

機関番号：13901

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18076001

研究課題名（和文）

ユビキチンリガーゼの多様性の解析

研究課題名（英文）

Analysis of diversity of ubiquitin ligase

研究代表者：

嘉村 巧 (Takumi Kamura)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：40333455

研究成果の概要（和文）：

ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解は様々な生命現象を制御している。標的タンパク質へのユビキチン修飾は E1、E2、E3 の 3 つの酵素群を介して行われるが、中でも、E3 が標的タンパク質の特異性を決める重要な働きをしている。Cullin 型および TRIM 型 E3 は多くの生命現象に関与していると考えられている。我々は Cullin 型および TRIM 型 E3 の機能解明を目的として、本研究を行った。我々は、Cullin 型 E3 が Mrc1、Ctf4、Elongin A、p53 および Ypt53 の機能を制御していること、そして Lag2 が SCF 型 E3 の活性を負に制御することを示した。さらには TRIM 型 E3 が、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、Abi2、p53、PIAS3 そして Ikk γ の機能を制御していることを明らかにした。これらのことは、Cullin 型および TRIM 型 E3 が、多くの標的タンパク質の機能を制御することにより、様々な生命現象に関与していることを示すものである。

研究成果の概要（英文）：

Ubiquitylation and subsequent proteasomal degradation of regulatory proteins control a variety of cellular processes. The ubiquitin conjugation to target proteins is processed by three enzymes, E1, E2, and E3. The E3s are responsible for recognizing and recruiting target proteins for polyubiquitylation. Cullin-based E3 complexes and TRIM E3 families are thought to regulate many cellular events. In this research, we try to clarify the function of Cullin-based E3 complexes and TRIM E3 families. Now we show that Cullin-based E3 complexes are responsible for regulating the function of Mrc1, Ctf4, Elongin A, p53, and Ypt53. We also identify that Lag2 negatively modulate the activity of SCF complex. Finally, we demonstrate that TRIM E3 families control the function of estrogen receptor, androgen receptor, Abi2, p53, PIAS3 and Ikk γ . These observations thus indicate that Cullin-based E3 complexes and TRIM E3 families plays an important role in a variety of cellular processes by regulating the function of many target proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	20,900,000	0	20,900,000
2007 年度	30,000,000	0	30,000,000
2008 年度	30,000,000	0	30,000,000
2009 年度	30,000,000	0	30,000,000
2010 年度	30,000,000	0	30,000,000
総計	140,900,000	0	140,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞周期進行・シグナル伝達・発癌・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、ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解が重要な役割を果たしていることが明らかになり大変注目を集めてきている。ユビキチンシステムの発見者である Hershko 博士、Ciechanover 博士と Rose 博士の3氏に2004年ノーベル化学賞が授与されたことは記憶に新しい。タンパク質へのユビキチン化反応に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)の三種類の触媒酵素群が関与しているが、この中で E3 は特異的に基質を認識し分解に導くという重要な役割を担っている。ユビキチン化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 も非常に多数存在している。しかしながら E3 がどのよのうな基質を認識しユビキチン依存性分解に導くのかはほとんどわかっていないのが現状である。そこで E3 基質関係を明らかにすることはユビキチン・プロテアソーム系の機能を知るために急務である。

2. 研究の目的

ユビキチン化修飾による分解制御系が、様々な生命現象に重要な働きを果たしていることが明らかになり、注目を集めてきている。中でも、この分解システムの多様性を決めるユビキチンリガーゼ(E3)の研究が盛んに行われてきており、現在までに E3 本体に関してはかなり明らかになってきている。この領域の次の課題は個々の E3 に対する特異的基質の同定に移ってきている。近年の質量分析法の技術進歩および EST 計画の進行による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、様々な 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、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を解明すること(Degradome 解析)を目的とする。ユビキチンリガーゼの多様性に焦点を絞り、その分子論的機序、生理的意義との関連について細胞生物学的解析を進める。

3. 研究の方法

(1) Cullin 型および TRIM 型 E3 ユビキチンリガーゼに対する基質の網羅的解析

Cullin 型 E3 は細胞周期、シグナル伝達、DNA 複製や転写などに、また一方 PML、EFP や Trim32 などの TRIM 型 E3 は、多くの癌や白血病に関与していることが報告されている。DNA データベースを利用し Cullin 型および TRIM 型 E3 を網羅的にクローニングし、酵母

2 ハイブリッド法や pull-down 法により相互作用するタンパク質(基質タンパク質の候補)を同定する。

(2) ホルモン依存性癌に關与する分子のユビキチン化解析

多くのホルモン依存性癌(乳癌、卵巣癌、前立腺癌など)は性ホルモン依存性に増殖し、直接予後に影響をもたらす。多くの性ホルモン受容体はリガンド依存性もしくは非依存性にユビキチン化を受けることが知られているが、現在のところ性ホルモン受容体に対する E3 は不明である。したがって酵母 2 ハイブリッド法や pull-down 法により相互作用するタンパク質(E3 の候補)を同定する。

(3) 新規基質あるいは E3 候補タンパク質のクローニングおよび抗体の作製

データベースを用いて 1. あるいは 2. で同定したタンパク質をクローニングし、大腸菌およびレトロウイルス用発現ベクターを作製する。市販で抗体が手に入らない場合は、大腸菌の発現系を用いてリコンビナントタンパク質を作製しウサギに免疫してポリクロナル抗体をつくる。

(4) E3 の新規基質候補タンパク質の安定性に及ぼす影響の検討

野生型あるいは不活性型の E3 の過剰発現あるいは RNA 干渉法による E3 の発現コントロールを行い、3. で作製した抗体を用いて 1. で同定した内在性の新規基質候補タンパク質の半減期への影響を検討する。本当の基質であるのならば、野生型の E3 の過剰発現で、その安定性は低下し、一方 E3 の過剰発現や RNA 干渉法による E3 の発現抑制で、その安定性は亢進するはずである。この過程で同定したタンパク質が本当の基質であるかどうかの選別ができる。

(5) 新規 E3 タンパク質の性ホルモン受容体の安定性に及ぼす影響の検討

2. で同定した野生型あるいは不活性型の新規 E3 タンパク質の過剰発現あるいは RNA 干渉法による新規 E3 タンパク質の発現コントロールを行い、4. と同様な方法で性ホルモン受容体の安定性への影響を検討する。4. と同じく、この過程で同定したタンパク質が本当の E3 であるかどうかの選別ができる。

(6) 4. および 5. で同定した E3 基質関係により制御される細胞生物学現象の検討

新規基質のアミノ酸配列よりその生体内での機能を予測する。E3 の過剰発現あるいは RNA 干渉法による E3 の発現抑制によって新規基質の発現を制御することにより、どのような細胞生物学的変化が現れるかを解析する。

4. 研究成果

本課題では、出芽酵母および哺乳類におけるユビキチンリガーゼの多様性を Cullin フ

ファミリーと TRIM ファミリーで解析した。

(1) Cullin 型の機能解析

出芽酵母 Lag2 は SCF 複合体の機能を負に制御する

出芽酵母 SCF 複合体は、RING-finger タンパク質 Rbx1、Cullin タンパク質 Cdc53、アダプタータンパク質 Skp1、そして基質認識サブユニット F-box タンパク質からなる四量体で構成されている。SCF 複合体の最も特徴的な点は、Rbx1、Cdc53 および Skp1 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である F-box タンパク質は可変因子であり、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。出芽酵母には 21 種類の F-box タンパク質が存在しているが、我々は F-box タンパク質を用いて酵母 two-hybrid スクリーニングを行った。その結果、寿命関連因子として報告されている Lag2 を複数の異なる F-box タンパク質の結合タンパク質として同定した。Lag2 は F-box タンパク質に直接結合するのではなく他の共通構成因子を介して結合することが示唆されたが、確かに Lag2 が Cdc53 と結合することを明らかにした。このことより、Lag2 は SCF 複合体の基質ではなく、活性の調節因子であることが考えられた。ユビキチン様小分子である Rub1 修飾を Cdc53 が受けることにより SCF 複合体の活性は制御されているが、Lag2 を過剰発現することにより Cdc53 に対する Rub1 修飾が抑制されることを、また一方、Rub1 修飾関連因子である Dcn1 と Jab1 と共に Lag2 を欠失させることにより Cdc53 の Rub1 化が促進されることを示した。さらに Lag2 欠失酵母において、SCF 複合体の基質として知られている Sic1 や Cln2 の安定性が低下していることを明らかにした。また試験管内での Rub1 およびユビキチン修飾反応においても同様な結果を得た。これらのことは、Lag2 が SCF 複合体の機能を負に制御していることを示すものである。

