

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700983

研究課題名(和文) TRB3によるがん抑制遺伝子p53機能制御と発がん機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of the oncogenic activity of TRB3 by regulating p53 activation

研究代表者

井上 靖道 (Inoue, Yasumichi)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10450579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：TRB3は小胞体ストレス時に誘導される分子として同定されたキナーゼ様分子である。TRB3は基質結合部位を持つが、キナーゼ活性を持たないpseudokinaseであり、細胞内では主にスキャフォールドタンパクとして様々なシグナル伝達分子の活性を調節する。TRB3の過剰発現は種々のヒトがんにおいても見られ、TRB3が細胞がん化に関与していると考えられているが、その詳細は不明であった。本研究では、TRB3がp53に結合しその作用を抑制することがTRB3によるがん化の一因であることを明らかにした。また、TRB3が小胞体ストレス時のチェックポイントから回避させる新たな機構も見いだした。

研究成果の概要(英文)：TRB3 is originally identified as a kinase-like molecule in response to ER stress. While TRB3 has the substrate-binding domain, the consensus amino acids for protein phosphorylation are missing. Therefore, TRB3 is believed to act as a scaffold protein regulating various signal transducers positively and negatively. In this project, we have demonstrated that TRB3 interacts with p53 and attenuates the biological functions of p53. Also, it is revealed that TRB3 is a novel checkpoint regulators when cells are re exposed to ER stress.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：p53 TRB3 がん 細胞周期 アポトーシス シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

TRB3 は申請者らの研究室において、小胞体ストレス時に誘導される分子として同定されたキナーゼ様分子である。TRB3 は基質結合部位を持つが、キナーゼ活性を持たない pseudokinase であり、細胞内では主にスキャフォールドタンパクとしてキナーゼをはじめ様々なシグナル伝達分子の活性を調節する。そのタンパクの高発現は糖尿病におけるインスリン抵抗性の原因の一つであると考えられている。また、TRB3 の過剰発現は種々のヒトがんにおいても見られ、TRB3 が細胞がん化に関与していると考えられているが、その詳細は不明なままであった。

申請者は細胞に TRB3 を過剰発現させると p53 の転写活性が抑制され、また逆に TRB3 の発現を抑制すると p53 の活性が増強され、p53 の標的遺伝子の転写活性が上昇することを見いだしていた。さらに、TRB3 の過剰発現が DNA ダメージチェックポイントから逸脱した異常な細胞を生み出すことも明らかにしていた。即ち TRB3 はがん抑制遺伝子 p53 の活性を負に制御することで細胞がん化を促すと考えられた。より詳細な解析を進めることで、がんの新たな分子標的的作用点を見いだすことにも繋がると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、TRB3 が p53 を抑制する分子メカニズムを明らかにし、TRB3 による細胞がん化への作用を理解することを目的とした。また、TRB3 を標的に p53 活性の回復を目的とした新しい分子標的薬の開発につながる分子基盤の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) TRBs による p53 の活性制御

我々は TRBs による発がんメカニズムを明らかにすべく結合タンパクの網羅的解析をおこなった結果 p53 を同定していた。そこで TRBs による p53 制御の可能性について検討を進めた。TRBs による p53 の活性制御に関しては、Western blotting、RT-PCR 等で解析した。また p53 による生物学的応答への作用に関しては BrdU による増殖やアポトーシスの誘導などで検討した。

(2) TRB3 による細胞周期チェックポイント回避

TRB3 は当初小胞体ストレス時に誘導される分子として同定されている。がんの微小環境下においては小胞体ストレスを始めとした様々なストレス下にごん細胞がさらされており、これらストレスに適応するがんのみが増殖できる。この反応に TRB3 が関与する可能性について(1)と同様の手法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) TRB1/3 による新たな細胞がん化のメカニズムの研究

