



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	TRIM29によるDNA修復および転写の制御
Author(s)	桒田, 安志
Description	配架番号 : 2191
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11961号
Issue Date	2015-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11961
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60409
Type	doctoral thesis
File Information	Yasushi_Masuda.pdf



学位論文

TRIM29 による DNA 修復および転写の制御

(TRIM29 regulates DNA repair and transcription)

2015 年 9 月

北海道大学

梶田 安志

学位論文

TRIM29 による DNA 修復および転写の制御

(TRIM29 regulates DNA repair and transcription)

2015 年 9 月

北海道大学

梶田 安志

発表論文目録および学会発表目録	1
緒言	3
略語一覧	4
第1章 TRIM29 による DNA 修復タンパク質のクロマチンへの集積の制御	
第1節 緒言	6
第2節 実験材料および方法	11
第3節 実験結果	35
第4節 考察	109
第5節 要約	113
第2章 TRIM29 による p63 標的遺伝子の発現制御	
第1節 緒言	114
第2節 実験材料および方法	116
第3節 実験結果	121
第4節 考察	146
第5節 要約	149
総括および結論	150
謝辞	151
参考文献	152

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の学術雑誌に掲載された.

1. TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin

Yasushi Masuda, Hidehisa Takahashi, Shigeo Sato, Chieri Tomomori-Sato, Anita Saraf, Michael P. Washburn, Laurence Florens, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, and Shigetsugu Hatakeyama
Nature communications 6:7299 (2015)

2. TRIM29 regulates the p63-mediated pathway in cervical cancer cells

Yasushi Masuda, Hidehisa Takahashi, Shigetsugu Hatakeyama
BBA - Molecular Cell Research 1853, 2296-2305 (2015)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 梶田 安志, 高橋 秀尚, 畠山 鎮次

TRIM29 による TRRAP/Tip60 複合体の機能制御とがん化との関わり

学会名 : 第 85 回日本生化学会大会

日時 : 2012 年 12 月 14 日~16 日

場所 : 福岡国際会議場/福岡マリンメッセ

2. 梶田 安志, 高橋 秀尚, 松本雅記, 中山敬一, 畠山 鎮次

TRIM29 結合タンパク質複合体の網羅的解析

学会名 : 新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」第 1 回領域会議

日時 : 2013 年 1 月 29 日~30 日

場所 : 淡路島夢舞台国際会議場

3. Yasushi Masuda, Hidehisa Takahashi, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Shigetsugu Hatakeyama

Functional analysis of a novel multiprotein complex containing ataxia telangiectasia group D-complementing (ATDC) gene product, TRIM29

学会名 : 第 35 回内藤コンファレンス

日時 : 2013 年 7 月 9 日~12 日

場所 : シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ

4. Yasushi Masuda, Hidehisa Takahashi, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama
ATDC Regulates DNA Double Strand Break Repair via Phosphorylation of Histone H2AX and Acetylation of Histone H4
学会名：第 50 回日本生化学会北海道支部例会
日時：2013 年 7 月 26 日
場所：北海道大学医学部フラテ会館（フラテホール）

5. Yasushi Masuda, Hidehisa Takahashi, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama
ATDC Regulates DNA Double Strand Break Repair via Phosphorylation of Histone H2AX and Acetylation of Histone H4
学会名：第 86 回日本生化学会大会
日時：2013 年 9 月 11 日～13 日
場所：パシフィコ横浜

6. Yasushi Masuda, Hidehisa Takahashi, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama
ATDC Regulates Phosphorylation of Histone H2AX in Response to DNA Double Strand Breaks
学会名：新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」第 2 回領域会議
日時：2013 年 12 月 11 日～13 日
場所：熱海ニューフジヤホテル

7. 梶田 安志, 高橋 秀尚, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, 畠山 鎮次
TRIM29 はヒストン H2AX のリン酸化を介して DNA 二本鎖切断修復を制御する
学会名：第 87 回日本生化学会大会
日時：2013 年 10 月 15 日～18 日
場所：国立京都国際会館／グランドプリンスホテル京都

緒言

真核生物において、ゲノム DNA はクロマチン構造として細胞核内に折りたたまれている。クロマチン構造は、ヌクレオソームを基本単位として構成されている。ヌクレオソームは、4 種類のヒストンコアタンパク質 H2A, H2B, H3 および H4 をそれぞれ 2 分子ずつ含むヒストンオクタマーに 147bp の DNA が左巻きに巻き付くことによって形成されている¹。ヒストンの N 末端領域はヒストンテールと呼ばれ、細胞内の現象に関連して、アセチル化、メチル化、リン酸化などの様々な翻訳後修飾 (post-translational modification: PTM) を受ける^{2,3}。ヒストンの PTM は、DNA 修復タンパク質、転写調節因子、クロマチン再構成因子などのクロマチンへの足場として機能している^{4,5}。

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³⁸。*TRIM29* は SiHa 細胞などにおいて放射線耐性能の制御に寄与している^{40,41}。また、*TRIM29* は上皮細胞に特異的に発現しており、胃がん、肺がんおよびすい臓がんなどの様々な癌の悪性度と密接に関係している³⁵。*TIP60*, *protein kinase C substrate*, *disheveled-2* や *p53* などが *TRIM29* 結合タンパク質として同定されてきたが⁴¹⁻⁴⁴、どのようにして *TRIM29* が放射線耐性能の制御や癌の悪性度に関わるかはまだ十分に解明されていない。

第 1 章では、*TRIM29* の結合タンパク質を同定し、どのようにして *TRIM29* が細胞の放射線耐性能を制御しているのかを検討した。および DNA 修復経路の活性化との関係を検討した。*TRIM29* は、DNA 修復タンパク質とヒストンに直接結合することが判明した。また、*TRIM29* は、DNA 修復開始シグナルの誘導と放射線耐性の制御に関わることが明らかになった。

第 2 章では、どのようにして *TRIM29* が子宮頸がん細胞の機能を制御しているのかを解析した。*TRIM29* は、RNA polymerase II など遺伝子発現制御に結合することが明らかになった。さらに、*TRIM29* はインテグリンなどの細胞接着因子の発現を制御することによって、がん細胞の接着能や浸潤能を制御していることが判明した。

略語一覧

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

AT: ataxia telangiectasia

ATM: ataxia telangiectasia mutated

BASC: BRCA1-associated surveillance complex

BRCA1: breast cancer susceptibility gene 1

BPB: bromophenol blue

BSA: bovine serum albumin

CTRL: control

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DDR: DNA damage response

DMAP1: DNA methyltransferase 1-associated protein 1

DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium

DNA: deoxyribonucleic acid

DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit

DSB: DNA double strand break

ECM: extracellular matrix

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EMT: epithelial-mesenchymal transition

FBS: fetal bovine serum

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

H3K36me2: di-methylated H3 at lysine 36

H3K36me3: tri-methylated H3 at lysine 36

H4K16Ac: acetylated H4 at lysine 16

H4K20me2: di-methylated H4 at lysine 20

HPV: human papillomavirus

HR: homologous recombination

ING3: inhibitor of growth protein 3

IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IR: ionizing radiation

MLH: MutL homolog 1

MMP: matrix metalloproteinase

MMR: DNA mismatch repair

MNase: micrococcal nuclease

MRE11: meiotic recombination 11

MRN: MRE11–RAD50–NBS1
MSH: MutS homolog
MudPIT: multidimensional protein identification technology
NBS1: Nijmegen breakage syndrome 1
NHEJ: nonhomologous end-joining
NSAF: normalized spectral abundance factor
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PHD: plant homeodomain
PTM: post-translational modification
RING: really interesting new gene
RNA: ribonucleic acid
SDS: sodium dodecylsulfate
SMC: structural maintenance of chromosomes
TRIM: tripartite motif

第1章 TRIM29によるDNA修復タンパク質のクロマチンへの集積の制御

第1節 緒言

第1項 ヒストン翻訳後修飾

真核生物において、ゲノム DNA はクロマチン構造として細胞核内に折りたたまれている。クロマチン構造は、ヌクレオソームを基本単位として構成されている。ヌクレオソームは、4 種類のヒストンコアタンパク質 H2A, H2B, H3 および H4 をそれぞれ 2 分子ずつ含むヒストンオクタマーに 147bp の DNA が左巻きに巻き付くことによって形成されている¹。ヒストンの N 末端領域はヒストンテールと呼ばれ、細胞内の現象に関連して、アセチル化、メチル化、リン酸化などの様々な翻訳後修飾 (post-translational modification: PTM) を受ける^{2,3}。このような複数のヒストン PTM の組み合わせによって細胞の機能が制御されることを、「ヒストンコード仮説」と言う⁶。ヒストン PTM として、リジン残基のメチル化、アルギニン残基のメチル化、リジン残基のアセチル化、セリン残基のリン酸化、リジン残基のユビキチン化などが知られている。ヒストンのメチル化には、非メチル化 (me0)、モノメチル化 (me1)、ジメチル化 (me2)、トリメチル化 (me3) の 4 種類の状態がある。ヒストンの PTM は、DNA 修復タンパク質、転写調節因子、クロマチン再構成因子などのクロマチンへの足場として機能している^{4,5}。

第2項 DNA 二本鎖切断修復

ゲノム DNA の安定性の維持は、生命活動を正常に行うために必要不可欠である。しかしながら、DNA は外的および内的要因によって日常的に損傷している。DNA 損傷の中でも、DNA 二本鎖切断 (DNA double strand break: DSB) は、生物にとって危険度の高い DNA 損傷であり、電離放射線 (ionizing radiation: IR) やアルキル化剤などによって引き起こされる。DSB 修復能力の欠損や低下は、がんや免疫疾患などの様々な疾患を引き起こす⁷。生物はゲノムの安定性を維持するために、DSB を迅速に感知し、DSB 部位に DNA 修復タンパク質を集積させる DNA 修復機構を有している⁸。DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) の初期段階において、MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) 複合体と Ku70-Ku80 複合体が DSB 断端に結合し、ATM と DNA-PKcs と呼ばれるプロテインキナーゼをそれぞれ活性化する^{9,10}。DNA 損傷に応じて活性化された ATM と DNA-PKcs は、ヒストン H2AX の 139 番目のセリン残基をリン酸化する (図 1)¹¹。139 番目のセリン残基がリン酸化された H2AX (γ H2AX) は、クロマチン上で foci と呼ばれる集合体を形成している (図 1)。DNA 修復タンパク質

は、 γ H2AX を足場にして DSB 部位に集積し、相同組換え (homologous recombination: HR) または非相同末端接合 (nonhomologous end-joining: NHEJ) による DSB 修復を促進する^{12,13}.

DSB が発生すると、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ TIP60 は、H4 の 16 番目のリジン残基を選択的にアセチル化し¹⁵、クロマチン構造を緩めることが知られている¹⁴. H4 テールは H2A-H2B ダイマーの表面に存在している acidic patch に結合している¹⁶. したがって、H4 の 16 番目のリジン残基のアセチル化は、H4 テールと acidic patch の結合を阻害することによって、クロマチン構造を緩めると考えられている¹⁶. また、TIP60 は ATM をアセチル化することによって、ATM を活性化することが報告されている¹⁷.

上述の DDR 初期段階において機能するタンパク質に加えて、BRCA1、コヒーシンや DNA ミスマッチ修復タンパク質などのタンパク質も DSB 損傷部位に蓄積し、DSB 修復に関わることが報告されている¹⁸⁻²¹. DNA ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair: MMR) タンパク質は、クロマチン上で ATM と複合体を形成し、DNA 損傷に応答して細胞周期の調整を行っている²². DNA 修復タンパク質は、超高分子量のタンパク質複合体を形成している場合がある. BRCA1 は、ATM、MRN 複合体や DNA ミスマッチ修復タンパク質などと BRCA1-associated surveillance complex (BASC) と呼ばれる複合体を形成している²³. また、TIP60 は、EP400, DMAP1, ING3 などのタンパク質と複合体を形成している²⁴. DNA 修復メカニズムを正常に活性化するためには、DNA 修復タンパク質同士がお互いの機能を制御し、H2AX のリン酸化が正常に行われることが必要不可欠であると言える.

