 404, 143-147, 2011.
14. Benirschke, R.C., Thompson, J.R., Nomine, Y., Wasielewski, E., Juranic, N., Macura, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Botuyan, M.V., Mer, G.: Molecular basis for the association of human E4B U-box ubiquitin ligase with E2 conjugating enzymes UbcH5C and Ubc4. *Structure*, 査読有, 18, 955-965, 2010.
15. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S.: TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J. Cell Sci.*, 査読有, 123, 2238-2245, 2010.
16. Okumura, F., Kameda, H., Ojima, T.,

- Hatakeyama, S.: Expression of recombinant sea urchin cellulase SnEG54 using mammalian cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 395, 352-355, 2010.
17. Sasai, M., Tatematsu, M., Oshiumi, H., Funami, K., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya, T.: Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Mol. Immunol.*, 査読有, 47, 1283-1291, 2010.
  18. Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A.J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., Obuse, C., Hatakeyama, S., Obata, T. and Noguchi, M.: The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev. Cell*, 査読有, 17, 800-810, 2009.
  19. Kikuchi, M., Okumura, F., Tsukiyama, T., Watanabe, M., Miyajima, N., Tanaka, J., Imamura, M., Hatakeyama, S.: TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells. *BBA-MCR*. 査読有, 1793, 1828-1836, 2009.
  20. Maeda, H., Miyajima, N., Kano, S., Tsukiyama, T., Okumura, F., Fukuda, S. and Hatakeyama, S.: Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2Q2 suppresses cell proliferation and is down-regulated in recurrent head and neck cancer. *Mol. Cancer Res.*, 査読有, 7, 1553-1562, 2009
  21. Kimura, T., Sakai, M., Tabu, K., Wang, L., Tsunematsu, R., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., Nishihara, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ladanyi, M., Tanaka, S. and Nakayama, K.I: Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab. Invest.*, 査読有, 89, 645-656, 2009.
  22. Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S. and Nakayama, K.I.: Large-scale proteomic analysis of tyrosine phosphorylation induced by TCR or BCR activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, 査読有, 9, 3549-3563, 2009.
  23. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya, T.: Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 284, 807-817, 2009
  24. Yoshida, K., Watanabe, M., and Hatakeyama, S.: ZNRF1 interacts with tubulin and regulates cell morphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 389, 506-511, 2009.
  25. Watanabe, M., Tsukiyama, T. and Hatakeyama, S.: TRIM31 interacts with p52Shc and inhibits Src-induced anchorage-independent growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 388, 422-427, 2009.
- [学会発表] (計 10 件)
1. 畠山鎮次: 癌化を制御する TRIMファミリーユビキチンリガーゼ, 日本実験動物技術者協会北海道支部第 59 回特別講演, 北海道大学, 札幌, 2012/4/26
  2. Hatakeyama, S., TRIM proteins in inflammation and carcinogenesis. 2nd international symposium: Infection-related cancers (Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Research Center for Infection-associated Cancer (RCIAC)), Sapporo, 2012/3/12-13
  3. 畠山鎮次, 特別講演「癌化を制御する TRIMファミリーユビキチンリガーゼ」, 第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会, 北海道大学医学部学友会館「フラテ」, 札幌, 2012/2/10-11.
  4. Tsukiyama T., Tsukiyama M M.,

- bohgaki M., Tanaka S., Hatakeyama, S., Ymer functions as a multifunctional regulator in NF-kB and Fas signaling pathways., the 41st meeting of the Australasian Society for immunology 2011, Adelaide Convention Center, Adelaide, 2012/12/11-15.
5. Otomo K, Atsumi T, Fujieda Y, Nakagawa H, Amengual O, Kato M, Horita T, Tasuda S, Matsumoto M, Hatakeyama, S., Koike T., Role of apolipoprotein B100 and oxidized low-density lipoprotein in anti beta2 glycoprotein I induced tissue factor expression on monocytes. , The 75th annual meeting of the American College of Rheumatology, Cicago, Illinois, 2011/11/5-9
  6. 丸山 覚, 築山忠維, 河津隆文, 佐藤択矢, 千葉博基, 安部崇重, 佐澤 陽, 篠原信雄, 畠山鎮次, 野々村克也, ダイオキシン受容体内因性リガンドによる前立腺がん細胞におけるアンドロゲンレセプター発現低下と増殖抑制, 第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会, 北海道大学医学部学友会館「フラテ」, 札幌, 2012/2/10-11
  7. 渡部 昌, 畠山鎮次, TRIM ファミリー分子による PPAR $\gamma$  シグナルの制御, 第 84 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 京都, 2011/9/21-24
  8. 畠山鎮次, 癌化の関与する TRIM ファミリーユビキチンリガーゼ, 第 69 回日本癌学会, 大阪国際会議場, 大阪, 2010/9/24
  9. 畠山鎮次, 古典的生化学手法と質量分析技術の融合によるユビキチンリガーゼの基質同定の可能性, 文部科学省科研費特定領域研究「タンパク質分解」公開シンポジウム, 東京ガーデンパレス, 東京, 2010/8/21
  10. 畠山鎮次, ユビキチンシステム関連酵素の多様性と機能, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/17

〔図書〕(計 3 件)

1. 畠山鎮次, 羊土社 タンパク質分解系に

よる生体制御, 「複雑化するユビキチンリガーゼの機能と多様性」, 2011, 12

2. Maruyama, S. , Nonomura, K, Hatakeyama, S., Nova Science Publishers, PSA and Prostate Cancer, p137-152, 2011.
3. Hatakeyama, S., Nova Science Publishers (New York), Handbook of Prostate Cancer Cell Research: Growth, Signalling and Survival, p301-322, 2009.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~d20505/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畠山 鎮次 (HATAKEYAMA SHIGETSUGU)  
北海道大学・大学院医学研究科・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

奥村 文彦 (OKUMURA FUMIHIKO)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：00507212

築山 忠維 (TSUKIYAMA TADASUKE)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20399819