野生型 p53 を持つがん細胞株に TRBs の siRNA を導入して TRBs の発現を抑制すると、TRB1 または TRB3 をノックダウンさせた際に p53 の転写活性が増強され、また、p53 依存性の細胞周期停止ならびにアポトーシスが增強された。TRB2 のノックダウンでは p53 応答の変化は見られなかった。次に、TRB1/3 が p53 結合するかを検討したところ、両タンパク質とも結合した。さらに TRB1/3 は p53 の DNA binding domain と結合した。

TRB1/3 がどのように p53 の転写活性化を抑制しているか検討したところ、TRB1/3 は p53 の翻訳後修飾を制御していることが示唆された。また、TRB1/3 の新たな結合タンパクとしてヒストン脱メチル化酵素 LSD1 やヒストン脱アセチル化酵素群を同定し、これらが TRB1/3 の p53 に対する活性に必要であることが考えられた (manuscript in preparation)。

(2) TRB3 によるチェックポイント回避機構

細胞に小胞体ストレスを与えると細胞周期停止が起こるが、この実行因子として p21 を同定した。p21 の誘導に対し p53 は必要とせず、転写因子 ATF4 により誘導されていることがわかった。siRNA を用いて ATF4 をノックダウンさせると p21 の発現誘導は抑制された。また、Chk1 特異的な阻害剤を処理すると p21 の発現誘導が抑制され、p21 の誘導に Chk1 が関与することが示唆された。さらに、TRB3 の安定発現細胞を用いて同様に小胞体ストレスを与えると、p21 の誘導は阻

害され細胞周期の停止も抑制されていた TRB3 は ATF4 を抑制することで細胞周期チェックポイントから逸脱させていることが明らかとなった (manuscript in preparation)。

(3) DNA ダメージチェックポイントにおける TRB3 発現低下機構の解析

DNA ダメージを与えると TRB3 発現レベルは低下し、それは mRNA レベルの低下によるものではなくタンパクレベルによる制御であった。DNA ダメージによりサイクリン D1 は Cdh1-APC 複合体により分解を受けることが知られているが、TRB3 もサイクリン D1 同様、Cdh1-APC 複合体によりユビキチン化され分解されることが分かった。この結果から、DNA ダメージにより TRB3 が低下し、TRB3 による抑制から解除された p53 が活性化するというモデルが考えられた。

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0件)

[学会発表](計21件)

永尾優始, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏 . ヒストンメチルトランスフェラーゼ SET8 による TGF- β シグナル伝達制御機構の解析 . 第 58 回日本薬学会東海支部大会, 2012 年 7 月 7 日, 静岡

Nagao Y, Inoue Y, Itoh Y, Hayashi H. Histone methyltransferase SET8 is a novel negative regulator of TGF- β signaling . 平成 24 年度がん若手ワークショップ, 2012 年 9 月 5 日~8 日, 茅野

川井麻友美, 中平桂子, 石井陽子, 石戸谷その, 伊藤友香, 井上靖道, 水谷隆治, 林秀敏 . 細胞ストレス応答下における UDP glucuronosyltransferase (UGT)1A1 の発現制御 . フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012 年 10 月 25 日, 名古屋

久保知紗希, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀

敏 . シトルリン化修飾酵素 PADI4 による TGF- β シグナル伝達制御機構の解析 . フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012 年 10 月 25 日, 名古屋

吉井由比子, 牛山小百合, 澤中美希, 井出佑子, 大岡伸通, 酒井聡, 伊藤友香, 井上靖道, 小野寄菊夫, 林秀敏 . TRB ファミリータンパク質による TGF- β シグナル制御 . フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012 年 10 月 25 日, 名古屋

戸田洋平, 藤井拓夫, 伊藤友香, 酒井聡, 井上靖道, 林秀敏 . ハンチントン病関連遺伝子 huntingtin-associated protein (HAP1)の機能解析 . フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012 年 10 月 25 日, 名古屋

