HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	TRIM29によるDNA修復および転写の制御 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	桝田, 安志
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11961号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/60056
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号：2191
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Yasushi_Masuda_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　桝田　安志

学 位 論 文 題 名

TRIM29 による DNA 修復および転写の制御

（TRIM29 regulates DNA repair and transcription）

【背景と目的】TRIM タンパク質は，RING フィンガードメイン，B-box ドメイン及び Coiled-coil ドメインからなる tripartite motif を有しており，ヒトやマウスにおいて 70 種類以上の TRIM 遺伝子が同定されている．TRIM タンパク質のうち，TRIM29 は，常染色体劣性疾患である毛細血管拡張性運動失調症（ataxia telangiectasia: AT）の機能欠損を補う遺伝子として，ヒトのコスミドライブラリーを用いた機能相補実験によって同定された．TRIM29 は，SiHa 細胞，NIH 3T3 細胞や BxPC3 細胞などの放射線耐性の獲得に寄与していることが報告されている．しかしながら，TRIM29 による放射線耐性の制御機構は，まだ十分に解明されていない．また，TRIM29 は，様々ながん細胞の浸潤能や転移能を制御することが示唆されているが，そのメカニズムついては十分に解明されていない．本研究では，どのようにして TRIM29 が放射線耐性とがん細胞の機能を制御しているのかを明らかにすることを目的とした．

【方法】TRIM29 が高発現している HeLa S3 細胞を細胞質，核質およびクロマチン画分に分画し，ウエスタンブロット法によって TRIM29 の細胞内局在を解析した．さらに、免疫染色法によって、TRIM29 の細胞内における分布を解析した．

FLAG タグ付き TRIM29 の安定発現 HeLa S3 細胞を作製し，核抽出液を調製した．抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降によって，核抽出液から FLAG-TRIM29 および結合タンパク質からなるタンパク質複合体を精製した．タンパク質結合実験および質量分析によって，TRIM29 の結合タンパク質の同定を行った．

RNA 干渉法によって HeLa S3 細胞に発現している TRIM29 をノックダウンし，細胞に 10 Gy の放射線を照射した. TRIM29 ノックダウンが DNA 修復開始シグナルの誘導に与える影響をウエスタンブロットによって解析した．また，TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 細胞を 7 日間から 1 週間培養し，形成されたコロニー数から細胞生存率を算出した．

RNA 干渉法によって子宮頸がん細胞に発現している TRIM29 をノックダウンし，細胞接着能および浸潤能に与える影響を in vitro の実験系で解析した．細胞接着アッセイでは，細胞外マトリックスでコーティングされた細胞培養プレートを用いた．細胞浸潤アッセイでは，基底膜マトリックスでコーティングされたポリカーボネート膜を用いた．TRIM29 をノックダウン細胞から RNA を抽出し，TRIM29 ノックダウンが接着能や浸潤能の制御因子

の発現に与える影響を定量 RT-PCR およびウエスタンブロットによって評価した.

【結果】

1. TRIM29 の結合タンパク質の同定

TRIM29 の細胞内局在を解析したところ，TRIM29 はクロマチン上に存在することが明らかとなった．質量分析およびプルダウンアッセイによって，TRIM29 は細胞内において DNA 修復タンパク質や転写制御に関わるタンパク質と結合していることが明らかになった. TRIM29 が直接結合するタンパク質の同定を行ったところ，TRIM29 は DNA ミスマッチ修復タンパク質の 1 つである MSH2 とヒストン H3 に直接結合した．さらに TRIM29 は，転写制御因子である TAp63α，RNA ポリメラーゼ II およびメディエーター複合体に結合することが判明した. TRIM29 複合体のヌクレオソームへの結合は, H3K36me2/3, H4K16Ac および H4K20me2 などのヒストン修飾によって制御されていることが明らかになった.

2. DNA 修復における TRIM29 の役割

DNA 修復における TRIM29 の役割を検証した．TRIM29 ノックダウンは，DNA 修復開始シグナルであるヒストン H2AX のリン酸化レベルを低下させ，細胞の放射線感受性を上昇させた．さらに TRIM29 のクロマチンへの結合は，DNA 損傷に応答したγH2AX の誘導および放射線耐性に必要であることが明らかになった.

3. TRIM29 による細胞接着能および浸潤能の制御

TRIM29 が子宮頸がん細胞の接着能および浸潤能の制御に関わるかを解析した. TRIM29 ノックダウンにより，HeLa S3 および HeLa 細胞の細胞外マトリックスへの結合能を上昇したが，SiHa 細胞の接着能には大きな影響を与えなかった．TRIM29 ノックダウンは，HeLa S3 および SiHa 細胞の浸潤能を低下させたが, HeLa 細胞の浸潤能には大きな影響を与えなかった．また，TRIM29 ノックダウン細胞では，細胞接着分子の発現パターンが変化し，細胞の浸潤能を上昇させる機能を持つ ZEB1 の発現レベルが上昇した.

【考察】TRIM29 は，ヒストン結合タンパク質であり，DNA 修復と転写を制御する分子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，DNA 修復経路の活性化に必要であったことから，DNA 損傷に応答して TRIM29 は DNA 修復タンパク質の機能を活性化させる可能性が示唆された．さらに，TRIM29 は TAp63α，RNA polymerase II およびメディエーター複合体に結合することによって，細胞接着因子や ZEB1 の発現制御に関わることが判明した．TRIM29 がクロマチンに結合することを踏まえると，TRIM29 は細胞接着因子や ZEB1 のプロモーター領域への転写制御因子のリクルートを制御することによって，細胞接着能や浸潤能を制御することが示唆された．DNA 修復やがん細胞の機能制御における TRIM29 の機能の解明は，がんの新たな診断や治療方法の開発に繋がることが期待される。