

皮膚組織において紫外線傷害を制御するユビキチン化システムの解析

北海道大学大学院医学研究科生化学講座

畠山 鎮次

Ataxia-telangiectasia (AT) is an autosomal recessive genetic disease characterized by immunological deficiencies, neurological degeneration, developmental abnormalities and an increased risk of cancer. Cells isolated from AT patients show hypersensitivity to ionizing radiation, cell cycle abnormalities and aberrant cytoskeletal organization. The *ataxia-telangiectasia group D (ATDC/TRIM29)* gene was identified by its ability to suppress radiosensitivity of the cell line AT5BIVA from the D group complementation group of the AT. Recently, we showed that TRIM29 suppresses apoptosis induced by UV irradiation in HCT116 cell lines. In this study, we performed biochemical analysis of TRIM29 to clarify the function of TRIM29 under UV-irradiation or other DNA damages.

1. 緒 言

紫外線 (UV) は太陽から放射される電磁波であり、波長の長いものから、UVA、UVB及びUVCの3種類に分けられる。日焼けで皮膚が赤くなり炎症を起こすのはUVBであり、シミやソバカスの原因にもなる。さらに皮膚のDNAを傷つけ、後に皮膚癌を生じさせるのも主にUVBと考えられている。UVAは、波長が長いので、UVBより皮膚の深部 (皮膚真皮) まで到達するため、皮膚のシミやたるみの原因になると考えられている。紫外線を受けた皮膚細胞の遺伝子 (DNA) は通常DNA修復酵素系によって治されるが、長年にわたり遺伝子を傷つけられることで修復の際にミスを生じることがある。このようにして突然変異が起きると、皮膚の扁平上皮細胞は老化を起こしたり、悪性細胞 (癌細胞) へと変化してしまうことがある。

毛細血管拡張性運動失調症 (AT: Ataxia telangiectasia) は協調運動不能、毛細血管拡張、感染症などを引き起こす遺伝性の免疫不全疾患であり、ATM (AT mutated) がその原因遺伝子である。ATは常染色体劣性遺伝性疾患で臨床的には進行性の小脳運動失調 (ataxia) を起こすのみでなく、毛細血管拡張 (telangiectasia)、精神遅滞、免疫不全、早老症状、発癌率の増加など幅広い症状を呈する。実際、AT患者由来の細胞は放射線高感受性や染色体不安定性を示すことが知られている。今日、癌治療の領域において、ATMタンパク質 (リン酸化酵素) が細胞周期のチェックポイント制御に重要な役割をしていることが判明している。さらに、AT患者由来の細胞を使用した細胞遺伝学的実験

により、ATの異常による表現型を相補する遺伝子としてTRIM29 (ATDC) 遺伝子が同定されている^{1, 2)}。TRIM29 (ATDC) 遺伝子は、染色体11q23に存在し、588アミノ酸をコードしている³⁾。TRIM29 (ATDC) タンパク質はジンクフィンガーモチーフを有し、tripartite motif (TRIM) タンパク質の亜系のひとつとしても報告されている。TRIMタンパク質群の多くは、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が、TRIM29の構造的特徴としては、RINGドメインを欠損している。したがって、ATDCは酵素機能欠損型として生理的にドミナントネガティブ的な機能をしている可能性がある。最近においては、皮膚を含む扁平上皮細胞に特異的に発現し、かつUV照射などで誘導されるp53の活性制御をつかさどるタンパク質として、ユビキチン化関連酵素TRIM29が報告されている^{4, 5)}。

ユビキチンは76個のアミノ酸からなるタンパク質で、タンパク質の翻訳後修飾 (ユビキチン化) に用いられ、タンパク質分解、DNA修復、翻訳調節、シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わる。ユビキチン化はミスフォールドタンパク質や不要になったタンパク質を細胞から除去するためにも重要な役割を持っており、このシステムはタンパク質の品質管理と呼ばれている。

本申請において、皮膚細胞でTRIM29がDNA傷害防御やタンパク質品質管理に関していかなる機能を有しているかを検証することを進めた。本研究成果により、ユビキチン化という新たな防御システムが皮膚の老化に関することが明らかとなれば、今までとは異なった角度から開発される薬剤や化粧品の発想につながることを期待できる。