出芽酵母 Roy1 は Rab5 様小 G タンパク質 Ypt52 の機能を負に制御することにより細胞内タンパク質輸送に關与する

近年の研究により F-box タンパク質の一部に SCF 複合体を形成しないものがあることが明らかになり、non - SCF 型 F-box タンパク質と呼ばれている。我々は non - SCF 型 F-box タンパク質である Roy1 の機能解析を行った。Roy1 が Rab5 様小 GTPase である Ypt52 と生理的条件下で結合することを明らかにした。出芽酵母には Vps21、Ypt52、Ypt53 の 3 種類の Rab5 様タンパク質が存在し、細胞内タンパク質輸送や細胞増殖を制御していることが知られている。これまでの報告のように Vps21 を欠失させることにより細胞内タンパク質輸送や細胞増殖が著明に抑制されたが、Ypt52 の欠失ではほとんど影響をみることは

できなかった。しかしながら Vps21 と Roy1 を共に欠失させることにより、Vps21 単独欠失でみられた抑制はほとんど回復した。さらに Vps21、Roy1、Ypt52 の欠失変異体では再び著明な抑制がみられたことより Roy1 は Ypt52 の機能を負に制御していることが示唆された。さらには Roy1 が GDP 型と nucleotide - free の Ypt52 と結合すること、および Roy1 が Ypt52 への GTP の結合を阻害することを見出した。これらの結果は Roy1 が Ypt52 の機能を負に制御することにより細胞内タンパク質輸送や細胞増殖に關与していることを示唆した。

，に加えて、出芽酵母 SCF 型 E3 において Dia2 が Mrc1、CTF4 と、Met30 が Cad1 と、Ufo1 が Rpi1 と、と相互作用することを見出した。出芽酵母 Cul8 が多くのタンパク質と E3 複合体を構成し、サイレンシングに關与していることを明らかにした。哺乳類 Cullin 型 E3 においては、Fem1B が Nek2 と、そして Zyg11B が AIF とさらには ElonginA が RNA ポリメラーゼ II と相互作用することを同定した。

(2) TRIM 型 E3 の機能解析

TRIM8 による STAT3 依存的シグナル伝達制御機構の解明

TRIM8 は RING ドメインを有するのでユビキチンリガーゼ (タンパク質分解関連酵素) であることが示唆されるが、TRIM8 が認識する基質は同定されていなかった。われわれは TRIM8 の基質を同定するために酵母ツーハイブリッド法を行った結果、PIAS3 を候補分子として同定した。IP-Western blotting により 293T 細胞内で TRIM8 と PIAS3 の結合を確認した。さらにタンパク質合成阻害剤を用いた pulse-chase 実験により TRIM8 依存的な PIAS3 の分解促進が起こることを確認した。PIAS3 は特異的に STAT3 の転写活性を抑制するので、STAT3 依存的レポータープラスミドを用いて TRIM8 が PIAS3 の活性を制御することを確認した。すなわち IL-6 依存性の STAT3 による転写活性が PIAS3 によって抑制されたが、TRIM8 の過剰発現により PIAS3 の抑制効果がキャンセルされた。TRIM8 の PIAS3-STAT3 経路に対する細胞生物学的機能を検討するために、STAT3 依存的な癌化に対する影響を調べた。活性型 c-Src(Y527F) 変異体を用いて STAT3 経路を活性化すると NIH-3T3 細胞は癌化し足場非依存的に増殖することが知られている。このアッセイ系を用いて TRIM8 を過剰発現させるとガン化が十数倍亢進した (コロニー数による比較)。HeLa 細胞は内在性の PIAS3 を他の細胞株に比べて強く発現していたので、HeLa 細胞に TRIM8 を過剰発現させた結果、核内に局在していた内在性の PIAS3 が核外に排除されることを見出した。

これは TRIM8 によるタンパク質分解とは独立した、別の経路による PIAS3 の制御メカニズムと考えられた。TRIM8 はインターフェロン γ 刺激によりそのメッセンジャーRNA の転写が誘導されることから免疫システムに關与していることが推測されている。しかしながらタンパク質レベルでは検討されていないのでインターフェロン γ 刺激で TRIM8 が誘導されるかどうかを抗 TRIM8 抗体を用いて検討したがインターフェロン γ 刺激による内在性 TRIM8 の発現誘導は認められなかった。われわれは、TRIM8 が PIAS3 に対するユビキチンリガーゼであることを示した。PIAS3 は STAT3 に対する抑制分子である。STAT3 は多様な役割を担っており、細胞増殖活性、抗アポトーシス活性、癌組織に対する免疫反応抑制効果、ES 細胞の多能性の維持などに寄与している。したがって TRIM8 は PIAS3 の抑制を介して STAT3 を活性化することによりさまざまな経路を制御する可能性がある。今回われわれは TRIM8 が PIAS3 の抑制を介してすくなくともガン化に寄与していることを示した。

に加えて、TRIM25 と TRIM68 はそれぞれエストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体の活性化に關与し、TRIM21 は B 細胞における抗体産生の際のタンパク質品質管理に關与していることを見いだした。また、TRIM32 は Abl 関連分子 Abi2 のユビキチン化依存性分解に關与し、その発現レベルが頭頸部癌の悪性度と相関関係があることが判明した。さらには TRIM29 が Tip60 を介して p53 の活性を制御すること、また TRIM40 は IKK γ の Nedd8 修飾を促進し、胃腸の癌を抑制することを明らかにした。

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 37 件)

1. Liu, Y., Nakatsukasa, K., Kotera, M., Kanada, A., Nishimura, T., Kishi, T., Mimura, S., Kamura, T.: Non-SCF type F-box protein Roy1/Ymr258c interacts with a Rab5-like GTPase Ypt52 and inhibits Ypt52 function. *Mol. Biol. Cell*, 22: 1575-1584 (2011) 査読有
2. Mimura, S., Yamaguchi, T., Ishii, S., Noro, E., Katsura, T., Obuse, C., Kamura, T.: Cul8/Rtt101 forms a variety of protein complexes that regulate DNA damage response and transcriptional silencing. *J. Biol. Chem.*, 285: 9858-9867 (2010) 査読有
3. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I. and Hatakeyama, S.:

TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3, *J. Cell. Sci.*, 123: 2238 - 2245 (2010) 査読有

4. Mimura, S., Komata, M., Kishi, T., Shirahige, K., Kamura, T.: SCF^{Dia2} regulates DNA replication forks during S-phase in budding yeast. *EMBO J.* 28:3693-3705 (2009) 査読有
5. Liu, Y., Mimura, S., Kishi, T., Kamura, T.: A longevity protein, Lag2, interacts with SCF complex and regulates SCF function. *EMBO J.* 28:3366-3377 (2009) 査読有
6. Sato, Y., Kamura, T., Shirata, N., Murata, T., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Isomura, H., Nishiyama, Y., Tsurumi T.: Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS Pathog.* 5(7):e1000530 (2009) 査読有
7. Yasukawa, T., Kamura, T., Kitajima, S., Conaway, RC., Conaway, JW., Aso, T.: Mammalian Elongin A complex mediates DNA-damage-induced ubiquitylation and degradation of Rpb1. *EMBO J.* 27:3256-66 (2008) 査読有
8. Kano, S., Miyajima, N., Fukuda, S., Hatakeyama, S.: TRIM32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2, *Cancer Res.* 68:5572-5580 (2008) 査読有
9. Miyajima, N., Maruyama, S., Bohgaki, M., Kano, S., Shigemura, M., Shinohara, N., Nonomura, K., Hatakeyama, S.: TRIM68 regulates ligand-dependent transcription of androgen receptor in prostate cancer cells, *Cancer Res.* 68, 3486-3494 (2008) 査読有

[学会発表](計 29 件)

1. Takumi Kamura and Yuan Liu: A longevity protein, Lag2, interacts with SCF complex and regulates SCF function. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日~10 日、神戸(シンポジウム)
2. 嘉村 巧: ユビキチンリガーゼの制御機構 ユビキチンシンポジウム 2010 年 8 月 21 日、東京(シンポジウム)
3. 嘉村 巧、中山 敬一: 細胞増殖抑制因子 p27 の新たな分解因子の分離精製及び解析 日本分子生物学会 2006 フォーラム。2006 年 12 月 7 日、名古屋(シンポジウム)
4. Kamura T.: VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for

Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. The Fourth NIBB-EMBL Symposium Biology of Protein Conjugation, Structure and Function 2006年12月4日、岡崎

5. 嘉村 巧：ユビキチンシステムと発癌・細胞周期 第68回日本血液学会総会・第48回日本臨床血液学会総会・合同総会 2006年10月7日、福岡（教育講演）

〔図書〕(計1件)

1. 嘉村 巧：モノユビキチン化の解析. 実験医学(別冊)「タンパク質の翻訳後修飾解析プロトコール」(稲垣昌樹 編、羊土社、東京) 134-138 (2006)

〔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