宮嶋ちはる, 伊藤友香, 杉山和弥, 井上靖道, 林秀敏 . T 細胞における pseudokinase TRB1 によるインターロイキン 2 (IL-2)の発現制御とその機能に関する研究 . 第 76 回日本生化学会中部支部例会, 2012 年 5 月 26 日, 岡崎

加藤直樹, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏 . TRB ファミリータンパク質の細胞内局在とその機能解析 . 日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2012, 2012 年 11 月 18 日, 岐阜

宮嶋ちはる, 伊藤友香, 杉山和弥, 井上靖道, 林秀敏 . T 細胞における pseudokinase TRB1 の機能と IL-2 の発現制御 . 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日, 福岡

宮嶋ちはる, 野原匠, 伊藤友香, 井上靖道, 林秀敏 . TRB ファミリータンパク質 TRB1 及び TRB3 によるインターロイキン 2 の転写制御 . 日本薬学会第 133 回年会, 2013 年 3 月 28 日, 横浜

澤中美希, 吉井由比子, 伊藤友香, 井上靖道, 林秀敏 . キナーゼ様タンパク質 TRB1 による TGF- β シグナルの制御 . 第 59 回日本薬学会東海支部大会, 2013 年 7 月 6 日,

名古屋

永尾優始, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏 .
メチルトランスフェラーゼ SET8 による
TGF- β シグナル伝達制御機構の解析 . 第 59
回日本薬学会東海支部大会, 2013 年 7 月 6
日, 名古屋

野原匠, 杉山和弥, 宮嶋ちはる, 伊藤友
香, 井上靖道, 林秀敏 . T 細胞におけるス
トレス誘導性タンパク質 TRB3 による IL-2
の発現制御 . 第 59 回日本薬学会東海支部
大会, 2013 年 7 月 6 日, 名古屋

宮田和弥, 森本真宗, 伊藤友香, 井上靖
道, 林秀敏 . CYP3A4 のタンパク質レベル
での発現解析 . 第 59 回日本薬学会東海支
部大会, 2013 年 7 月 6 日, 名古屋

永尾優始, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏 .
メチルトランスフェラーゼ SET8 による
TGF- β シグナル伝達制御機構の解析 . 第 86
回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 13 日,
横浜

西尾愛梨沙, 井上靖道, 隅田ちひろ, 伊
藤友香, 林秀敏 . Lox12 による TGF- β 誘導
性上皮間葉転換制御の解析 . フォーラム
2013 衛生薬学・環境トキシコロジー,
2013 年 9 月 14 日, 福岡

鈴木美沙紀, 楽怡, 岡山敦子, 野口祐美
子, 井上靖道, 伊藤友香, 小野寄菊夫, 斉
藤昌之, 林秀敏 . 白色脂肪細胞における
TGF β による PPAR γ 遺伝子の発現制御 . フォ
ーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジ
ー, 2013 年 9 月 14 日, 福岡

川原田祐貴, 井上靖道, 林秀敏 . PAI-1 遺
伝子発現制御における Smad と p53 とのク
ロストーク . 第 12 回次世代を担う若手フ
ァーマバイオフォーラム 2013, 2013 年 9
月 15 日, 東京

Matsudaira A, Itoh Y, Inoue Y, Hayashi
H. Rifampicin regulates the expression
of UGT1A1 protein. 日本薬物動態学会第
28 回年会, 2013 年 10 月 9 日, 東京

永尾優始, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏 .
メチルトランスフェラーゼ SET8 による
TGF- β シグナル伝達制御機構の解析 . 第 36
回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3
日, 神戸

- ②1 宮嶋ちはる, 伊藤友香, 井上靖道, 林秀
敏 . IL-2 発現に対する pseudokinase TRB1
による負の制御機構 . 第 36 回日本分子生
物学会年会, 2013 年 12 月 3 日, 神戸

〔図書〕(計 1 件)

井上靖道, 化学同人, がん増殖と悪性化
の分子機構, 宮澤恵二・伊東進・編, 2012 年,
175-190.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 靖道 (INOUE YASUMICHI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 10450579

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし