

51. 癌化制御に関与する TRIM 型ユビキチンリガーゼの解析

畠山 鎮次

北海道大学 大学院医学研究科 医学専攻 生化学講座 医化学分野

Key words : ユビキチン, TRIM タンパク質, DNA 修復, プロテオミクス, 癌化

緒言

細胞内のタンパク質の分解及び機能制御にユビキチンシステムが関与していることが知られている。標的タンパク質のユビキチン化カスケードにおいて、ユビキチンリガーゼ E3 が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。最近、癌化を含む細胞制御に TRIM ファミリーユビキチンリガーゼ群が重要な機能を果たしていることが報告されている。特に、細胞の増殖分化過程に関与する多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現制御に、TRIM ファミリーユビキチンリガーゼが関与していることが示唆されている¹⁾。これまでに、TRIM タンパク質のひとつである TRIM29 が UV に対する感受性に関与することが報告されている。本研究において、質量分析解析により、TRIM29 結合タンパク質を同定解析することで、TRIM29 の分子生物学的機能の解明を進めた²⁾。本研究により、TRIM29 結合タンパク質として、さまざまな DNA 修復関連タンパク質が同定された。また、細胞レベルでの解析により、TRIM29 が DNA 修復の足場タンパク質として機能することが判明した。さらに、遺伝子発現制御に関する解析を行うことにより、扁平上皮細胞系列の分化に TRIM29 が関与することが判明した。

方法および結果

1. TRIM29 の結合タンパク質の同定

FLAG タグ付き TRIM29 を安定に発現する HeLa S3 細胞を作製し、Dignam 法を用いて核抽出液を調製した。Dignam 法で調製した核抽出液には、DNA と DNA から解離した状態のタンパク質が含まれている。抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、この核抽出液から FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を精製した。多次元タンパク質同定技術 (Multidimensional protein identification technology: MudPIT) を用いて、TRIM29 の結合タンパク質の同定を行った。同定されたタンパク質の相対存在量を normalized spectral abundance factor (NSAF) によって評価した。質量分析の結果から、TRIM29 は、BASC、DNA-PKcs、TIP60 複合体の構成因子、コヒーシオンやコンデンシンなどの DNA 修復タンパク質と複合体を形成していることが明らかになった (図 1)³⁾。

| | | TRIM29 |
|------------------------------|--------|--------|
| | | 2053.9 |
| | | 0.3 |
| | | 2.3 |
| | | 3.4 |
| MRN complex | MRE11A | 1.8 |
| | RAD50 | 0.5 |
| | NBS1 | 0.4 |
| | BRCA1 | 0.1 |
| DNA mismatch repair proteins | MSH2 | 8.7 |
| | MSH6 | 5.7 |
| | MSH3 | 1.1 |
| | PMS2 | 4.2 |
| | MLH1 | 11.3 |
| RFC complex | RFC1 | 5.7 |
| | RFC2 | 13.5 |
| | RFC3 | 2.1 |
| | RFC4 | 12.4 |
| | RFC5 | 8.5 |
| Condensin Cohesin | SMC1A | 10.5 |
| | SMC3 | 12.6 |
| | SMC2 | 2.0 |
| | SMC4 | 2.1 |
| TRRAP/TIP60 complex | BRCA2 | 0.7 |
| | EP400 | 1.3 |
| | DMAP1 | 0.6 |
| | RUVBL1 | 57.2 |
| | RUVBL2 | 21.4 |
| | BAF53A | 3.1 |

| NSAF×10 ⁴ | |
|----------------------|----------|
| | 10.1< |
| | 8.1-10.0 |
| | 6.1-8.0 |
| | 4.1-6.0 |
| | 2.1-4.0 |
| | 0-2.0 |

図1. 質量分析による FLAG-TRIM29 結合タンパク質の解析

FLAG タグ付き TRIM29 を安定に発現する HeLa S3 細胞から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、TRIM29 結合タンパク質を精製した。多次元タンパク質同定技術を用いて、TRIM29 の結合タンパク質の同定を行った。同定されたタンパク質の相対存在量を normalized spectral abundance factor (NSAF) によって評価した。NSAF 値が高いほど、同定されたペプチドが多かったことを示している。

2. TRIM29 による DNA 損傷応答の制御

TRIM29 が DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復シグナルの誘導に関わるかどうかを明らかにするために、TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 細胞に 10 Gy の放射線を照射した。0 分から 120 分および 0 時間から 24 時間にかけて H2AX のリン酸化レベルを経時的に解析したところ、TRIM29 ノックダウンによって H2AX のリン酸化レベルが全ての時間において低下した (図 2) ³⁾。

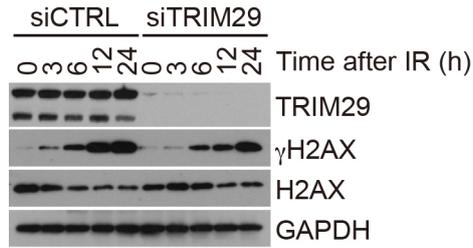


図2. DNA 損傷によって誘導される H2AX に対する TRIM29 ノックダウンの経時的な影響

siCTRL または siTRIM29 を導入した HeLa S3 細胞に 10 Gy の放射線を照射し、0、3、6、12 および 24 時間培養後、各細胞を回収した。TRIM29 をノックダウンさせると H2AX のリン酸化 (γ H2AX) の程度が減少することが判明した。

3. TRIM29 による放射線耐性能への影響

コロニー形成アッセイによって、TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 細胞の放射線耐性能を調べたところ、TRIM29 ノックダウンにより、HeLa S3 細胞の放射線耐性能が低下した (図3)³⁾。

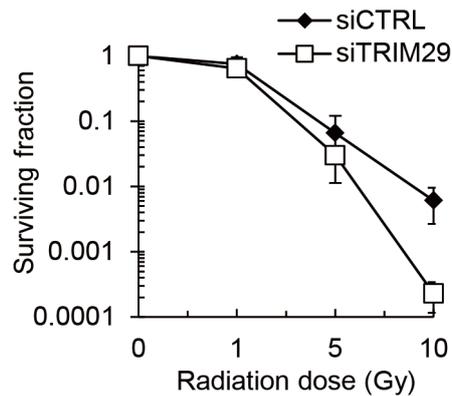


図3. TRIM29 ノックダウンの放射線耐性能に与える影響

コロニー形成アッセイによって、TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 細胞の放射線耐性能を調べた。

4. TRIM29 による細胞浸潤能の制御

基底膜マトリックスによってコーティングされたポリカーボネート膜を用いて、*in vitro*での細胞浸潤アッセイを行った。TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 細胞および SiHa 細胞は浸潤能が低下した (図4)⁴⁾。

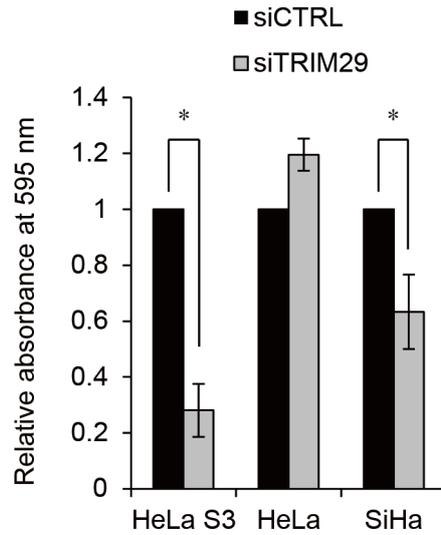


図4. TRIM29 ノックダウンが細胞浸潤能に与える影響

TRIM29 ノックダウン細胞を用いて *in vitro* 細胞浸潤アッセイを行った。3回の独立した実験を行い、Student's *t* 検定によって P 値を求めた (* $p < 0.05$)。

5. TRIM29 による p63 や EMT 関連の転写因子の発現制御

HeLa S3、HeLa および SiHa 細胞に発現している内在性 TRIM29 を RNA 干渉法によってノックダウンし、各遺伝子の mRNA レベルを qRT-PCR により解析した。TRIM29 ノックダウンによって、p63 の mRNA レベルが低下し、ZEB1 の mRNA レベルが上昇した (図 5)。また、SNAIL2 および p53 の mRNA レベルが細胞株依存的に上昇した (図 5) ⁴⁾。