2. 実 験

2.1 TRIM29結合タンパク質の同定のための遺伝学的及び生化学的スクリーニング

皮膚扁平上皮細胞特異的TRIMタンパク質であるTRIM29に注目し、その結合タンパク質の同定を試みた。



Analysis of ubiquitin system regulating UV-damage in skin

Shigetsugu Hatakeyama

Department of Biochemistry, Hokkaido University Graduate School of Medicine

TRIM29結合タンパク質を同定するために、酵母ツーハイブリッド法もしくはプルダウン法による結合タンパク質の精製による質量分析解析を行った。

酵母ツーハイブリッド法：TRIM29の全長もしくは基質認識部位と考えられるC末端側の部分をbaitとして使用し、各種の酵母内発現ライブラリーから、結合タンパク質のcDNAの同定を試みた。

プルダウンアッセイを用いた質量分析解析 (図1)：結合タンパク質同定のため、まずはFLAGタグ付きTRIM29タンパク質を恒常的に発現したHeLa-S3細胞株を樹立した。安定発現細胞株樹立に際して、レトロウイルス発現ベクター系を利用した。FLAGタグを使用した高度に調整された方法により、結合タンパク質を分離した。SDS-PAGEによりタンパク質を分離し、バンドとして確認できるものはMALDI-TOF/TOFを使用してタンパク質を同定する。もしくはSDS-PAGEのバンドに関係なくゲルを数10に均等に切り出し、すべてをESI-LC-MS/MSにより解析する。

2.2 扁平細胞株を使ったTRIM29に関する生化学的及び細胞生物学的解析

TRIM29による細胞機能に対する影響を調べるために、以下の実験を行った。

扁平上皮細胞株であるHaCaT細胞、PAM細胞、HSC2細胞、HSC4細胞及びCAS-22細胞等を使用した。特にRNAiによってノックダウンさせたSiHa細胞株を作製し、酵素-基質対応から推測される細胞機能に対して検討を試みた。実際には、フローサイトメーターを使用しTRIM29による細胞周期もしくは細胞死、及び細胞増殖等に関する

細胞生物学的実験を行った。

3. 結果

3.1 TRIM29結合タンパク質の同定

TRIM29の機能を解明するために、新たにTRIM29に結合するタンパク質の同定を試みた。酵母ツーハイブリッドを使用したスクリーニングでは新たに注目すべき遺伝子の同定にはできなかった。次に生化学的解析によりTRIM29結合タンパク質の同定を試みた。まず、レトロウイルス発現ベクター系を使用して、FLAGタグ付きのTRIM29の遺伝子が恒常的に発現するHeLa-S3細胞を樹立した。この細胞が樹立できたことで、安定的にTRIM29が発現する状態が実現でき、HeLa-S3細胞は浮遊培養が可能なので大量培養が可能となった。次にTRIM29抗体を使って、細胞質及び核分画のどちらに発現しているかを調べたところ、TRIM29のほとんどが核に発現していることが判明した (図2)。したがって、この安定発現細胞を大量培養し、核分画のみを選択的に精製し、その溶解液に対して抗FLAG抗体を使用してFLAG-TRIM29及びその結合タンパク質を網羅的に精製した (図1)。精製したタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、銀染色を試みた。すると、結合タンパク質と思われる多数のバンドが検出された (図3)。質量分析により同定されたタンパク質を機能的に分類すると、DNA修復に関係するタンパク質複合体の構成成分に分類されるものとクロマチンリモデリング (染色体構造変化) の関与するタンパク質複合体の構成成分に分類されるものであることが判明した (図4)。いくつかの同定されたタンパク質に関しては、TRIM29と実際に細胞内で結合しているかを確認した。

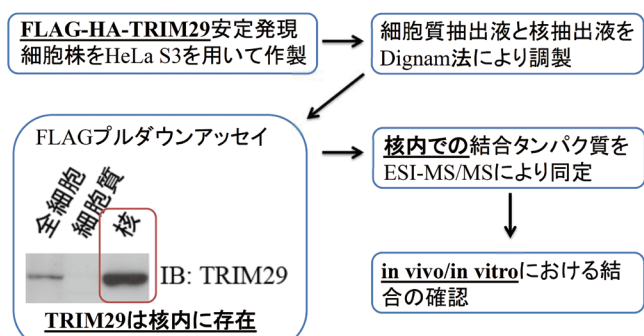


図1 TRIM29 結合タンパク質の同定のフローチャート

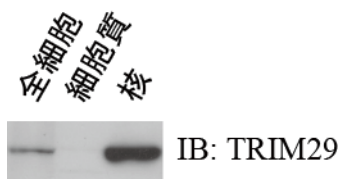


図2 細胞内分画による TRIM29 の発現部位の確認

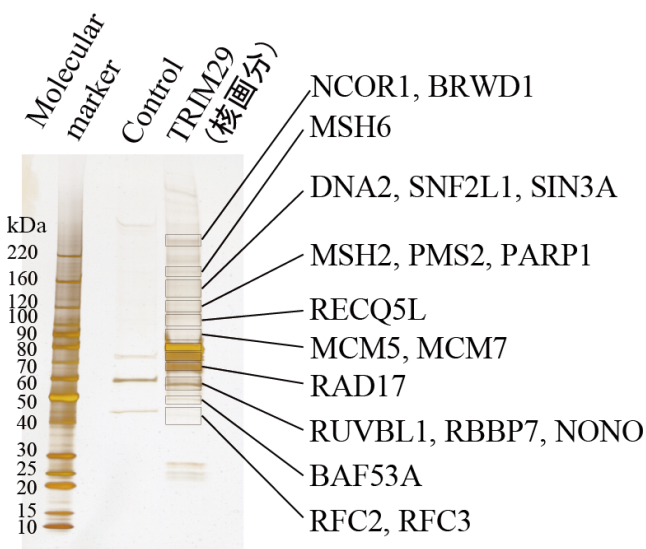


図3 精製された TRIM29 結合タンパク質の銀染色

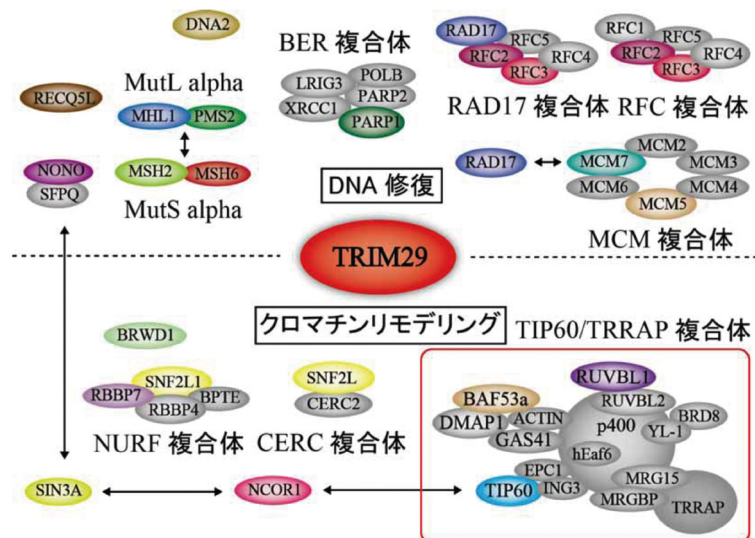


図4 同定された TRIM29 結合タンパク質の機能の可能性

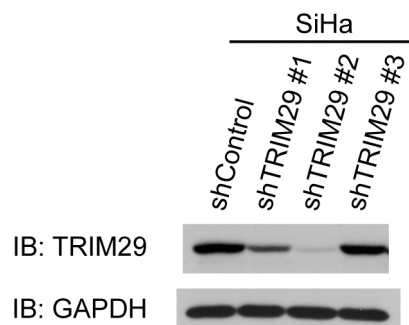


図5 TRIM29 遺伝子をノックダウンさせた SiHa 細胞株の樹立。抗 TRIM29 抗体を使ったイムノブロット解析で発現を確認した。

3.2 扁平細胞株を使った TRIM29 に関する生化学的及び細胞生物学的解析

これまでの報告から、TRIM29は癌抑制遺伝子p53依存性に機能することが示唆されている。そこで、扁平上皮細胞株の中でp53が野生型、かつTRIM29が発現している細胞株として、SiHa細胞株を細胞生物学的解析に利用した。まず、レトロウイルス発現系によるshRNAを使用し、TRIM29遺伝子の発現をノックダウンさせたSiHa細胞株を樹立した(図5)。この細胞株に対して、抗癌剤シスプラチン(CDDP)を作用させた際の細胞周期及び、アポトーシス細胞の比率を解析した。すると、対照細胞株と比較して、TRIM29ノックダウン細胞株ではCDDPに対して、アポトーシスを起こす細胞数が増加していることが判明した(図6)。したがって、CDDPを含むDNA傷害剤に対して、TRIM29は防御的な働きを有していることが示唆された。

4. 考 察

皮膚細胞の老化の防御システムの研究を進める際に、DNA傷害に対して異常を示す表現型をもつ疾患群をモデルとして想定することは有効である。皮膚扁平上皮細胞株にTRIM29は高発現しており、EGF刺激により発現が減少することが知られている⁶⁾。最近においては、WntシグナルにおけるDvlにTRIM29が作用することで、Wntシグナルを活性化させることが報告されており、さらには膀胱癌とTRIM29との関係が示されている⁷⁾。また、TRIM29は癌抑制遺伝子産物p53に結合しその機能を抑制することで、癌遺伝子の振る舞いをすることが報告されている⁴⁾。さらには、ヒストン脱アセチル化酵素HDAC9の作用でTRIM29の機能が制御されていることが報告されている⁸⁾。

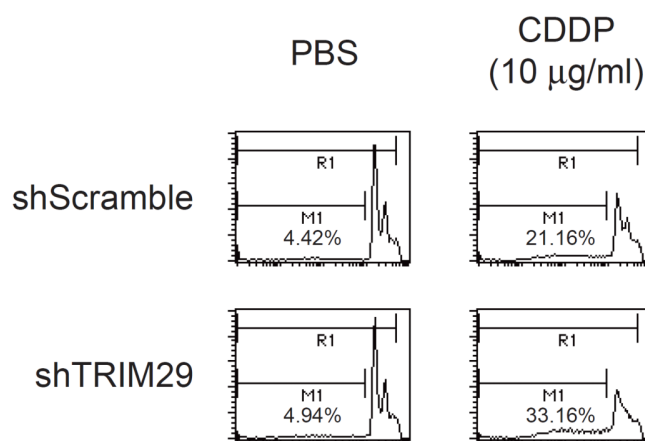


図6 TRIM29 ノックダウン SiHa 細胞株に CDDP を作用させた際の FACS 解析

最近、申請者らはTRIM29がp53のアセチル化酵素Tip60と結合することで、p53の機能を抑制することを示唆する結果を報告した⁵⁾。これまでの内外の報告を総合的に考えると、TRIM29は癌遺伝子の機能、すなわち外来刺激による細胞死(放射線感受性)を抑制する機能を有していることが考えられる。紫外線等の刺激(傷害)に対して、一過性に上皮細胞を防御する機構としてTRIM29は重要な働きをしていると考えられるが、持続的に機能し続けると癌化を誘導させることになる可能性もあるので、細胞自体の傷害レベルに合わせた発現が重要になると思われる。また、EGFなどの刺激に対してTRIM29は発現量変化を受けることが報告されているので、TRIM29の機能解析とともにTRIM29の発現変動のメカニズムを検討することも重要な課題と思われる。

5. 総 括

本研究により、DNA障害を起こすCDDPに対するTRIM29の機能が明らかとなった。さらに生化学的解析により、さまざまなDNA修復関連遺伝子産物がTRIM29と相互作用することも判明した。CDDPと同様に、紫外線照射によってもDNA障害が起きることが知られているので、皮膚上皮細胞にも高発現するTRIM29は皮膚で重要な働きをしている可能性が高い。今後はDNA修復におけるTRIM29のメカニズムを分子レベルで解明するために、今回同定した多くの結合タンパク質に関して詳細な生化学的解析を進めることが重要となる。

(引用文献)

- 1) Kapp LN, Painter RB, Yu LC, van Loon N, Richard CW 3rd, James MR, Cox DR, Murnane JP: Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D, *Am J. Hum. Genet.* 51, 45-54, 1992.
- 2) Hosoi Y, Kapp LN: Expression of a candidate ataxia-telangiectasia group D gene in cultured fibroblast cell lines and human tissues, *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 71-76, 1994.
- 3) Hatakeyama S: TRIM proteins and cancer, *Nature Rev Cancer*, 11, 792-804, 2011.
- 4) Yuan Z, Villagra A, Peng L, Coppola D, Glozak M, Sotomayor EM, Chen J, Lane WS, Seto E: The ATDC (TRIM29) protein binds p53 and antagonizes p53-mediated functions, *Mol. Cell. Biol.*, 30, 3004-3015, 2010.
- 5) Sho T, Tsukiyama T, Sato T, Kondo T, Cheng J, Saku T, Asaka M, Hatakeyama S: TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60, *Biochim. Biophys. Acta*, 1813, 1245-1253, 2011.
- 6) Laderoute KR, Knapp AM, Green CJ, Sutherland RM, Kapp LN: Expression of the ATDC (ataxia telangiectasia group D-complementing) gene in A431 human squamous carcinoma cells, *Int. J. Cancer.*, 66, 772-778, 1996.
- 7) Wang L, Heidt DG, Lee CJ, Yang H, Logsdon CD, Zhang L, Fearon ER, Ljungman M, Simeone DM: Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and beta-catenin stabilization, *Cancer Cell*, 15, 207-219, 2009.
- 8) Yuan Z, Peng L, Radhakrishnan R, Seto E: Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates the functions of the ATDC (TRIM29) protein. *J. Biol. Chem.*, 285, 39329-39338, 2010.