第 3 項 ヒストン翻訳後修飾による DNA 修復経路の制御

H2AX のリン酸化に加えて、H3 や H4 テールの PTM も DNA 修復経路の選択や DNA 修復タンパク質の集積において重要な役割を果たしている^{25,26}. 36 番目のリジン残基がトリメチル化された H3 (H3K36me3) は、DSB 部位への DNA 修復タンパク質の蓄積を促進し、HR 修復を活性化することが知られている²⁷⁻²⁹. また、H3K36me3 は DSB 部位に NBS1 と Ku70 を集積させることによって、NHEJ 修復も誘導する機能も持っている³⁰. MMR タンパク質の一つである MSH6 は、H3K36me3 に結合することによって MMR の制御に関わることが報告されている²⁸. H3K36 のトリメチル化は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ SETD2 によって特異的に行われる³¹. 20 番目のリジン残基がジメチル化された H4 (H4K20me2) は、53BP1 の DSB 部位への蓄積を促進する^{32,33}. 一方で、TIP60 による H4K16Ac は 53BP1 の H4K20me2 への結合を阻害し、BRCA1 の DNA 損傷部位への蓄積を促す³³. したがって、DNA 修復タンパク

質の機能は、ヒストン H3 および H4 の PTM によって複雑に制御されている。

MSH6 や 53BP1 などのメチル化ヒストン結合タンパク質は、ヒストン PTM に特異的に結合するドメインを有している⁴。ヒストンのメチル化リジンは、PWWP ドメイン、Tudor ドメイン、PHD ドメイン、chromo ドメインなどによって認識される⁴。MSH6 と 53BP1 は、それぞれ PWWP ドメインと Tudor ドメインを持つことが立体構造解析によって明らかにされている^{28,34}。PTM 認識ドメインには、芳香族アミノ酸残基によって構成される aromatic cage と呼ばれる認識ポケットが存在する^{4,5}。認識ポケットに存在する芳香族アミノ酸残基の数によって、aromatic cage は”none”, ”half aromatic cage”, ”full aromatic cage” の 3 つに分類することができる^{4,5}。

第 4 項 Tripartite motif (TRIM) protein

TRIM タンパク質は、RING フィンガードドメイン、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³⁵。Tripartite motif は N 末端領域に存在し、各 TRIM タンパク質間において高度に保存されている^{35,36}。一方で、C 末端領域のドメイン構造は多様性に富み、その構造に基づいて 11 のクラスターに分類されている^{35,36}。TRIM タンパク質の多くが、E3 ユビキチンリガーゼ活性を持ち、標的タンパク質のユビキチン化を行う³⁵。ユビキチン化は、タンパク質分解、DNA 修復や転写制御などの様々な生命現象の制御に関連している。TRIM タンパク質における標的タンパク質のユビキチン化には、その RING フィンガードドメインが必要不可欠であるされている³⁷。RING フィンガードドメインの一般的なアミノ酸配列は、Cys-X₂-Cys-X₍₉₋₃₉₎-Cys-X₍₁₋₃₎-His-X₍₂₋₃₎-Cys-X₂-Cys-X₍₄₋₄₈₎-Cys-X₂-Cys とされている³⁷。RING フィンガードドメインは TRIM タンパク質の特徴的なドメインの一つであるが、TRIM14, TRIM16, TRIM20, TRIM29, TRIM44, TRIM51 および TRIM66 には RING フィンガードドメインが存在しない。

第 5 項 TRIM29

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³⁸。*TRIM29* は一般的な RING フィンガードドメインを持たず、C 末端領域においても特定のドメイン構造が保存されていない。AT は神経変性、免疫不全、早老や高発がんなどの多彩な表現型を有する疾患であり、その原因遺伝子として *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) が同定されている³⁹。*ATM* は、SQ/TQ モチーフを有するタンパク質

をリン酸化するプロテインキナーゼであり, DSB 修復経路において機能する²⁵. AT 細胞の機能相補実験の結果と一致して, TRIM29 は SiHa 細胞, NIH 3T3 細胞や BxPC3 細胞において放射線耐性能の制御に寄与していることが報告されている^{40,41}. 本研究室において, Yeast-two hybrid 法を用いたスクリーニングによって, TRIM29 結合タンパク質としてヒストンアセチルトランスフェラーゼである TIP60 が同定されている⁴². 他の研究グループによって, protein kinase C substrate, disheveled-2 や p53 などが TRIM29 結合タンパク質として同定されている⁴¹⁻⁴⁴. これまでも, どのようにして TRIM29 が放射線耐性能の制御に関わるかが解析されてきたが, その分子メカニズムはまだ十分に解明されていない.

第 6 項 本研究の概要

TRIM29 が放射線耐性能の制御に関わることから, TRIM29 は DNA 修復タンパク質の機能を制御しているのではないかと推測した. 本研究では, TRIM29 と DNA 修復の関係を明らかにするために, TRIM29 の結合タンパク質の同定および DNA 修復経路の活性化との関係を検討した. TRIM29 の細胞内局在を解析したところ, 子宮頸がん細胞において TRIM29 はクロマチン上に存在することが明らかとなった. TRIM29 のクロマチン上での機能を予測するために, TRIM29 の結合タンパク質の同定を質量分析およびプルダウンアッセイ法を用いて行った. その結果, TRIM29 は BASC などの DNA 修復タンパク質と複合体を形成し, DNA ミスマッチ修復タンパク質の 1 つである MSH2 と直接結合することが判明した. RNA 干渉法を用いて内在性 TRIM29 をノックダウンした細胞では, DNA 修復開始シグナルである γ H2AX の低下が観察された. また, TRIM29 はヒストンに直接結合し, H3K36me3 を認識することが明らかとなった. TRIM29 のクロマチンへの結合は, γ H2AX の誘導および放射線耐性能の維持に必要であった. 以上の結果から, TRIM29 は H3K36me3 を介してクロマチンに結合し, DNA 修復タンパク質をクロマチンへ集積させることによって, ゲノム安定性の維持に寄与していることが明らかになった.

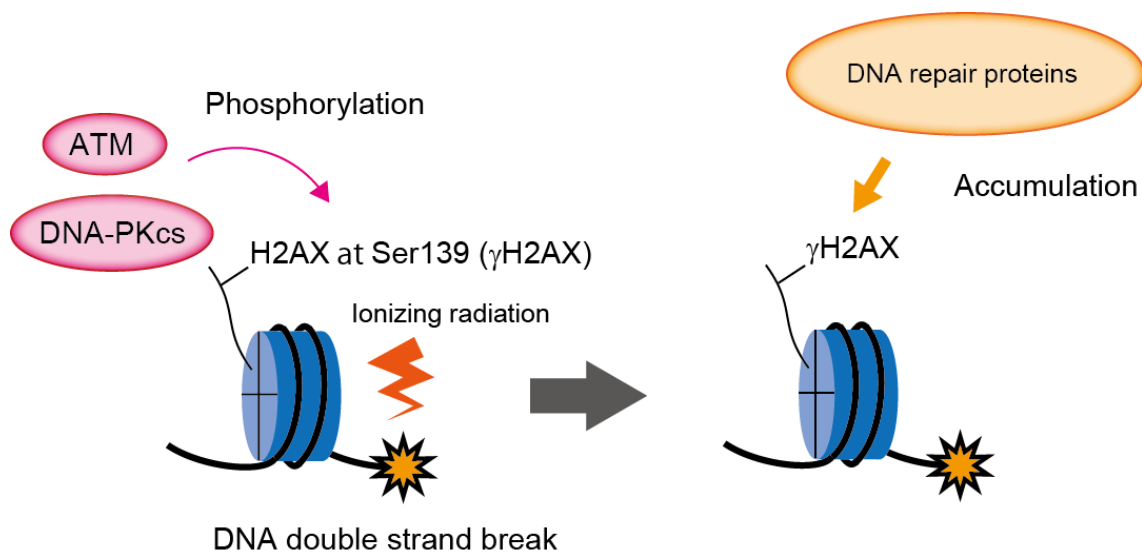


図 1. H2AX のリン酸化による DNA 二本鎖切断修復経路の活性化

DNA 二本鎖切断が生じると，ATM と DNA-PKcs と呼ばれるプロテインキナーゼによって，ヒストン H2AX の 139 番目のセリン残基がリン酸化される．DNA 修復タンパク質は， γ H2AX を足場にして DSB 部位に集積し，DNA 修復経路を活性化する．

第2節 実験材料および方法

第1項 遺伝子

HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを用いて, ヒト由来 *TRIM29* (NM_012101.3), *MSH2* (NM_000251.2), *DMP1* (NM_019100.4), *ING3* (NM_019071.2) および *H2AX* (NM_002105.2) を増幅した. また, 京都大学放射線生物研究センター井倉毅博士より恵与されたヒト由来 *TIP60* cDNA を用いた.

第2項 プラスミドベクター

本研究に用いたプラスミドベクターを以下に示す.

pBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA)

pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA)

pQCXIP (Clontech, Mountain View, CA)

pMXs-puro (Cell BioLabs, San Diego, CA, USA) : 東京大学 北村俊雄教授より供与された.

pEGFP-C2 (Clontech)

pEGFP-N2 (Clontech)

pFastBacHTa (Life Technologies, Gaithersburg, MD)

pColdProS2 (Takara, Shiga, Japan) : 兵庫県立大学 水島恒裕教授より供与された.

第3項 プライマー

プライマーは, Invitrogen 社より購入した.

第4項 PCR (Polymerase chain reaction)

遺伝子断片の増幅には, Tks Gflex DNA Polymerase (Takara) を用いた. PCR の反応液の組成および反応条件を以下に示す.

・反応液の組成

2×Gflex PCR Buffer (2m Mg ²⁺ , 400 μM dNTP)	25 μl
プライマー1	10 pmol
プライマー2	10 pmol
鋳型 DNA	500 ng
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/μl)	1 μl

以上を混合し, 全量が 50 μl になるように滅菌水を加えた.

・反応条件

Step1: 94°C 1 min.
Step2: 98°C 10 sec.
Step3: 60°C 15 sec.
Step4: 68°C 増幅領域 1 kb あたり 30 sec.

Step2 から 4 を 30 サイクル行った。

第 5 項 DNA 断片の精製

第 4 項に従い，PCR による DNA 断片の増幅を行った。また，プラスミドベクターからの DNA 断片の調製は，任意の制限酵素によってプラスミドベクターを 37°C で 1 時間，消化させることで行った。DNA 断片と loading solution (Takara) を混合し，アガロースゲル電気泳動に展開した。0.7% (w/v) のアガロースゲルを用いた。泳動後，UV ルミノメーターを用いて DNA を検出し，DNA が検出された領域のゲルを切り出した。QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて，切り出したゲルからの DNA の精製を行った。ゲル断片を QG buffer (ゲル断片 100 mg に対して 300 µl) に 50°C で溶解し，100% (v/v) イソプロパノール (ゲル断片 100 mg に対して 100 µl) を加えた。混合液を QIAquick spin column にアプライし，13,000 rpm で 1 分間遠心した後，フロースルーを除いた。QIAquick spin column に 500 µl の QG buffer を加え，13,000 rpm で 1 分間遠心した後，フロースルーを捨てた。QIAquick spin column に 750 µl の PE buffer を加え，13,000 rpm で 1 分間遠心した後，フロースルーを捨てた。さらに，QIAquick spin column を 13,000 rpm で 1 分間遠心し，カラムを乾燥させた。QIAquick spin column を 1.5 ml マイクロチューブに移した。QIAquick spin column に EB Buffer を 20 µl 添加した。室温で 1 分間静置した後，QIAquick spin column を 13,000 rpm で 1 分間遠心した。溶出された DNA 溶液を回収した。

第 6 項 クローニング

DNA Ligation Kit (Takara) を用いて，pBluescript II SK へのクローニングを以下のようにして行った。プラスミドベクター 1 µl とインサート DNA 5 µl をモル比が 1:5 になるように混合した。溶液に Ligation solution I を 6 µl 加え，37°C で 1 時間反応させた。反応液を大腸菌 XL-10 コンピテントセルに加え，42°C で 45 秒間処理した。100 µg/ml ampicillin を含む LB プレート上に，1 M IPTG を 20 µl，40 mg/ml X-gal を 40 µl ずつ塗布した。上記の LBA プレートに大腸菌を播種した後，37°C で一晚培養し，青白判定を行った。白いコロニーをピックアップし，2 ml の 2×YT 培地 [1.6% (w/v) Bacto Trypton (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO)，1% (w/v) Yeast Extract (Sigma)，0.5%

(w/v) NaCl (Nacalai Tesque, 京都) で 37°C, 8 時間培養した. 1.5 ml の培養液を 13,000 rpm で 1 分間遠心し, 菌体から mini prep によってプラスミドを回収した.

TA cloning kit (Life Technologies) を用いたクローニングを以下のようにして行った. PCR 後の DNA 断片 10 µl, dATP 1 µl, Taq enzyme 1 µl, PCR buffer 2.5 µl, 滅菌水 10.5 µl を混合し, 72°C で 20 分間反応させた. 反応液 4 ml に TOPO enzyme 1 µl および Salt solution 1 µl を加え, 室温で 5 分間反応させた. 以降の手順は, pBluescript II SK へのクローニングと同様の手順で行った. 解析に用いた各プライマーを表 1 に示す.

第 7 項 Mini prep

培養後の大腸菌液 1.5 ml をマイクロチューブに移し, 13,000 rpm で遠心した. 回収した菌体を Solution I [50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (8.0)] に懸濁した. 溶解液に Solution II [0.2 N NaOH, 1% (w/v) SDS] を 200 µl 加え, 転倒混和した. 混合液に 150 µl の Solution III (3 M KAc) を加え, 均一に混ぜた. 13,200 rpm, 4°C で 5 分間遠心し, 上清を新しいマイクロチューブに移した. 上清に等量の 100% (v/v) イソプロパノールを加え混合し, 13,200 rpm, 4°C で 5 分間遠心した. 上清を捨て, 1 ml の 80% (v/v) エタノールを加え混合し, 13,000 rpm で 2 分間遠心した. DNA ペレットを 50 µg/ml RNase を含む TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA · Na₂) に溶解した.

第 8 項 プラスミドの調製

JETSTAR 2.0 Mini/Midi Kit (GENOMED GmbH, Löhne, Germany)を用いて, トランスフェクション用のプラスミドを精製した. 目的のプラスミドで大腸菌 XL-10 をヒートショック法によって形質転換させた. 大腸菌を 2×YT 培地 (Mini 25 ml, Midi 200 ml) に加えて, 37°C で一晩培養した. 培養液を遠心し, 菌体を回収した. 菌体を E1 buffer (Mini 4 ml, Midi 10 ml) に懸濁した. さらに, E2 buffer (Mini 4 ml, Midi 8 ml) を加えて, 転倒混和した. E3 buffer (Mini 4 ml, Midi 8 ml) を加え, 中和した. 13,000 rpm, 4°C で 20 分間遠心した. Mini の場合は, 上清を新しいマイクロチューブに移し換え, さらに 13,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心した. E4 buffer (Mini 4 ml, Midi 15 ml) で精製カラムを平衡化した. 得られた上清を精製カラムにアプライした. カラムを E5 buffer (Mini 2×2.5 ml, Midi 2×10 ml) で洗浄した. E6 buffer (Mini 0.85 ml, Midi 5 ml) で DNA を溶出した. 溶出液に 100% (v/v) イソプロパノール (Mini 0.65 ml, Midi 3.5 ml) を加え, 13,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心した. 80% (v/v) エタノールを加え, 13,000 rpm で 2 分間遠心した. DNA ペレットを TE buffer に溶解した.

