



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	TRIM39 negatively regulates NF κ B signal through stabilization of Cactin [an abstract of entire text]
Author(s)	鈴木, 正宣
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2155 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11673号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59034
Type	doctoral thesis
File Information	Masanobu_Suzuki_summary.pdf



学位論文(要約)

TRIM39 negatively regulates NF κ B signal through stabilization of Cactin
(TRIM39 は Cactin の安定化を介して、NF κ B シグナルを負に制御する)

2015 年 3 月

北海道大学

鈴木 正宣

【背景と目的】 NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)は、細胞生存決定、免疫反応、炎症、発がん、器官形成などにおいて重要な役割を果たしている転写因子である。この NF κ B シグナルにおいて、ユビキチン化修飾系は重要な役割を果たしている。ユビキチン化は真核生物に存在するタンパク質翻訳後修飾の一つである。ユビキチン化修飾系の中で、ユビキチンリガーゼ E3 は標的タンパク質の認識を司る酵素サブユニットである。ユビキチンリガーゼはこれまでに、ヒトゲノム中に数百以上(全ゲノムの数%以上)存在していることが知られており、その構造によって、HECT (homologous to E6-AP COOH terminus)型、RING (really interesting new gene)型、そして U-box 型に分類される。

ユビキチンリガーゼの中で、RING ドメインを有するタンパク質群のサブファミリーとして、TRIM タンパク質ファミリーの存在が見出されている。TRIM タンパク質はさまざまな細胞機能に関わることが知られており、その変異は発達障害、神経変性疾患、ウイルス感染、発がんなどの多様な疾患と関連していることが知られている。

TRIM39 は TRIM ファミリータンパク質の一つであり、他の TRIM タンパク質と同様 E3 活性を持ち、基質タンパク質のユビキチン化を促進する。TRIM39 によって分解が促進する基質、逆に安定化を受ける基質の存在も報告されている。

TRIM39 の遺伝子は、ゲノム上でヒト 6 番染色体の MHC (major histocompatibility complex) Class I 領域に位置している。同領域には、免疫システムと関連する遺伝子が多数存在している。TRIM タンパク質と自然免疫シグナルには深い関連があり、およそ半数の TRIM タンパク質が免疫システムを制御していることが報告されている²⁹。TRIM39 も、I 型インターフェロンの制御に関与し、TRIM39 遺伝子座のエキソン内に位置する SNP が、ベーチェット病の罹患率に相関することが報告されている³¹。これらの知見から、他の多くの TRIM と同様に TRIM39 も炎症免疫シグナルに影響すると予想されるが、その機能は不明であった。本研究では、TRIM39 の炎症免疫シグナルにおける機能を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

1. 酵母ツーハイブリッド

ヒト TRIM39 遺伝子は大腸菌由来 DNA 結合タンパク質 LexA の DNA 結合ドメインと融合する配列で pBGK ベクターに組み込み酢酸リチウム法により L40 を形質転換させ、NIH3T3 細胞由来 cDNA ライブラリーでさらに形質転換させ、レポーター遺伝子が活性化したときのみ生育可能な選択培地に撒いた。β-ガラクトシダーゼアッセイにて LacZ の発現を誘導しているコロニーのみを選び、prey ベクターを抽出した。prey ベクターにコードされている cDNA の配列を DNA シークエンサーにて解読し、TRIM39 相互作用遺伝子を同定した。

2. 免疫沈降法による結合実験

哺乳類細胞内における TRIM39 と Cactin の相互作用を確認する目的で、免疫沈降法による結合実験を行った。HEK293T 細胞に pCRFLAG-TRIM39 と pcDNA3Myc-Cactin をそれぞれ単独あるいは両方同時にトランスフェクトし、細胞溶解液を調製し、抗 Myc タグ抗体を用いて免疫沈降実験を行った。

3. リコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降法による結合実験

まず、バキュロウイルス/昆虫細胞系を用いて FLAG-TRIM39 と GST-Cactin のリコンビナントタンパク質を作製した。緩衝液に FLAG-TRIM39 と GST-Cactin のリコンビナントタンパク質をそれぞれ単独あるいは両方同時に混合し、抗 FLAG タグ抗体を用いて免疫沈降実験を行った

4. 細胞内タンパク質安定性実験

TRIM39 を過剰発現させた HEK293T 細胞や、RNAi 法で TRIM39 をノックダウンした HEK293T 細胞を、シクロヘキシミド存在下で 0, 3, 6, 9 時間培養した。細胞を回収し、抗 TRIM39 抗体、抗 Cactin 抗体、抗 GAPDH 抗体によってウェスタンブロット解析を行った。

5. ユビキチン化反応実験

ATP 存在下において、リコンビナントユビキチン、リコンビナント E1、E2 と、リコンビナント TRIM39、リコンビナント Cactin を混合し、37°C で 30 分間静置し、抗ユビキチン抗体、抗 Cactin 抗体、抗 FLAG タグ抗体によるウェスタンブロット解析を行った

6. ルシフェラーゼアッセイ

Cactin を過剰発現させた HEK293T 細胞や、RNAi 法で TRIM39 をノックダウンした HEK293T 細胞に、NFκB レポータープラスミド(NAT-Luc)をトランスフェクトした。48 時間後、TNFα (最終濃度 20 ng/ml)を培地に追加し、6 時間培養した後に回収し、ルシフェラーゼシグナルを測定した。

【結果】

ヒト B 細胞 cDNA ライブラリーを用いて TRIM39 結合タンパク質のスクリーニングを行った。形質転換効率は 2.3×10^5 クローンで、3つの陽性クローン(*Cactin*、*Vimentin*、*Influenza virus NS1A binding protein*)を得た。このうち *Cactin* は炎症免疫シグナルへの関与が報告されている遺伝子であったため、この遺伝子に注目して解析を進めることとした。哺乳類細胞内における TRIM39 と Cactin の相互作用を確認する目的で、免疫沈降法による結合実験を行った。その結果、FLAG-TRIM39 と Myc-Cactin が細胞内で相互作用することを確認した。次に、TRIM39 と Cactin の直接相互作用の可能性を明らかにするために、*in vitro* での結合実験を行った。それぞれのリコンビナントタンパク質を作成し、免疫沈降法による結合実験を行った。その結果、FLAG-TRIM39 と GST-Cactin が直接相互作用することが確認できた。

次に、TRIM39 は Cactin の分解を促進し、半減期に影響すると仮説を立て、シクロ

ヘキシミドを用いた細胞内タンパク質安定性実験を行った。観察期間内では Cactin の半減期に変動はなく、安定であった。次に TRIM39 をノックダウンした細胞で、シクロヘキシミドを用いた細胞内タンパク質安定性実験を行った。その結果、コントロールに比べ、siTRIM39 群では、内因性の Cactin が経時的に減少することが確認された。このことから、TRIM39 は Cactin タンパク質を安定化する活性を有すると考えられた。

Cactin は NFκB の制御因子の一つとして報告されており、上記の実験結果から、TRIM39 は Cactin を介して NFκB シグナルの制御に関連するという仮説を立てた。この仮説の検証のため、まず、NFκB シグナルにおける Cactin の機能を評価した。まず、Cactin が実際に NFκB シグナルを制御しているかを確認するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイによる評価を行った。Cactin を過剰発現させた細胞で、TNFα 刺激による NFκB 活性化が抑制された。次に、HEK293T 細胞を TNFα で刺激し、細胞を回収し、リアルタイム PCR 法にて TRIM39 と Cactin の mRNA をコントロール (TNFα 刺激なし) の細胞と比較したところ、Cactin の mRNA が TNFα 刺激によって増加することが確認された。一方、TRIM39 の mRNA の発現に関して有意な変化が見られなかった。次に、タンパク質レベルでの Cactin の変動を検討するために、同様の条件で刺激した細胞をウェスタンブロット法にて評価したところ、TNFα 刺激によって Cactin タンパク質の発現量の増加することが確認された。Cactin は TNFα 刺激による NFκB 活性化を抑制する一方で、TNFα 刺激により発現が誘導された。これらの結果をまとめると、Cactin を介したネガティブフィードバックが存在すると考えられた。

次に、TRIM39 が NFκB シグナルの活性化に与える影響を、ルシフェラーゼアッセイにて評価した。TRIM39 をノックダウンさせた細胞では、TNFα や Poly I:C 刺激による NFκB 活性の亢進が認められた。次に、NFκB の代表的な下流遺伝子である IL-6 と IL-8 の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法にて確認した。TRIM39 をノックダウンすると、TNFα 刺激による IL-6 と IL-8 の mRNA の転写が促進されることが明らかとなり、TRIM39 は NFκB を負に制御していると考えられた。

これらの結果から、TRIM39 は、Cactin タンパク質の安定化を介して NFκB を負に制御するという仮説を立てた。もしこの仮説が正しければ、TRIM39 のノックダウンによって亢進した NFκB 活性は、TRIM39 ノックダウンによって不安定化した Cactin タンパク質の補充によって抑制されることが想定される。そこで TRIM39 をノックダウンした HEK293T 細胞に、さらに Cactin を過剰発現させ、TNFα 刺激による NFκB 活性をルシフェラーゼアッセイで評価した。Cactin を過剰発現させた細胞では、TRIM39 がノックダウンされているにもかかわらず、NFκB 活性は抑制された。これらのことから、NFκB シグナルにおいて Cactin は TRIM39 の下流で機能し、かつ TRIM39 の NFκB 制御は Cactin の安定化に起因するものと考えられた。

【考察】Cactin は NF κ B の制御因子の一つであることが報告されている。ショウジョウバエにおいて、Cactin はヒト I κ B α のオルソログである Cactus と結合するが、ヒト Cactin は、I κ B α とは結合せず I κ BL と結合する。I κ BL 遺伝子は、TRIM39 遺伝子と同様、6 番染色体の MHC 領域に位置する。Cactin は、他にも MHC 領域の遺伝子にコードされるタンパク質、LST1 や NELF-E と相互作用する。TRIM39 は Cactin と共に他のタンパク質と結合し、より大きな複合体として機能している可能性も考えられる。

NF κ B はさまざまな標的遺伝子の転写を促進するが、その中には I κ B α 、A20 や MyD88s などのように NF κ B 活性化を負に制御し、ネガティブフィードバックを形成する因子が存在する。Cactin は TNF α 刺激による NF κ B 活性化を抑制する一方で、TNF α 刺激により発現が誘導されることから、Cactin もまた NF κ B シグナルにおけるネガティブフィードバック経路の一翼を担うものと考えられた。ただし、Cactin や I κ BL による NF κ B 制御の詳細な機序は未だ不明であり、さらなる分子レベルの検討が必要である。

TRIM39 遺伝子のエキソン内に存在する SNP がベーチェット病の発症に関連していることが GWAS 解析で明らかになっている。ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症疾患で、特定の内的遺伝素因のもとに何らかの外的環境要因が働いて発症する多因子疾患と考えられている。ベーチェット病では免疫応答の亢進が報告されていること、本研究において TRIM39 のノックダウンで少なくとも一部の免疫シグナルが亢進していたことを踏まえると、TRIM39 遺伝子内の SNP は TRIM39 遺伝子の発現減少を介して発症の一因となっている可能性が示唆された。また、I κ BL は関節リウマチ、高安病、潰瘍性大腸炎、SLE、シェーグレン症候群、I 型糖尿病、多発性硬化症などの自己免疫炎症性疾患との関連が知られている。TRIM39、Cactin、I κ BL の機能不全は、これらの炎症性疾患の発症に関連している可能性があり、これらの分子の生化学的解析を進めることで、炎症性疾患の病態の解明、新規治療法の開発に結びつく可能性がある。

【結論】 TRIM39 と相互作用するタンパク質として Cactin を同定した。また TRIM39 は Cactin の安定化に関与し、さらに TRIM39 は Cactin を介して NF κ B 活性を負に制御していると考えられた。