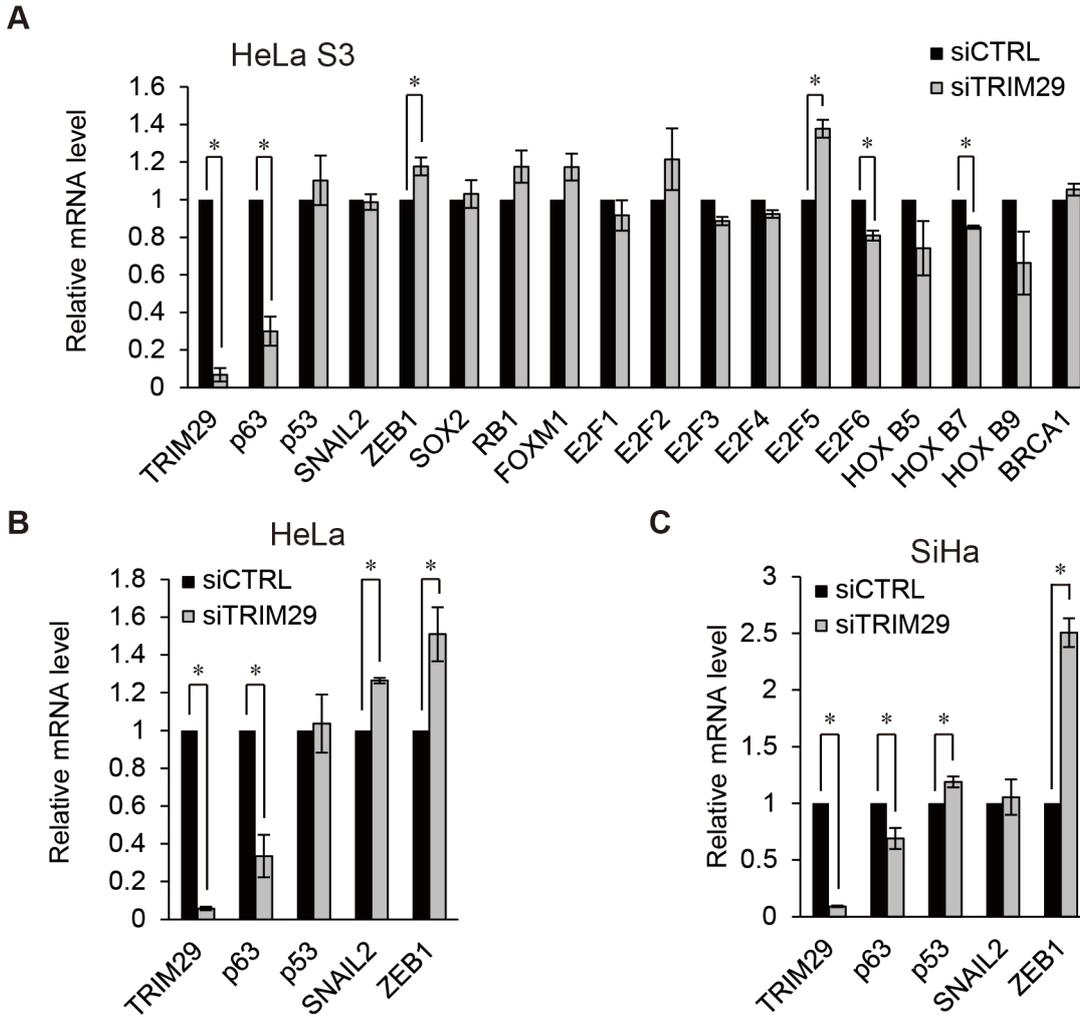


図5. TRIM29 ノックダウンが p63 および EMT 関連転写因子の mRNA レベルに与える影響
 HeLa S3 細胞 (A)、HeLa 細胞 (B) および SiHa 細胞 (C) に siCTRL または siTRIM29 を導入した。48 時間培養後、各細胞から RNA を抽出し、qRT-PCR により各遺伝子の mRNA レベルを解析した。3 回の独立した実験を行い、Student's *t* 検定によって P 値を求めた (**p* < 0.05)。

考 察

本研究により、TRIM29 は DNA 修復タンパク質をクロマチン上に集積させる機能を持つことが明らかになった。TRIM29 はヒストン翻訳後修飾 (PTM) を認識するタンパク質として機能することが示唆された。TRIM29 の molecular scaffold として機能を明らかにするためには、TRIM29 のヒストン PTM の認識機構に関する立体構造解析および生化学的な実験が必要となると考えられる。また、TRIM29、DNA 修復タンパク質およびクロマチンの機能的な相互作用は、DNA 修復経路を活性化するために必要であることが明らかになった。TRIM29 のクロマチンへの結合は、ATM や DNA-PKcs の活性化に関わることが予想されるが、TRIM29 による ATM や DNA-PKcs の活性化メカニズムについての知見を得ることはまだできていない。今後、TRIM29 による DNA 修復タンパク質のクロマチン上への集積および DNA 修復経路の活性化の制御機構についてさらなる検討を行う必要がある。

さらに本研究では、TRIM29 が p63、EMT 関連遺伝子および細胞接着遺伝子の発現制御に関わることを示した。また、TRIM29 は子宮頸がん細胞の接着能および浸潤を制御していることがわかった。以上より、EMT やがん細胞の機能制御における TRIM29 の役割をさらに詳細に解明することは、がんの治療において重要であると思われる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究科の渡部昌である。

文 献

- 1) Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nature Rev. Cancer* 2011;11(11):792-804. doi: 10.1038/nrc3139. PubMed PMID: 21979307.
- 2) Sho T, Tsukiyama T, Sato T, Kondo T, Cheng J, Saku T, Asaka M, Hatakeyama S. TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *BBA-Mol. Cell Res.* 2011;1813(6):1245-53, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.018. PubMed PMID: 21463657.
- 3) Masuda Y, Takahashi H, Sato S, Tomonori-Sato C, Saraf A, Washburn M.P, Florens L, Conaway R.C, Conaway J.W, Hatakeyama S. TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. *Nature Commun* 2015;6:7299, doi: 10.1038/ncomms8299. PubMed PMID: 26095369.
- 4) Masuda Y, Takahashi H, Hatakeyama S. TRIM29 regulates the p63-mediated pathway in cervical cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 2015;1853(10):2296-305, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.035. PubMed PMID: 26071105.