DNA 濃度の測定には，吸光光度計 NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) を用いた．

第 9 項 シークエンス

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いて，プラスミドベクターのシークエンスを行った．反応液の調製および反応条件を以下に示す．

・反応液の組成

Ready Reaction Premix	4 μ l
BigDye Sequencing Buffer	4 μ l
プライマー1	3.2 pmol
鋳型 DNA	400 ng
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/ μ l)	1 μ l

以上を混合し，全量が 20 μ l になるように滅菌水を加えた．

・反応条件

Step1: 96°C	1 min.
Step2: 96°C	10 sec.
Step3: 50°C	5 sec.
Step4: 60°C	4 min.
Step5: 4°C	Hold

Step2 から 4 を 25 サイクル行った．

反応液に 500 mM EDTA (pH 8.0) を 1.6 μ l，100% (v/v) エタノールを 60 μ l 加えて転倒混和した．13,200 rpm，4°C で 20 分間遠心した．マイクロチューブに 80% (v/v) エタノールを 200 μ l 加えて，13,200 rpm，4°C で 10 分間遠心した．得られたペレットを乾燥し，20 μ l のホルムアルデヒドに溶解した．ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif) によって DNA 塩基配列を決定した．

第 10 項 発現ベクターの構築

発現ベクターのサブクローニングは，第 3 項から第 8 項の方法に従って行った．

第 11 項 細胞培養

HEK293T 細胞，plat-E 細胞，HeLa 細胞，HeLa S3 細胞および SiHa 細胞は，10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen)を含む DMEM (Sigma) を用い

て、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。U2OS 細胞は、10% FBS (Invitrogen) を含む McCoy's 5A 培地 (Sigma) を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。Sf9 細胞は、5% FBS を含む Sf-900 II SFM (Invitrogen) を用いて、28°C で培養した。野生型 HeLa S3 細胞および各安定発現 HeLa S3 細胞を浮遊培養する際には、10% FBS を含む Joklik 培地 (Sigma) を用いてスピナーフラスコ内で細胞の培養を行った。

第 12 項 安定発現細胞株の作製

各 cDNA を含む pQCXIP ベクターまたは pMX-puro ベクターを用いてレトロウイルス溶液を調製し、安定発現細胞株の作製を以下のように行った。OPTI-MEM (Invitrogen) 480 μ l に発現ベクター10 μ l (10 μ g) および FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA) 10 μ l を加えて、室温で 15 分間静置した後、293Plat-E 細胞の培地に添加した。細胞を 48 時間培養した後、レトロウイルス溶液を回収し、mCAT を発現させた HeLa S3 細胞または U2OS 細胞の培地に添加した。また、polybrane (Sigma) を終濃度 8 μ g/ml になるように培地に加えた。24 時間培養後、培地を 2 μ g/ml puromycin (Sigma) および 10% FBS (Invitrogen) を含む DMEM 培地 (Sigma) に交換した。Puromycin による薬剤選択後、細胞をまき直し、シングルコロニーをクローンとして回収した。

第 13 項 細胞溶解液の調製

細胞溶解液の調整を以下のように行った。任意の細胞を 150 mM NaCl および 0.5% (v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Hepes buffer (7.9) に溶解した。Sonifier 250 (Branson Ultrasonics, CT, USA) を用いて、得られた溶解液を 10 秒間、超音波破碎 (output control 2, duty cycle 50%) し、13,200 rpm で 10 分間遠心した。得られた上清を細胞溶解液とした。

第 14 項 細胞分画

HeLa S3 細胞、HeLa 細胞および SiHa 細胞の細胞分画を Aygün の方法⁴⁵に従い、以下のように進めた。細胞培養プレートまたはスピナーフラスコを用いて細胞を培養した後、細胞を回収した。得られた細胞ペレットを PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄) で洗浄し、0.5% (v/v) NP-40 を含む Sucrose buffer [340 mM sucrose, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgAc および 0.1 mM EDTA を含む 10 mM Hepes buffer (pH 7.9)] に懸濁した。懸濁液を 4°C で 10 分間振盪した後、1,500 rpm, 4°C で 20 分間遠心した。上清を回収し、細胞質画分とした。得られた細胞核ペレットを Sucrose buffer

に懸濁し, 1,500 rpm, 4°C で 20 分間遠心した. 上清を捨て, 核ペレットを Nucleoplasm extraction buffer [1.5 mM CaCl₂, 150 mM KAc, 3 mM EDTA および 10% (v/v) glycerol を含む 20 mM Hepes buffer (pH 7.9)] に懸濁した. 懸濁液を 4°C で 30 分間振盪し, 15,000 rpm, 4°C で 20 分間遠心した. 上清を回収し, 核質画分とした. 得られたペレットを Nuclease incubation buffer [1.5 mM CaCl₂ および 150 mM KAc を含む 150 mM Hepes buffer (pH 7.9)] に懸濁し, 75 U の benzonase を加え, 4°C で 1 時間振盪した. 懸濁液を 40,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心した. 得られた上清に終濃度が 10% (v/v) になるように glycerol を加え, クロマチン画分とした.

第 15 項 核抽出液の調製

細胞の核抽出液の調整を Dignam 法⁴⁶に従い, 以下のように行った. スピナーフラスコを用いて細胞を大量培養した後, 培養液を 4,000 rpm で 5 分間遠心し, 細胞ペレットを回収した. 得られた細胞ペレットを phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した. 細胞ペレットの 5 倍量の Buffer A [10 mM KCl および 1.5 mM MgCl₂ を含む 10 mM Hepes buffer (pH 7.9)] に細胞ペレットを懸濁し, 氷上で 15 分間静置した. 懸濁液を 1,500 rpm, 4°C で 10 分間遠心し, ペレットの 2 倍量の Buffer A に細胞ペレットを懸濁した. 懸濁液をダウンス型ホモジナイザーに移し, 細胞を破碎した. 細胞をクリスタルバイオレットで染色し, 破碎されているかどうかを確認した. 破碎液を 25,000 ×g, 4°C で 20 分間遠心した. 得られた核ペレットを細胞数 1×10⁹ 個あたり 2.5 ml の Buffer C [25% (v/v) glycerol, 0.2 mM EDTA および 1.5 mM MgCl₂ を含む 20 mM Hepes buffer (pH 7.9)] に懸濁した. 懸濁液をダウンス型ホモジナイザーに移し, NaCl を終濃度 0.42 M になるように加え, 均一に混ぜ合わせた. 懸濁液を 4°C で 1 時間振盪し, 40,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心した. 上清を回収し, 核抽出液とした.

第 16 項 タンパク質の定量

タンパク質を Bradford 法によって定量した. 500 μl の Bio-Rad protein assay 試薬(Bio Rad Laboratories, CA,. USA) に 10 μl のタンパク質溶液を加え, よく混合した. 室温で 4 分間静置した後, 595 nm の吸光度を測定した. 検量線の作成には, 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 および 1.0 mg/ml の BSA 溶液を用いた. 吸光度の測定には, 分光光度計 SmartSpec Plus (Bio Rad) を用いた.

第 17 項 SDS-PAGE

SDS-PAGE を Laemmli の方法⁴⁷に従い行った. ゲルのアクリルアミド濃度を適宜とした. 試料に, 試料用緩衝液 [2% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS),

0.1% (w/v) Bromophenol Blue (BPB), 20% (w/v) glycerol, 2% (v/v) 2-mercaptoethanol, 50mM Tris-HCl buffer (pH 6.8)] を 3 倍希釈になるように加え, 95°C で 3 分間処理し, これを泳動用試料とした. Mini-Protean III (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) を用いて, 厚さ 0.75 mm のゲル 1 枚あたり 200 V の定電圧で行った. 泳動後のゲルのタンパク質染色を 0.25% (w/v) CBB-R250, 50% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid を用いて行った. 脱色には 10% (v/v) acetic acid, 15% (v/v) methanol 溶液を用いた. 分子量マーカーには Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad) を用いた. 銀染色には, 銀染色 II キットワコー (Wako, 大阪) を用いた.

第 18 項 Western blot

第 17 項に従ってタンパク質を SDS-PAGE に展開し, PVDF 膜 (Problott, Applied, Biosystems Perkin Elmer) に転写 (100V, 400 mA, 60 分間) した. 転写後の PVDF 膜を 10% (w/v) non-fat dried milk を含む TBST buffer [20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 150 mM NaCl および 0.05% (v/v) Tween-20] で 30 分間ブロッキングした. 適宜希釈した一次抗体と 4°C で 24 時間反応させた. TBST buffer で PVDF 膜を十分に洗浄した後, 3% (w/v) non-fat dried milk を含む TBST buffer を用いて希釈した二次抗体 horse radish peroxidase (HRP) 標識抗マウス抗体または抗ウサギ抗体を用いて, 一次抗体を室温で 1 時間標識した. TBST buffer で PVDF 膜を十分洗浄した. シグナルの検出には, SuperSignal West Pico, Dura または Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) を用いた. X 線フィルムは, Hyperfilm ECL (8×10 inches) (GE healthcare) を用いた.

第 19 項 抗体

Mouse anti-FLAG は Sigma 社より購入した. Mouse anti-TRIM29 (A-5: sc-166718) は Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA) より購入した. Rabbit anti-H4K20me2 (9759), rabbit anti-histone H3 (4499), mouse anti-MLH1 (3515), rabbit anti-MSH2 (2017), rabbit anti-MSH6 (3996), rabbit anti-ATM (2873), rabbit anti-H3K27me3 (9733), rabbit anti-GST (2622), rabbit anti-histone H2A (2578), rabbit anti-H2AK5Ac (2576), rabbit anti-H2AK119Ub (8240), rabbit anti-γH2AX (9718), rabbit anti-RUVBL1 (12300), rabbit anti-H4K5Ac (9672), rabbit anti-H4K8Ac (2594), rabbit anti-H4K12Ac (2591) および rabbit anti-H4K16Ac (8804) は Cell Signaling Technology 社 (Beverly, MA) より購入した. Rabbit anti-TIP60 (07-038) および rabbit anti-H3K9me3 (07-523) は Millipore 社 (Millipore, Temecula, CA)

より購入した. Mouse anti-BRCA1 (ab16780), rabbit anti-DNA-PKcs (ab32566), rabbit anti-histone H2AX (ab11175), rabbit anti-histone H4 (ab10158), rabbit anti-H3K36me3 (ab9050), rabbit anti-BAF53 (ab3883) および rabbit anti-ING3 (ab84645) は Abcam 社 (Cambridge, UK) より購入した. Rabbit anti-SMC1 (A300-055A) および rabbit anti-SMC3 (A300-060A) は Bethyl Laboratories (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) より購入した. Mouse anti-GAPDH (AM4300) は Ambion 社 (Austin, TX) より購入した.

第 20 項 組換え体タンパク質

Human MSH2 recombinant protein (P01) は Abnova 社 (Taipei, Taiwan) より購入した. Histone Octamer, Recombinant Human (16-0001) および HeLa Mononucleosomes, Purified (16-0002) は EpiCypher 社 (The Woodlands, TX) より購入した. Recombinant *Xenopus laevis* Histone H3K36me3 (MLA) は Active motif 社より購入した.

第 21 項 大腸菌による組換え体タンパク質の作製

FALG タグ付き TRIM29 および HA タグ付き MSH2 の各遺伝子を pCold-ProS2 ベクターにサブクローニングした. ヒットショック法により, 各発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換させた. 形質転換した大腸菌を 100 µg/ml ampicillin を含む 2×YT 培地 5 ml に加え, 37°C で一晚培養した. 培養液を 400 ml の 2×YT 培地に加え, OD600 が 0.5 程度になるまで 37°C, で培養した. OD600 の測定には, 分光光度計 SmartSpec Plus を用いた. OD600 が 0.5 程度になったところで培養液を 30 分間氷冷した. 培養液に IPTG が終濃度 1 mM になるように添加した. 16°C, 200 rpm で一晚培養後, 培養液を 4,000 rpm で 20 分間遠心し, 菌体を回収した. 得られた菌体を Sonifier 250 (Branson Ultrasonics) を用いて 10 秒間超音波破碎 (output control 2, duty cycle 50%) し, 破碎液を 13,000 rpm で 20 分間遠心した. 得られた上清を吸着緩衝液 [40 mM imidazole, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] で平衡化した ProBond Ni-Cheleting Resin (Life Technologies) に加え, 4°C で 1 時間転倒混和した. 吸着緩衝液で担体を洗浄することによって非吸着タンパク質を除去した. 500 mM imidazole, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9) により吸着タンパク質の溶出を行った. Amicon Ultra Centrifuge Filters Ultracel-30K (Millipore) を用いて緩衝液を 150 mM NaCl を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9) に置換した. タンパク質 100 µg あたり 2 units の HRV 3C Protease (Takara) を用いて, His-ProS2

タグの分解を 4°C で一晩行った．吸着緩衝液で平衡化した ProBond Ni-Cheleting Resin を用いて遊離した His-ProS2 タグを除去し，組換え体タンパク質を回収した．

第 22 項 昆虫細胞による組換え体タンパク質の作製

Sf9 細胞を用いて組換え体タンパク質を作製するために，bacmid の調整を以下のようにして行った．FLAG タグ付き TRIM29 の各遺伝子を pFastBac HTa ベクターにサブクローニングした．ヒートショック法によって，発現ベクターを用いて大腸菌 DH10Bac を形質転換させた．大腸菌 DH10Bac を 1 ml の 2×YT 培地に加え，37°C で 4 時間培養した．培養液を遠心し，上清を捨てた．50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamicin および 10 µg/ml tetracycline を含む LB プレート上に，1 M IPTG を 20 µl, 40 mg/ml X-gal を 40 µl ずつ塗布した．上記の LB プレートに大腸菌を播種した後，37°C で一晩培養し，青白判定を行った．白いコロニーをピックアップし，得られた菌体を 50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamicin および 10 µg/ml tetracycline を含む 2 ml の 2×YT 培地に加え，37°C で一晩培養した．Mini prep によって，bacmid を回収した．

Bacmid を用いてバキュロウイルス溶液の調整を行った．6-ウェル細胞培養プレートに Sf9 細胞 (1×10^7 cells/well) を播種した．Sf900 培地を 5 ml とした．OPTI-MEM (Invitrogen) 180 µl に bacmid 10 µl および FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA) 10 µl を加えて，室温で 15 分間静置した．DNA 溶液を培地に添加し，Sf9 細胞を 28°C で 3 から 4 日間培養した．培養上清を回収し，バキュロウイルス溶液 P1 とした．100 mm plastic dish に Sf9 細胞 (1×10^7 cells/well) を播種した．Sf900 培地を 5 ml とした．4 ml の P1 溶液を添加し，Sf9 細胞を 28°C で 3 から 4 日間培養した．培養上清を回収し，バキュロウイルス溶液 P2 とした．150 mm plastic dish に Sf9 細胞 (1×10^8 cells/well) を播種した．Sf900 培地を 10 ml とした．5 ml の P2 溶液を添加し，Sf9 細胞を 28°C で 3 から 4 日間培養した．培養上清を回収し，バキュロウイルス溶液 P3 とした．

Sf9 細胞を用いた組換え体タンパク質の作製は以下のように行った．バキュロウイルス溶液 P3 を Sf9 細胞の培地に加え，28°C で 48 時間培養した．Sf9 細胞を回収し，150 mM NaCl および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9) に細胞を懸濁した．懸濁液を Sonifier 250 (Branson Ultrasonics) を用いて 10 秒間超音波破碎 (output control 2, duty cycle 50%) し，破碎液を 13,200 rpm で 20 分間遠心した．得られた上清に吸着緩衝液 [150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] で平衡化した anti-FLAG M2 Agarose Affinity Gel

(Sigma) を加え、4°C で 1 時間転倒混和した。吸着緩衝液で担体を洗浄することによって非吸着タンパク質を除去した。250 ng/μl の 3×FLAG peptides (Sigma) を含む吸着緩衝液を用いて、吸着タンパク質の溶出を行った。

第 23 項 免疫沈降

核抽出液を用いた免疫沈降を以下のように行った。洗浄緩衝液 [300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] によって anti-M2 agarose を平衡化した。抽出液 1 mg あたり 50 μl の anti-M2 agarose を加え、4°C で 1 時間転倒混和した。担体を洗浄緩衝液で 5 分間洗浄することによって、非吸着タンパク質を除去した。洗浄操作を 5 回行った。担体を溶出緩衝液 [100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA(pH 8.0), 10% (v/v) glycerol および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] で 5 分間洗浄した。次に 3×FLAG peptides (250 ng/μl) を含む溶出緩衝液を用いて、吸着タンパク質を溶出した。

組換え体タンパク質を用いた *in vitro* タンパク質結合実験を以下のように行った。anti-M2 agarose を吸着緩衝液 [150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] で平衡化した。平衡化した anti-M2 agarose に FLAG タグ付きタンパク質溶液を加え、4°C で 1 時間転倒混和した。担体を吸着緩衝液で 5 分間洗浄することによって、非吸着タンパク質を除去した。洗浄操作を 3 回行った後、任意のタンパク質溶液を加え、4°C で 1 時間転倒混和した。担体を洗浄緩衝液で 5 分間洗浄することによって、非吸着タンパク質を除去した。洗浄操作を 3 回行った。250 ng/μl の 3×FLAG peptides を含む吸着緩衝液を用いて、吸着タンパク質を溶出した。

第 24 項 質量分析

多次元タンパク質同定技術 (Multidimensional Protein Identification Technology : MudPIT) を用いたタンパク質同定は、Stowers 研究所の Joan W. Conaway 博士らによって行われた。

第 25 項 DNA 結合実験

転写因子 HNF4a の応答配列を含む pRE×4-MLT ベクター由来の DNA 断片をビオチン化し、Dynabeads (Life Technologies) に結合した⁴⁸。DNA を付加した Dynabeads とタンパク質を各濃度の NaCl を含む吸着緩衝液 [10 mM MgCl₂, 0.1% (v/v) Triton X-100 および 10% (v/v) glycerol を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] に加え、30°C で 30 分間混合した。各濃度の NaCl を含む吸着緩衝液で Dynabeads を十分洗浄し、非吸着タンパク質を除去した。SDS-PAGE

sample buffer を用いて吸着タンパク質を溶出した。

第 26 項 ATP/ADP 結合実験

ATP- または ADP-agarose (Sigma) を 10 mM MgCl_2 または 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む吸着緩衝液 [150 mM NaCl, 0.1% (v/v), Triton X-100 および 10% (v/v) glycerol を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] で平衡化した。組換え体タンパク質と平衡化した担体を 30°C で 30 分間混合した。各吸着緩衝液を用いて非吸着タンパク質を除去し、2 mM ATP を含む吸着緩衝液により吸着タンパク質を溶出した。

第 27 項 Nucleosome pull-down assay

FLAG-TRIM29 の野生型および各変異型の安定発現細胞の細胞核を Dignam 法により調製した。得られた細胞核を 100 U の micrococcal nuclease (Takara) を含む反応緩衝液 [complete protease inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche), 5 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 および 25% (v/v) glycerol を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] に溶解し、室温で 10 分間転倒混和した。反応液を 40,000 rpm で 30 分間遠心し、上清を回収した。タンパク質 10 mg あたり吸着緩衝液 [5 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 0.1% (v/v) Triton X-100 および 10% (v/v) glycerol を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)] で平衡化した anti-FLAG M2 Agarose Affinity Gel を 50 μl を加え、4°C で 1 時間転倒混和した。吸着緩衝液で担体を洗浄し、非吸着タンパク質を除去した。250 ng/ μl の 3×FLAG peptides を含む吸着緩衝液を用いて、吸着タンパク質の溶出を行った。

第 28 項 Histone peptide array analysis

MODified Histone Peptide Array (Active motif, Carlsbad, CA) を用いた Histone peptide array analysis を下記のように行った。10% (w/v) non-fat dried milk を含む TBST buffer を用いて Modified Histone Peptide Array (Active motif) をブロッキングし、300 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 20 mM Hepes buffer (pH 7.9) で十分に洗浄した。任意のタンパク質をペプチドアレイに添加し、4°C で一晩反応させた。ペプチドアレイを TBST buffer により洗浄した後、anti-TRIM29 抗体を加えて 4°C で一晩反応させた。TBST buffer を用いてペプチドアレイを洗浄し、3% (w/v) non-fat dried milk を含む TBST buffer を用いて希釈した 2 次抗体により、1 次抗体を室温で 1 時間標識した。TBST buffer によりペプチドアレイを洗浄後、ECL 試薬を用いてシグナルを検出した。Array Analyze Software (<http://www.activemotif.com/>) を用いてデータ解析を行った。本アレイは、384

通りの組み合わせのヒストン PTM で構成されている．アレイ上に配置されているヒストンペプチドの一覧を表 2 に示す．

第 29 項 siRNA transfection

6・ウェル細胞培養プレート (1×10^5 cells/well) または 10 cm 細胞培養ディッシュ (2×10^6 cells/dish) に細胞を播種し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養した．24 時間後、ペニシリン-ストレプトマイシンを含まない DMEM に交換した．Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies) を用いて 25 nM siRNA ON-TARGETplus human TRIM29 siRNA SMART pool (Dharmacon, Pittsburgh, PA), 25 nM siRNA ON-TARGETplus human MSH2 siRNA SMART pool (Dharmacon) または 25 nM siGENOME NON-TARGETING siRNA Pool #2 (Dharmacon) の導入を行った．siRNA を導入してから 48 時間後、各解析を行った．

TRIM29 mRNA の 3' UTR を標的とした TRIM29 ノックダウンには Accell Non-targeting Pool (Dharmacon) および Accell Human TRIM29 siRNA Individual (Dharmacon) を用いた．任意の細胞を 6・ウェル細胞培養プレート (1×10^5 cells/well) に細胞を播種し、Accell siRNA Delivery Media で培養した．終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるように各 siRNA を培地に加えた．72 時間培養後、各解析を行った．

第 30 項 免疫染色

カバーガラスを 6・ウェル細胞培養プレートに置き、任意の細胞を播種した．培養液を捨て、1 ml の nuclear extraction buffer [20 mM Hepes buffer (pH 7.5), 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.5% IGEPAL (A-630), Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma), Protease Inhibitor Cocktail (Complete, EDTA-free; Roche)] をウェルに加え、 4°C で 20 分間振盪した．溶液を吸引除去し、PBS でカバーガラスを洗浄した．PBS を除去し、カバーガラスが 2-3 mm 浸る程の 4%ホルムアルデヒド を加えた．15 分間室温で振盪し、カバーガラスに細胞を固定した．固定液を吸引除去し、PBS で洗浄した．5% (v/v) ADB (Antibody dilution buffer; 5% normal goat or donkey serum, 0.1% Triton X-100 in PBS) を用いて試料を室温で 60 分間ブロッキングした．5% (v/v) ADB を吸引除去し、5% (v/v) ADB で希釈した一次抗体を加え、 4°C で一晩振盪した．カバーガラスを PBS で十分に洗浄し、5% (v/v) ADB で希釈した蛍光標識二次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた．カバーガラスを PBS で十分に洗浄し、4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) で DNA を 30 分間染色し、カバーガラスを PBS で洗浄した．ガラススライドに ProLong Gold

Antifade Reagent を添加し、カバースリップで覆った。封入剤を室温で一晩硬化させた。共焦点レーザ走査型顕微鏡 FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて共焦点画像を取得した。

第 31 項 IR 照射

IR 照射には、X 線発生装置 MBR-1520R-3 (日立パワーソリューションズ, 茨城) を用いた。管電圧 125 kV, 管電流 15 mA, 線源距離 500 mm に設定し、0.5 mm Al + 0.1 mm Cu のフィルターを使用した。任意の吸収線量 (Gy) の放射線を培養細胞に照射した。

第 32 項 γ H2AX foci 形成アッセイ

TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 細胞をカバースリップ上で培養した。細胞に 10 Gy の IR を照射した。第 29 項に従って、0, 10, 30, 60, 120 分毎に細胞を固定し、 γ H2AX を染色した。共焦点レーザ走査型顕微鏡 FV1000 を用いて共焦点画像を取得した。CellProfiler (<http://www.cellprofiler.org/>) を用いて、1 細胞あたりの γ H2AX foci を計測した。1 細胞あたり 10 個以上の γ H2AX foci を有する細胞を γ H2AX 陽性細胞と定義した。3 回の独立した実験を行い、1 回の解析あたり最低 30 個以上の細胞を解析した。

第 33 項 細胞生存アッセイ

コロニー形成アッセイによる放射線耐性能の評価を次のように行った。任意の細胞を 6 well plate に播種し、任意の吸収線量 (Gy) の放射線を照射した。7 から 10 日間培養後、培養液を捨て、細胞を PBS で洗浄した。4% (v/v) ホルムアルデヒドを加えて、室温で 30 分間固定した。固定された細胞を PBS で洗浄した後、トリパンブルー溶液 (Sigma) で 30 分間染色した。蒸留水で洗浄し、乾燥させた。形成されたコロニー数を計測し、細胞生存率を求めた。細胞生存率は下記の式から求めた。

$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{形成されたコロニー数}}{\text{播種した細胞数} \times \text{コントロール細胞のコロニー形成率}}$$

なお、50 個以上の細胞を含む細胞群をコロニーと定義した。

コロニー形成アッセイによる N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) (関東化学社, 東京) 耐性能の評価を次のように行った。任意の細胞を 6 well plate で培養し、10 μ M MNNG で 2 時間処理した。以降の手順は上述と同様に行った。

第 34 項 ゲル濾過クロマトグラフィー

150 mM NaCl および 10% (v/v) glycerol を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9)を用いて, Superose 6 HR 10/30 fast protein liquid chromatography column (17-0673-01, GE healthcare) を平衡化し, 組換え体タンパク質溶液をカラムにアプライした. 流速を 20 μ l/min に設定し, 65 μ l ずつ分画した. 各画分をウエスタンブロット法によって解析した. Gel Filtration Calibration Kits (High molecular weight, GE healthcare) を用いて, 溶出されたタンパク質の分子量を見積もった.

第 35 項 データベース

遺伝子発現パターンの解析には, RefExA 遺伝子発現データベース (<http://www.lsbm.org/index.html>) を用いた. タンパク質の立体構造情報は, Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) から取得した.

第 36 項 ソフトウェア

ウエスタンブロッティングで検出されたバンドの定量には, NIH ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いた. 画像解析には, CellProfiler (<http://www.cellprofiler.org/>) を用いた. ヒストンペプチドアレイのデータ解析には, Array Analyze Software (<http://www.activemotif.com/>) を用いた. ホモロジーモデリングには, SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) を用いた. タンパク質の立体構造の表示には, PyMOL (<http://www.pymol.org/>) を用いた. マルチプアラインメントの作成には, ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いた. タンパク質の二次構造予測には, PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) を用いた.

表 1. クローニングに用いたプライマー

mRNA	Forward	Reverse
TRIM29 (1-588)	GCGATGGAAGCTGCAGAT	TCATGGGGCTTCGTTGGA
TRIM29 (161-588)	TTTTCACGGTCCAAGTCC	TCATGGGGCTTCGTTGGA
TRIM29 (253-588)	AAGAATCATAGCACCGTG	TCATGGGGCTTCGTTGGA
TRIM29 (394-588)	CCCACCTATCATGTCCTG	TCATGGGGCTTCGTTGGA
TRIM29 (470-588)	AGATACTCCATGTACCTG	TCATGGGGCTTCGTTGGA
TRIM29 (1-359)	GCGATGGAAGCTGCAGAT	CTCATGCAGCACCTTCGGTCT
TRIM29 (1-219)	GCGATGGAAGCTGCAGAT	GTCCCGGATGGGCTCGAG
TRIM29 (1-166)	GCGATGGAAGCTGCAGAT	GCCGGACTTGGACCGTGAAAA
FLAG-TRIM29 (405-430)	ATAGGATCCACCATGGACTACAAGGACGATGA CGATAAGGAGGGCCTGGGACAGTCA	ATAGTCGACCAGGTCCGCCTTGACACAT
D414A/D415A	TTCAAGGCAGCACTGCTCAATGTATGCATG	AGTGATCCGTTGAAGTTCCGTCGTGACGAG
K54A/S55A	GAGGGCGCAGCACTGGGCAGCGCCCTGAAG	GCCCAGTGCTGCGCCCTCAGCTGCCTCCCC
HA-NTD1	ATAGGATCCACCATGTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTATGGCGGTGCAGCCGAAG	ATACTCGAGCTGGCTGAAGTCAAAAGT
HA-NTD2	ATAGGATCCACCATGTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTATGGCGGTGCAGCCGAAG	ATACTCGAGAGGAGAAGCCTTATATGC
HA-CTD	ATAGGATCCACCATGTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTGATTCCAGTGCACAGTTT	ATACTCGAGTCACGTAGTAACTTTTATTCG

表 1. 続き

mRNA	Forward	Reverse
MSH2 (156-159 mutant)	GCAGTTGCAGCAGCAGCACAGGTTGGAGTTGG GTAT	AACCTGTGCTGCTGCTGCAACTGCGGACATTT TAAC
MSH2 (209-212 mutant)	GCTGGAGCAGCAGCAGCACTGAGACAGATAAT TCAA	TCTCAGTGCTGCTGCTGCTCCAGCAGTCTCTC CTCC
MSH2 (246-249 mutant)	TTGTTGGCAGCAGCAGCAGGAGAGCAGATGAA TAGT	CTCTCCTGCTGCTGCTGCCAACAACCGGTTGA GGTC
TIP60	AAGATGGCGGAGGTGGGG	TCCTCACCACTTCCCCCT
DMAP1	CTTCAGGCACTGACCCTTGAC	CCTCTCACGGCTTCTTGGCTT
ING3	GCCGCGATGTTGTACCTAGAAGAC	CAAACAAAAGGACCACCTTTATTT
H2AX	ATAGAATTCTACCTCGCTAGCATGTCGGGC	ATACTCGAGGCCCTCTTAGTACTCCTGGGA
S139A	CAGGCCGCCAGGAGTACTAAGAGGGC	CTCCTGGGCGGCCTGGGTGGCCTTCTT

表 2. ヒストンペプチドアレイの一覧

Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4	Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4
A 1	H3 1-19	unmod				B 1	H3 1-19	R2me2a	T3P		
A 2	H3 1-19	R2me2s				B 2	H3 1-19	R2me2a	K4me1		
A 3	H3 1-19	R2me2a				B 3	H3 1-19	R2me2a	K4me2		
A 4	H3 1-19	R2Citr				B 4	H3 1-19	R2me2a	K4me3		
A 5	H3 1-19	T3P				B 5	H3 1-19	R2me2a	K4ac		
A 6	H3 1-19	K4me1				B 6	H3 1-19	R2Citr	T3P		
A 7	H3 1-19	K4me2				B 7	H3 1-19	R2Citr	K4me1		
A 8	H3 1-19	K4me3				B 8	H3 1-19	R2Citr	K4me2		
A 9	H3 1-19	K4ac				B 9	H3 1-19	R2Citr	K4me3		
A10	H3 1-19	R8me2s				B10	H3 1-19	R2Citr	K4ac		
A11	H3 1-19	R8me2a				B11	H3 1-19	T3P	K4me1		
A12	H3 1-19	R8Citr				B12	H3 1-19	T3P	K4me2		
A13	H3 1-19	K9me1				B13	H3 1-19	T3P	K4me3		
A14	H3 1-19	K9me2				B14	H3 1-19	T3P	K4ac		
A15	H3 1-19	K9me3				B15	H3 1-19	R2me2s	T3P	K4me1	
A16	H3 1-19	K9ac				B16	H3 1-19	R2me2s	T3P	K4me2	
A17	H3 1-19	S10P				B17	H3 1-19	R2me2s	T3P	K4me3	
A18	H3 1-19	T11P				B18	H3 1-19	R2me2s	T3P	K4ac	
A19	H3 1-19	K14ac				B19	H3 1-19	R2me2a	T3P	K4me1	
A20	H3 1-19	R2me2s	T3P			B20	H3 1-19	R2me2a	T3P	K4me2	
A21	H3 1-19	R2me2s	K4me1			B21	H3 1-19	R2me2a	T3P	K4me3	
A22	H3 1-19	R2me2s	K4me2			B22	H3 1-19	R2me2a	T3P	K4ac	
A23	H3 1-19	R2me2s	K4me3			B23	H3 1-19	R8me2s	K9me1		
A24	H3 1-19	R2me2s	K4ac			B24	H3 1-19	R8me2s	K9me2		

表 2. 続き

Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4	Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4
C 1	H3 1-19	R8me2s	K9me3			D 1	H3 1-19	K9me3	K14ac		
C 2	H3 1-19	R8me2s	K9ac			D 2	H3 1-19	K9ac	S10P		
C 3	H3 1-19	R8me2s	S10P			D 3	H3 1-19	K9ac	T11P		
C 4	H3 1-19	R8me2s	T11P			D 4	H3 1-19	K9ac	K14ac		
C 5	H3 1-19	R8me2a	K9me1			D 5	H3 1-19	S10P	T11P		
C 6	H3 1-19	R8me2a	K9me2			D 6	H3 1-19	S10P	K14ac		
C 7	H3 1-19	R8me2a	K9me3			D 7	H3 1-19	T11P	K14ac		
C 8	H3 1-19	R8me2a	K9ac			D 8	H3 1-19	R8me2s	K9me1	S10P	
C 9	H3 1-19	R8me2a	S10P			D 9	H3 1-19	R8me2s	K9me2	S10P	
C10	H3 1-19	R8me2a	T11P			D10	H3 1-19	R8me2s	K9me3	S10P	
C11	H3 1-19	R8Citr	K9me1			D11	H3 1-19	R8me2s	K9ac	S10P	
C12	H3 1-19	R8Citr	K9me2			D12	H3 1-19	R8me2s	K9me1	T11P	
C13	H3 1-19	R8Citr	K9me3			D13	H3 1-19	R8me2s	K9me2	T11P	
C14	H3 1-19	R8Citr	K9ac			D14	H3 1-19	R8me2s	K9me3	T11P	
C15	H3 1-19	R8Citr	S10P			D15	H3 1-19	R8me2s	K9ac	T11P	
C16	H3 1-19	R8Citr	T11P			D16	H3 1-19	R8me2a	K9me1	S10P	
C17	H3 1-19	K9me1	S10P			D17	H3 1-19	R8me2a	K9me2	S10P	
C18	H3 1-19	K9me1	T11P			D18	H3 1-19	R8me2a	K9me3	S10P	
C19	H3 1-19	K9me1	K14ac			D19	H3 1-19	R8me2a	K9ac	S10P	
C20	H3 1-19	K9me2	S10P			D20	H3 1-19	R8me2a	K9me1	T11P	
C21	H3 1-19	K9me2	T11P			D21	H3 1-19	R8me2a	K9me2	T11P	
C22	H3 1-19	K9me2	K14ac			D22	H3 1-19	R8me2a	K9me3	T11P	
C23	H3 1-19	K9me3	S10P			D23	H3 1-19	R8me2a	K9ac	T11P	
C24	H3 1-19	K9me3	T11P			D24	H3 1-19	R8me2a	K9me1	S10P	T11P

表 2. 続き

Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4	Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4
E 1	H3 1-19	R8me2a	K9me2	S10P	T11P	F 1	H3 1-19	R2me2a	K4me2	K9ac	
E 2	H3 1-19	R8me2a	K9me3	S10P	T11P	F 2	H3 1-19	R2me2a	K4me3	K9ac	
E 3	H3 1-19	R8me2a	K9ac	S10P	T11P	F 3	H3 1-19	R2me2a	K4ac	K9ac	
E 4	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2s		F 4	H3 1-19	K4me1	R8me2s	K9me1	
E 5	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2s		F 5	H3 1-19	K4me2	R8me2s	K9me1	
E 6	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2s		F 6	H3 1-19	K4me3	R8me2s	K9me1	
E 7	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2s		F 7	H3 1-19	K4ac	R8me2s	K9me1	
E 8	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2a		F 8	H3 1-19	K4me1	R8me2a	K9me1	
E 9	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2a		F 9	H3 1-19	K4me2	R8me2a	K9me1	
E10	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2a		F10	H3 1-19	K4me3	R8me2a	K9me1	
E11	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2a		F11	H3 1-19	K4ac	R8me2a	K9me1	
E12	H3 1-19	R2me2s	K4me1	K9me1		F12	H3 1-19	K4me1	R8me2s	K9me2	
E13	H3 1-19	R2me2s	K4me2	K9me1		F13	H3 1-19	K4me2	R8me2s	K9me2	
E14	H3 1-19	R2me2s	K4me3	K9me1		F14	H3 1-19	K4me3	R8me2s	K9me2	
E15	H3 1-19	R2me2s	K4ac	K9me1		F15	H3 1-19	K4ac	R8me2s	K9me2	
E16	H3 1-19	R2me2a	K4me1	K9me2		F16	H3 1-19	K4me1	R8me2a	K9me2	
E17	H3 1-19	R2me2a	K4me2	K9me2		F17	H3 1-19	K4me2	R8me2a	K9me2	
E18	H3 1-19	R2me2a	K4me3	K9me2		F18	H3 1-19	K4me3	R8me2a	K9me2	
E19	H3 1-19	R2me2a	K4ac	K9me2		F19	H3 1-19	K4ac	R8me2a	K9me2	
E20	H3 1-19	R2me2s	K4me1	K9me3		F20	H3 1-19	K4me1	R8me2s	K9me3	
E21	H3 1-19	R2me2s	K4me2	K9me3		F21	H3 1-19	K4me2	R8me2s	K9me3	
E22	H3 1-19	R2me2s	K4me3	K9me3		F22	H3 1-19	K4me3	R8me2s	K9me3	
E23	H3 1-19	R2me2s	K4ac	K9me3		F23	H3 1-19	K4ac	R8me2s	K9me3	
E24	H3 1-19	R2me2a	K4me1	K9ac		F24	H3 1-19	K4me1	R8me2a	K9me3	

表 2. 続き

Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4	Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4
G 1	H3 1-19	K4me2	R8me2a	K9me3		H 1	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2s	K9me2
G 2	H3 1-19	K4me3	R8me2a	K9me3		H 2	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2s	K9me2
G 3	H3 1-19	K4ac	R8me2a	K9me3		H 3	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2s	K9me2
G 4	H3 1-19	K4me1	R8me2s	K9ac		H 4	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2s	K9me3
G 5	H3 1-19	K4me2	R8me2s	K9ac		H 5	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2s	K9me3
G 6	H3 1-19	K4me3	R8me2s	K9ac		H 6	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2s	K9me3
G 7	H3 1-19	K4ac	R8me2s	K9ac		H 7	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2s	K9me3
G 8	H3 1-19	K4me1	R8me2a	K9ac		H 8	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2s	K9me3
G 9	H3 1-19	K4me2	R8me2a	K9ac		H 9	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2s	K9me3
G10	H3 1-19	K4me3	R8me2a	K9ac		H10	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2s	K9me3
G11	H3 1-19	K4ac	R8me2a	K9ac		H11	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2s	K9me3
G12	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2s	K9me1	H12	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2s	K9ac
G13	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2s	K9me1	H13	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2s	K9ac
G14	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2s	K9me1	H14	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2s	K9ac
G15	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2s	K9me1	H15	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2s	K9ac
G16	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2s	K9me1	H16	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2s	K9ac
G17	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2s	K9me1	H17	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2s	K9ac
G18	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2s	K9me1	H18	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2s	K9ac
G19	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2s	K9me1	H19	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2s	K9ac
G20	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2s	K9me2	H20	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2a	K9me1
G21	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2s	K9me2	H21	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2a	K9me1
G22	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2s	K9me2	H22	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2a	K9me1
G23	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2s	K9me2	H23	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2a	K9me1
G24	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2s	K9me2	H24	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2a	K9me1

表 2. 続き

Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4	Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4
I 1	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2a	K9me1	J 1	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2a	K9ac
I 2	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2a	K9me1	J 2	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2a	K9ac
I 3	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2a	K9me1	J 3	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2a	K9ac
I 4	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2a	K9me2	J 4	H3 7-26	unmod			
I 5	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2a	K9me2	J 5	H3 7-26	K14ac			
I 6	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2a	K9me2	J 6	H3 7-26	K14ac	S10P		
I 7	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2a	K9me2	J 7	H3 7-26	K14ac	T11P		
I 8	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2a	K9me2	J 8	H3 7-26	R17me2s			
I 9	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2a	K9me2	J 9	H3 7-26	R17me2a			
I10	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2a	K9me2	J10	H3 7-26	R17Citr			
I11	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2a	K9me2	J11	H3 7-26	K18ac			
I12	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2a	K9me3	J12	H3 7-26	K14ac	R17me2s		
I13	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2a	K9me3	J13	H3 7-26	K14ac	R17me2a		
I14	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2a	K9me3	J14	H3 7-26	K14ac	K18ac		
I15	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2a	K9me3	J15	H3 7-26	R17me2s	K18ac		
I16	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2a	K9me3	J16	H3 7-26	R17me2a	K18ac		
I17	H3 1-19	R2me2a	K4me2	R8me2a	K9me3	J17	H3 7-26	R17Citr	K18ac		
I18	H3 1-19	R2me2a	K4me3	R8me2a	K9me3	J18	H3 7-26	K14ac	R17me2s	K18ac	
I19	H3 1-19	R2me2a	K4ac	R8me2a	K9me3	J19	H3 7-26	K14ac	R17me2a	K18ac	
I20	H3 1-19	R2me2s	K4me1	R8me2a	K9ac	J20	H3 16-35	unmod			
I21	H3 1-19	R2me2s	K4me2	R8me2a	K9ac	J21	H3 16-35	R26me2s			
I22	H3 1-19	R2me2s	K4me3	R8me2a	K9ac	J22	H3 16-35	R26me2a			
I23	H3 1-19	R2me2s	K4ac	R8me2a	K9ac	J23	H3 16-35	R26Citr			
I24	H3 1-19	R2me2a	K4me1	R8me2a	K9ac	J24	H3 16-35	K27me1			

表 2. 続き

Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4	Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4
K 1	H3 16-35	K27me2				L 1	H3 16-35	R26me2s	K27me3	S28P	
K 2	H3 16-35	K27me3				L 2	H3 16-35	R26me2s	K27ac	S28P	
K 3	H3 16-35	K27ac				L 3	H3 16-35	R26me2a	K27me1	S28P	
K 4	H3 16-35	S28P				L 4	H3 16-35	R26me2a	K27me2	S28P	
K 5	H3 16-35	R26me2s	K27me1			L 5	H3 16-35	R26me2a	K27me3	S28P	
K 6	H3 16-35	R26me2s	K27me2			L 6	H3 16-35	R26me2a	K27ac	S28P	
K 7	H3 16-35	R26me2s	K27me3			L 7	H3 26-45	unmod			
K 8	H3 16-35	R26me2s	K27ac			L 8	H3 26-45	K36me1			
K 9	H3 16-35	R26me2s	S28P			L 9	H3 26-45	K36me2			
K10	H3 16-35	R26me2a	K27me1			L10	H3 26-45	K36me3			
K11	H3 16-35	R26me2a	K27me2			L11	H3 26-45	K36ac			
K12	H3 16-35	R26me2a	K27me3			L12	H4 1-19	unmod			
K13	H3 16-35	R26me2a	K27ac			L13	H4 1-19	S1P			
K14	H3 16-35	R26me2a	S28P			L14	H4 1-19	R3me2s			
K15	H3 16-35	R26Citr	K27me1			L15	H4 1-19	R3me2a			
K16	H3 16-35	R26Citr	K27me2			L16	H4 1-19	K5ac			
K17	H3 16-35	R26Citr	K27me3			L17	H4 1-19	K8ac			
K18	H3 16-35	R26Citr	S28P			L18	H4 1-19	K12ac			
K19	H3 16-35	K27me1	S28P			L19	H4 1-19	K16ac			
K20	H3 16-35	K27me2	S28P			L20	H4 1-19	S1P	R3me2s		
K21	H3 16-35	K27me3	S28P			L21	H4 1-19	S1P	R3me2a		
K22	H3 16-35	K27ac	S28P			L22	H4 1-19	S1P	K5ac		
K23	H3 16-35	R26me2s	K27me1	S28P		L23	H4 1-19	R3me2s	K5ac		
K24	H3 16-35	R26me2s	K27me2	S28P		L24	H4 1-19	R3me2s	K8ac		

表 2. 続き

Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4	Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4
M 1	H4 1-19	R3me2a	K5ac			N 1	H4 11-30	K20me1			
M 2	H4 1-19	R3me2a	K8ac			N 2	H4 11-30	K20me2			
M 3	H4 1-19	K5ac	K8ac			N 3	H4 11-30	K20me3			
M 4	H4 1-19	K8ac	K12ac			N 4	H4 11-30	K20ac			
M 5	H4 1-19	K8ac	K16ac			N 5	H4 11-30	R24me2a			
M 6	H4 1-19	K12ac	K16ac			N 6	H4 11-30	R24me2s			
M 7	H4 1-19	S1P	R3me2s	K5ac		N 7	H4 11-30	K12ac	K16ac		
M 8	H4 1-19	S1P	R3me2a	K5ac		N 8	H4 11-30	K16ac	R17me2s		
M 9	H4 1-19	R3me2s	K5ac	K8ac		N 9	H4 11-30	K16ac	R17me2a		
M10	H4 1-19	R3me2a	K5ac	K8ac		N10	H4 11-30	K16ac	R19me2s		
M11	H4 1-19	K5ac	K8ac	K12ac		N11	H4 11-30	K16ac	R19me2a		
M12	H4 1-19	K8ac	K12ac	K16ac		N12	H4 11-30	K16ac	K20me1		
M13	H4 1-19	S1P	R3me2s	K5ac	K8ac	N13	H4 11-30	K16ac	K20me2		
M14	H4 1-19	S1P	R3me2a	K5ac	K8ac	N14	H4 11-30	K16ac	K20me3		
M15	H4 1-19	R3me2s	K5ac	K8ac	K12ac	N15	H4 11-30	K16ac	K20ac		
M16	H4 1-19	R3me2a	K5ac	K8ac	K12ac	N16	H4 11-30	K12ac	K16ac	K20me1	
M17	H4 1-19	K5ac	K8ac	K12ac	K16ac	N17	H4 11-30	K12ac	K16ac	K20me2	
M18	H4 11-30	unmod				N18	H4 11-30	K12ac	K16ac	K20me3	
M19	H4 11-30	K12ac				N19	H4 11-30	K12ac	K16ac	K20ac	
M20	H4 11-30	K16ac				N20	H4 11-30	R19me2a	K20me1		
M21	H4 11-30	R17me2s				N21	H4 11-30	R19me2a	K20me2		
M22	H4 11-30	R17me2a				N22	H4 11-30	R19me2a	K20me3		
M23	H4 11-30	R19me2s				N23	H4 11-30	R19me2a	K20ac		
M24	H4 11-30	R19me2a				N24	H4 11-30	R19me2s	K20me1		

表 2. 続き

Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4	Location	Name	Mod1	Mod2	Mod 3	Mod 4
O 1	H4 11-30	R19me2s	K20me2			P 1	H2a 1-19	S1P	K9ac	K13ac	
O 2	H4 11-30	R19me2s	K20me3			P 2	H2a 1-19	K5ac	K9ac	K13ac	
O 3	H4 11-30	R19me2s	K20ac			P 3	H2a 1-19	S1P	K5ac	K9ac	K13ac
O 4	H4 11-30	R24me2a	K20me1			P 4	H2B 1-19	unmod			
O 5	H4 11-30	R24me2a	K20me2			P 5	H2B 1-19	K5ac			
O 6	H4 11-30	R24me2a	K20me3			P 6	H2B 1-19	K12ac			
O 7	H4 11-30	R24me2a	K20ac			P 7	H2B 1-19	S14P			
O 8	H4 11-30	R24me2s	K20me1			P 8	H2B 1-19	K15ac			
O 9	H4 11-30	R24me2s	K20me2			P 9	H2B 1-19	K5ac	K12ac		
O10	H4 11-30	R24me2s	K20me3			P10	H2B 1-19	K5ac	S14P		
O11	H4 11-30	R24me2s	K20ac			P11	H2B 1-19	K5ac	K15ac		
O12	H2a 1-19	unmod				P12	H2B 1-19	K12ac	S14P		
O13	H2a 1-19	S1P				P13	H2B 1-19	K12ac	K15ac		
O14	H2a 1-19	K5ac				P14	H2B 1-19	S14P	K15ac		
O15	H2a 1-19	K9ac				P15	H2B 1-19	K5ac	K12ac	S14P	
O16	H2a 1-19	K13ac				P16	H2B 1-19	K5ac	K12ac	K15ac	
O17	H2a 1-19	S1P	K5ac			P17	H2B 1-19	K5ac	S14P	K15ac	
O18	H2a 1-19	S1P	K9ac			P18	H2B 1-19	K12ac	S14P	K15ac	
O19	H2a 1-19	S1P	K13ac			P19	H2B 1-19	K5ac	K12ac	S14P	K15ac
O20	H2a 1-19	K5ac	K9ac			P20	Biotin				
O21	H2a 1-19	K5ac	K13ac			P21	c-myc tag				
O22	H2a 1-19	K9ac	K13ac			P22	neg. control				
O23	H2a 1-19	S1P	K5ac	K9ac		P23	background 01				
O24	H2a 1-19	S1P	K5ac	K13ac		P24	background 02				

第 3 節 実験結果

第 1 項 TRIM29 の細胞内局在

RefExA 遺伝子発現データベース (<http://www.lsbm.org/index.html>) では, TRIM29 は扁平上皮細胞に高発現していることが示された. TRIM29 が発現している細胞株を明らかにするために, 293T 細胞, U2OS 細胞, HeLa 細胞, HeLa S3 細胞および SiHa 細胞における TRIM29 の発現レベルをウェスタンブロット法によって解析した. 扁平上皮細胞株 (HeLa 細胞, HeLa S3 細胞および SiHa 細胞) において高発現していたが, 胎児腎上皮細胞株 293T 細胞および骨肉腫細胞株 U2OS 細胞においては発現レベルが低かった (図). U2OS 細胞に TRIM29 を一過的に強制発現させると, TRIM29 は細胞質に存在することが報告されている⁴⁹. しかしながら, これまでに内在性 TRIM29 の細胞内局在は十分には解析されていなかった. そこで, HeLa S3 細胞, HeLa 細胞および SiHa 細胞を細胞質, 核質およびクロマチン画分に分画し, ウェスタンブロット法によって TRIM29 の細胞内局在を解析した. TRIM29 は, すべての細胞株においてクロマチン画分に存在し, 全長 (分子量 65,000) および分子量 50,000 のバンドを確認した (図 3). TRIM29 には, 内部開始コドン (143 番目のメチオニン残基) から生成されるアイソフォームが存在する⁵⁰. 使用した抗体が TRIM29 のアミノ酸残基 289 番から 588 番の配列を認識することを踏まえると, 検出された分子量 50,000 のタンパク質は, 内部開始コドンから翻訳された N 末端欠損型の TRIM29 アイソフォームであると考えられた.

免疫染色法によって, HeLa S3 細胞における TRIM29 のクロマチン上での分布を解析した. TRIM29 のクロマチン上での分布は, DAPI で染色された領域と一致した (図 4). RNA 干渉法によって, TRIM29 の蛍光シグナルが DAPI で染色された領域から消失するかどうかを調べた. TRIM29 をノックダウンした細胞では, DAPI で染色される領域から TRIM29 の蛍光シグナルが消失した (図 5). さらに, TRIM29 を間葉系細胞に強制発現させた場合に, TRIM29 がクロマチン上に局在するかどうかを解析した. C 末端側に EGFP をタグ付けした TRIM29-EGFP を安定に発現する HeLa S3 細胞および U2OS 細胞を作製し, 共焦点顕微鏡を用いて解析した. TRIM29-EGFP は, HeLa S3 細胞においてはクロマチン上に存在したが, U2OS 細胞では細胞質に存在した (図 6). また, NP-40 を含む緩衝液で細胞質画分を除去した場合には, TRIM29-EGFP は HeLa S3 細胞においてはクロマチン上に存在したが, U2OS 細胞ではシグナルを検出することができなかった (図 6). 以上の結果から, TRIM29 は HeLa S3 細胞において核内に局在するタンパク質であることが明らかになった.

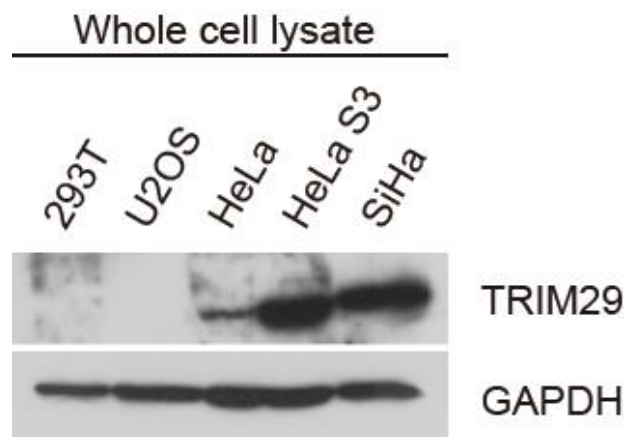


図 2. 培養細胞における TRIM29 の発現パターン解析

293T 細胞, U2OS 細胞, HeLa 細胞, HeLa S3 細胞および SiHa 細胞の溶解液 10 μ g を SDS-PAGE に展開し, 抗 TRIM29 抗体を使用したウエスタンブロッティングによって解析した. ローディングコントロールとして, GAPDH を用いた.

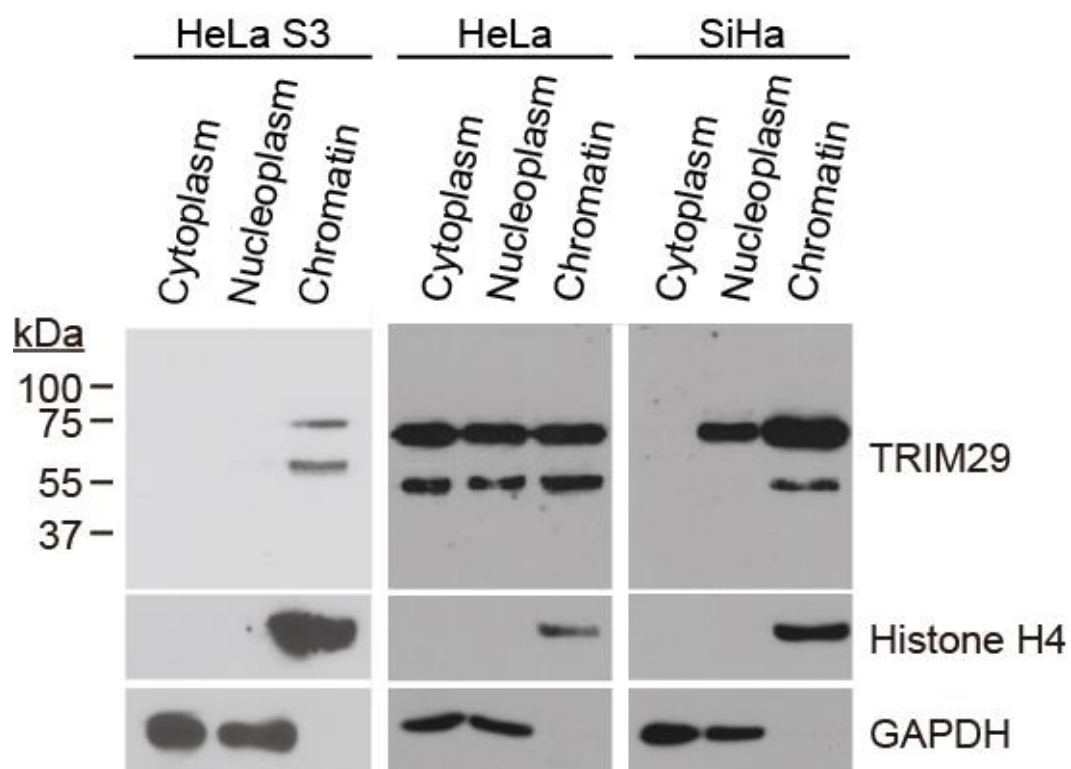


図 3. TRIM29 の細胞内局在の解析

HeLa S3 細胞, HeLa 細胞および SiHa 細胞を細胞質, 核質およびクロマチンに分画した. 各画分を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した. H4 (クロマチン分画) および GAPDH (細胞質分画) を各画分のマーカータンパク質として用いた.

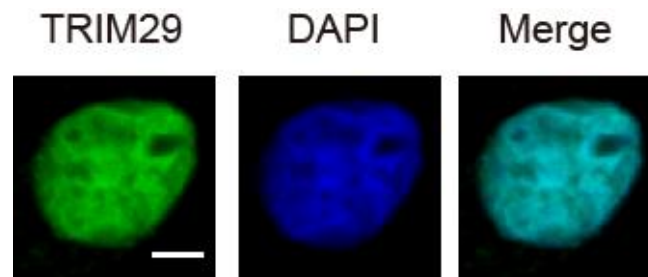


図 4. HeLa S3 細胞における TRIM29 のクロマチン上での分布

HeLa S3 細胞をカバーガラス上で培養し，固定した．内在性 TRIM29 を抗 TRIM29 抗体で標識し，共焦点顕微鏡を用いて TRIM29 のクロマチン上での分布を解析した (scale bar : 5 μ m)．0.4 μ g/ml DAPI を用いて DNA を染色した．

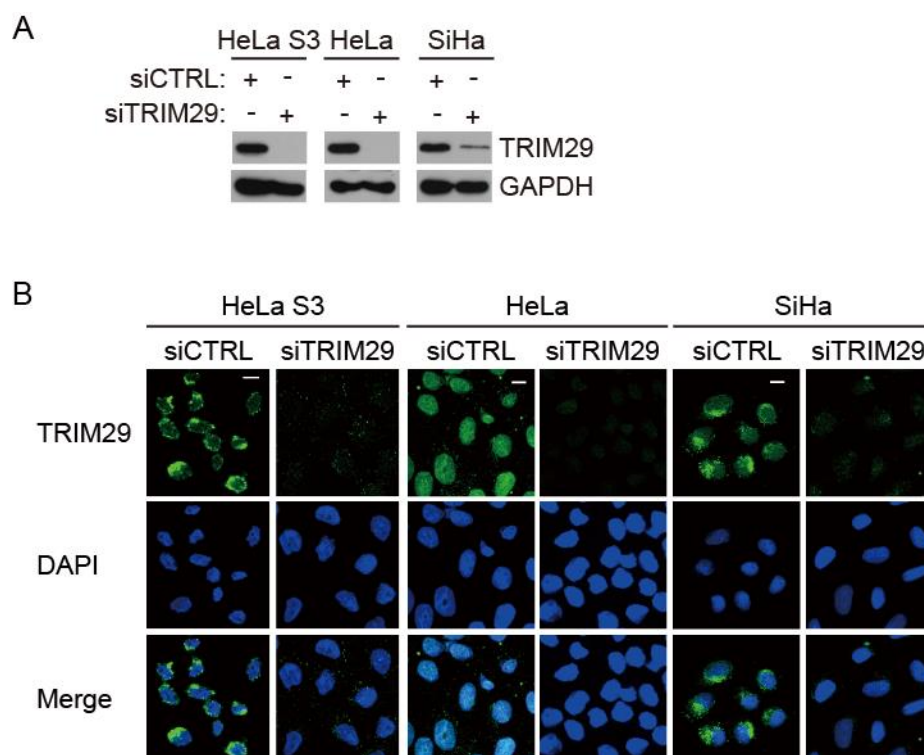


図 5. siRNA 法による TRIM29 ノックダウン効果の確認

- (A) HeLa S3 細胞, HeLa 細胞および SiHa 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入し, 48 時間培養した. 回収した細胞の溶解液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロットによって解析した. ローディングコントロールとして, 坑 GAPDH 抗体を用いた.
- (B) HeLa S3 細胞, HeLa 細胞および SiHa 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した. 48 時間培養後, 各細胞を固定した. 共焦点顕微鏡を用いて TRIM29 の細胞内局在を解析した (scale bar: 10 μ m). 0.4 μ g/ml DAPI を用いて DNA を染色した.

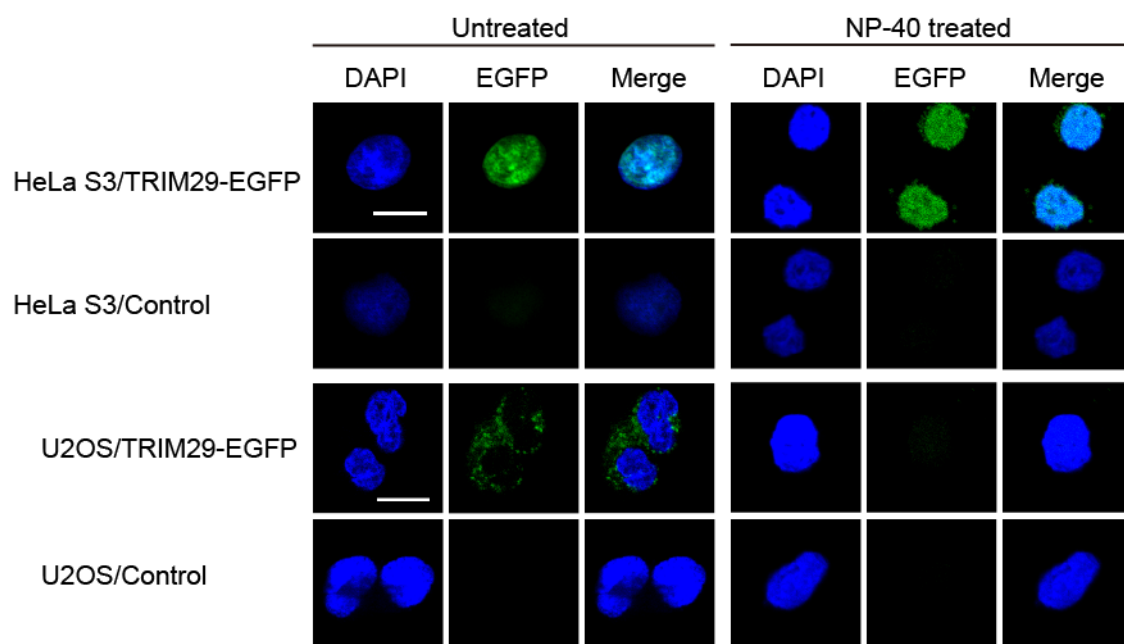


図 6. HeLa S3 細胞および U2OS 細胞における TRIM29-EGFP の細胞内局在

TRIM29-EGFP を安定に発現する HeLa S3 細胞および U2OS 細胞を作製した。共焦点顕微鏡を用いて、HeLa S3 細胞および U2OS 細胞における TRIM29-EGFP の細胞内局在を解析した (scale bar : 5 μ m)。TRIM29-EGFP の細胞内局在を NP-40 で細胞を処理した場合と処理していない場合で検討した。0.4 μ g/ml DAPI を用いて DNA を染色した。

第2節 TRIM29 の結合タンパク質の同定

TRIM29 のクロマチン上での機能を検討した。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 法は、0.42 M NaCl を含む緩衝液を用いて DNA からタンパク質を解離させることによって核抽出液を得る方法である。したがって、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 (図 7)。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。MudPIT は、一次元目に強カチオン交換カラム、二次元目に逆相カラムを用いて、ペプチドを分離することによって高精度のプロテオーム解析を行う方法である⁵¹。MudPIT およびデータ解析は、Stowers 研究所の Joan W. Conaway 博士らによって行われた。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⁵²。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 8)。同定されたタンパク質を表 3 に示す。

これらのタンパク質の多くが DNA 結合能を持つことから、TRIM29 複合体の形成が DNA に依存する可能性が示唆された。この可能性を確かめるために、核抽出液に含まれる DNA を benzonase によって分解し、TRIM29 複合体形成が DNA に依存するかどうかをプルダウンアッセイによって解析した。核抽出液に benzonase を加え、4°C で 1 時間反応させたのち、アガロースゲル電気泳動によって、DNA が分解されていることを確認した (図 9)。DNA 分解後の核抽出液を用いてプルダウンアッセイを行った。TRIM29 の BASC, DNA-PKcs, コヒーシンおよびコンデンシンへの結合は DNA に依存しなかった (図 10A)。銀染色によって、TRIM29 複合体の形成も DNA に依存しないことがわかった (図 10B)。また、TRIM29 は ATM にも結合することが判明した (図 10A)。TRIM29 が DNA 修復タンパク質と結合することから、TRIM29 複合体の形成が DNA 損傷に依存するのではないかと考えた。TRIM29 と DNA 修復タンパク質の結合が DNA 損傷に依存するかを明らかにするために、放射線を照射した FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製し、プルダウンアッセイにより TRIM29 と DNA 修復タンパク質の結合を解析した。TRIM29 は放射線に DNA 損傷に関係なく、DNA 修復タンパク質と結合した (図 11A)。銀染色によって、TRIM29 複合体の形成も IR に依存しないことがわかった (図 11B)。

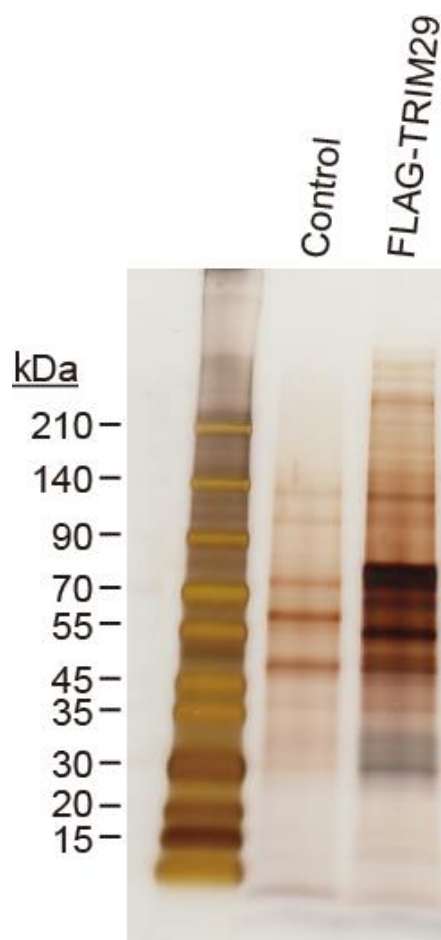


図 7. SDS-PAGE による FLAG-TRIM29 結合タンパク質の解析

FLAG-TRIM29 の安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製し，
FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した．得
られた免疫沈降溶液を 4-20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE に展開し
た．銀染色法によってタンパク質の検出を行った．

表3. 質量分析に同定されたTRIM29結合タンパク質

Accession Numbers	Description	Gene	TRIM29/W T	TRIM29/39 4-588	TRIM29/47 0-588	TRIM29/1- 359
	tripartite motif-containing protein 29	TRIM29	0.275905	0.000000	0.000000	0.000000
	chs_TRIM29-394-588		0.000000	0.151690	0.000000	0.000000
	chs_TRIM29-470-588		0.000000	0.000000	0.569027	0.000000
	chs_TRIM29-1-359		0.000000	0.000000	0.000000	0.585698
gi 126032350 ref NP_001075109.1	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	DNA-PKcs	0.000230	0.000545	0.000000	0.000000
gi 4503841 ref NP_001460.1	X-ray repair cross-complementing protein 6	Ku70	0.000345	0.000000	0.000000	0.000000
gi 132626688 ref NP_055456.2	mediator of DNA damage checkpoint protein 1	MDC1	0.000029	0.000000	0.000000	0.000000
gi 24234690 ref NP_005581.2	double-strand break repair protein MRE11A	MRE11A	0.000176	0.000199	0.000000	0.000000
gi 19924129 ref NP_005723.2	DNA repair protein RAD50	RAD50	0.000046	0.000000	0.000000	0.000000
gi 33356172 ref NP_002476.2	nibrin	NBS1	0.000040	0.000000	0.000000	0.000000
gi 237681119 ref NP_009231.2	breast cancer type 1 susceptibility protein	BRCA1	0.000008	0.000072	0.000000	0.000000
gi 119395734 ref NP_000050.2	breast cancer type 2 susceptibility protein	BRCA2	0.000070	0.000139	0.000000	0.000000
gi 384871702 ref NP_001245210.1	DNA mismatch repair protein Msh2	MSH2	0.000867	0.001014	0.000000	0.000000
gi 4504191 ref NP_000170.1	DNA mismatch repair protein Msh6	MSH6	0.000573	0.000946	0.000000	0.000000
gi 4505913 ref NP_000526.1	mismatch repair endonuclease PMS2	PMS2	0.000105	0.000000	0.000000	0.000000
gi 384871676 ref NP_001245200.1	DNA mismatch repair protein Mlh1	MLH1	0.000417	0.000000	0.000000	0.000000
gi 284813531 ref NP_002430.3	DNA mismatch repair protein Msh3	MSH3	0.001134	0.000000	0.000000	0.000000
gi 30581135 ref NP_006297.2	structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A	0.001045	0.001647	0.000106	0.000000
gi 4885399 ref NP_005436.1	structural maintenance of chromosomes protein 3	SMC3	0.001256	0.000946	0.000000	0.000000
gi 388240808 ref NP_001252531.1	structural maintenance of chromosomes protein 2	SMC2	0.000200	0.000000	0.000000	0.000000
gi 50658065 ref NP_005487.3	structural maintenance of chromosomes protein 4	SMC4	0.000209	0.000000	0.000000	0.000000

表3. 続き

Accession Numbers	Description	Gene	TRIM29/W T	TRIM29/39 4-588	TRIM29/47 0-588	TRIM29/1- 359
gi 32528306 ref NP_002904.3	replication factor C subunit 1	RFC1	0.000575	0.000767	0.000000	0.000000
gi 28882049 ref NP_002905.2	replication factor C subunit 2	RFC2	0.001355	0.002961	0.000204	0.000000
gi 108773789 ref NP_853536.2	replication factor C subunit 3	RFC3	0.000211	0.000444	0.000000	0.000000
gi 31881687 ref NP_853551.1	replication factor C subunit 4	RFC4	0.001239	0.002424	0.000360	0.000000
gi 194306567 ref NP_853556.2	replication factor C subunit 5	RFC5	0.000846	0.002122	0.000000	0.000000
gi 331284125 ref NP_056224.3	E1A-binding protein p400	EP400	0.000134	0.000000	0.000000	0.000000
gi 78000213 ref NP_001029196.1	DNA methyltransferase 1-associated protein 1	DMAP1	0.000064	0.000290	0.000000	0.000000
gi 4506753 ref NP_003698.1	ruvB-like 1	RUVBL1	0.005719	0.005195	0.000000	0.000189
gi 5730023 ref NP_006657.1	ruvB-like 2	RUVBL2	0.002136	0.000731	0.000141	0.000000
gi 30089999 ref NP_829888.1	actin-like protein 6A	BAF53a	0.000310	0.000000	0.000000	0.000000
gi 197313748 ref NP_054878.5	histone-lysine N-methyltransferase SETD2	SETD2	0.000140	0.000079	0.000000	0.000000
gi 103471997 ref NP_056240.2	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	POLR1A	0.000052	0.000000	0.000000	0.000000
gi 4505941 ref NP_000929.1	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	POLR2B	0.000077	0.000115	0.000000	0.000000
gi 110347429 ref NP_005111.2	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	MED12	0.000069	0.000062	0.000000	0.000000
gi 28558973 ref NP_004220.2	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14	MED14	0.000124	0.000000	0.000000	0.000000
gi 38146094 ref NP_005472.2	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16	MED16	0.000034	0.000000	0.000000	0.000000

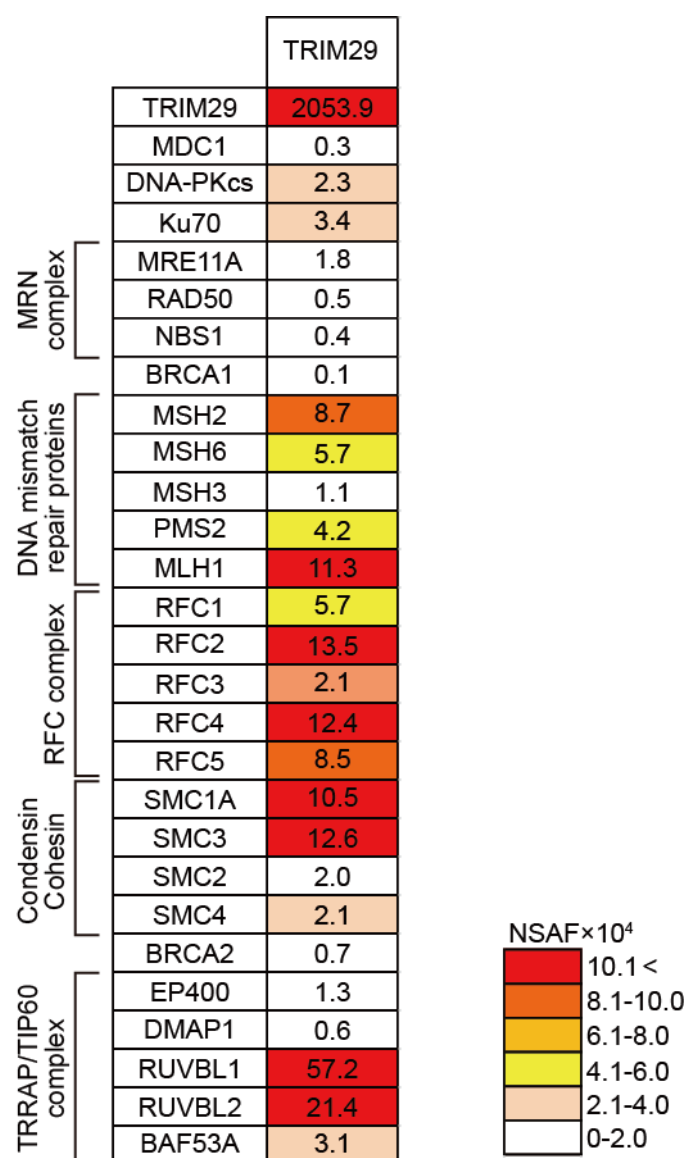


図 8. 質量分析による FLAG-TRIM29 結合タンパク質の解析

FLAG-TRIM29 の安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製し，FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した．得られた免疫沈降溶液を多次元タンパク質同定技術によって解析した．NSAF は，同定されたタンパク質の相対存在量を示す．

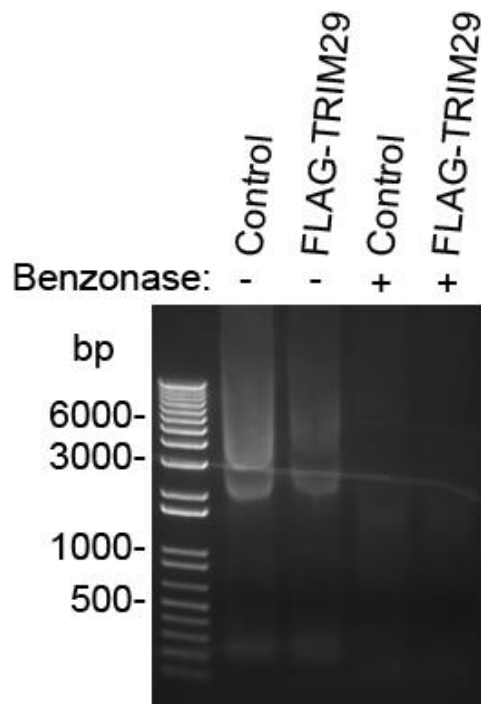


図 9. Benzonase による核抽出液に含まれる DNA の分解

FLAG-TRIM29の安定発現HeLa S3細胞から核抽出液を調製した．得られた核抽出液にbenzonaseを加え，4°Cで1時間反応させた．反応液をアガロースゲル電気泳動に展開し，benzonaseによるDNAの分解効率を解析した．

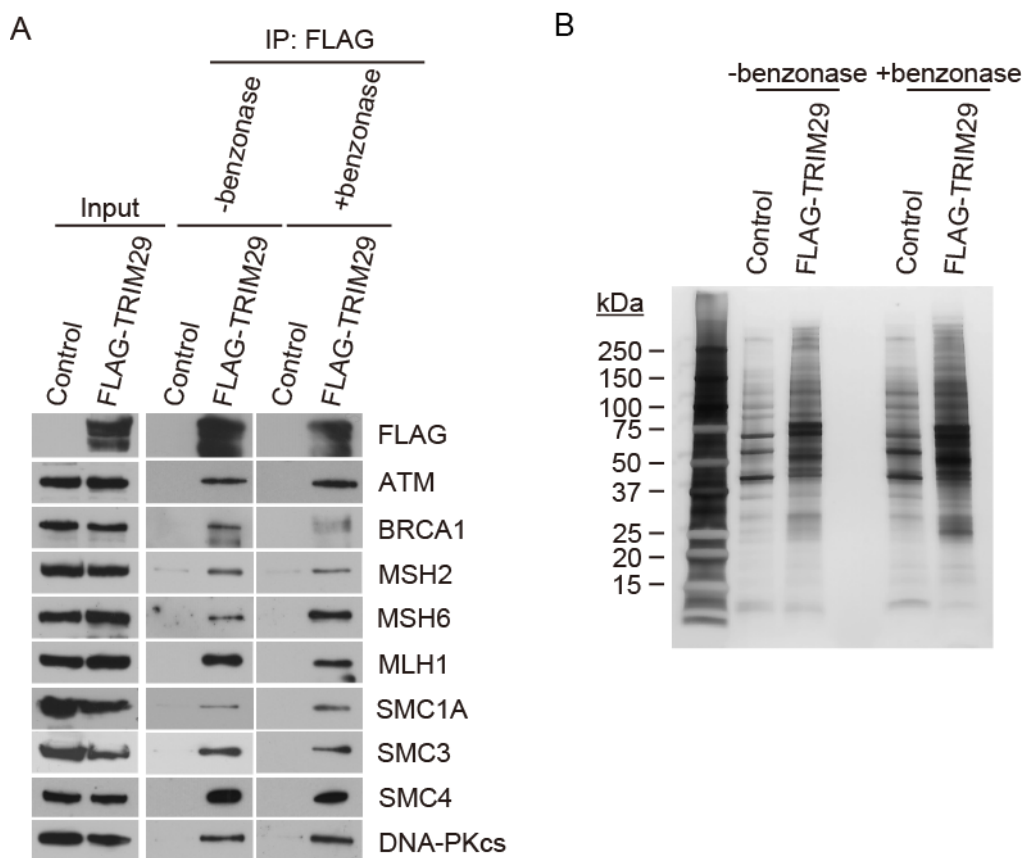
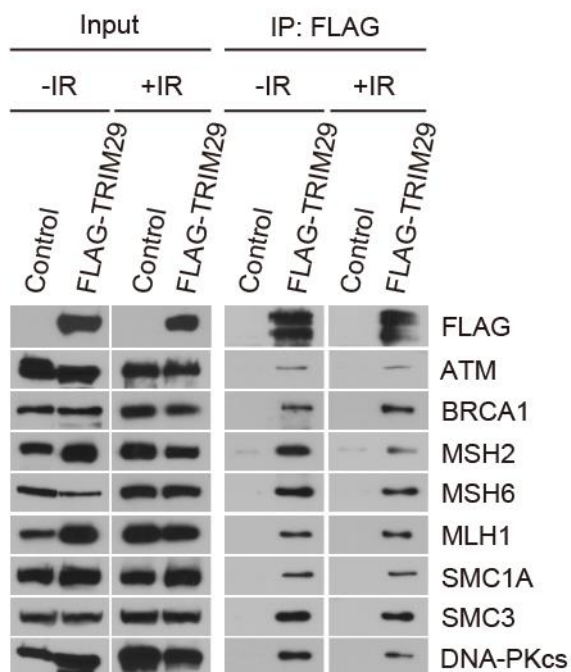


図 10. FLAG-TRIM29 結合タンパク質の解析

- (A) FLAG-TRIM29 が安定発現した HeLa S3 細胞から調製した核抽出液に benzonase を加え, 4°C で 1 時間反応させた. 各核抽出液から FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.
- (B) FLAG-TRIM29 が安定発現した HeLa S3 細胞から調製した核抽出液に benzonase を加え, 4°C で 1 時間反応させた. 各核抽出液から FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液を 4-20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE に展開した. 銀染色法によってタンパク質の検出を行った.

A



B

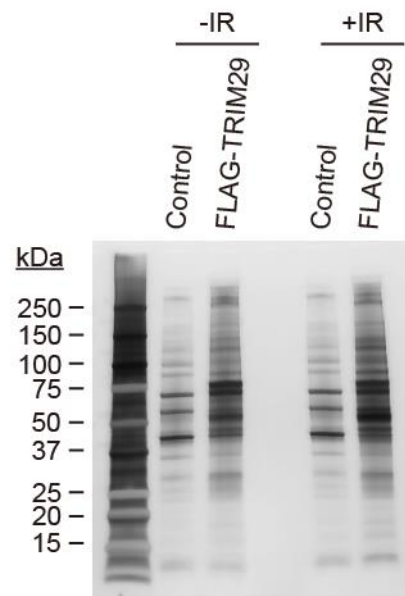


図 11. DNA 損傷が TRIM29 複合体の形成に与える影響

- (A) FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞に 10 Gy の IR を照射し，細胞を 1 時間培養した．核抽出液を調製し，FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した．得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した．
- (B) FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞に 10 Gy の IR を照射し，細胞を 1 時間培養した．核抽出液を調製し，FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した．得られた免疫沈降溶液を 4-20% グラジェントゲルを用いた SDS-PAGE に展開した．銀染色法によってタンパク質の検出を行った．

第3節 DNA修復タンパク質への結合に関与する TRIM29 の部位同定

TRIM29 の DNA 修復タンパク質への結合部位を同定するために、図 12A に示されている種々の FLAG-TRIM29 変異体の安定発現 HeLa S3 細胞を作製した。各安定発現細胞から核抽出液を調製した。得られた各核抽出液を用いて、FLAG タグ付きの各 TRIM29 変異体に結合するタンパク質を免疫沈降によって精製した (図 12B)。プルダウンアッセイにより各 FLAG-TRIM29 変異体の結合タンパク質を解析した。TRIM29 結合タンパク質は、アミノ酸残基 394 番から 588 番から成る欠損変異体に強く結合したが、アミノ酸残基 470 番から 588 番から成る欠損変異体とは結合しなかった (図 13)。MudPIT を用いて、各 FLAG-TRIM29 変異体 (394-588, 470-588 および 1-359) に対する結合タンパク質の相対量を NSAF によって比較した。プルダウンアッセイと同様に、DNA 修復タンパク質の結合量は 394-588 変異体に多く、470-588 および 1-359 変異体に対しては少なかった (図 14)。これらの結果は、アミノ酸残基 394 番から 470 番のアミノ酸配列に、DNA 修復タンパク質への結合に必要なモチーフが存在している可能性を示している。さらに、PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) を用いて二次構造予測を行った結果、アミノ酸残基 405 番から 430 番は各生物種間で高度に保存されている α -helix であることがわかった (図 15A)。そこで、この領域が TRIM29 複合体の形成に必要であるかどうかを検討した。414 番のアスパラギン酸残基と 415 番のアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した FLAG-TRIM29 を安定発現する HeLa S3 細胞を作製し、D414A/D415A 変異体に結合するタンパク質をウェスタンブロット法によって解析した。D414A/D415A 変異は、TRIM29 の DNA 修復タンパク質への結合を減弱させたが、ATM および BRCA1 への結合は残存していた (図 15B)。したがって、TRIM29 は、アミノ酸残基 405 番から 430 番からなる α -helix を介して DSB 修復タンパク質に結合しているが、ATM および BRCA1 とは別の領域を介して結合している可能性が推測された。

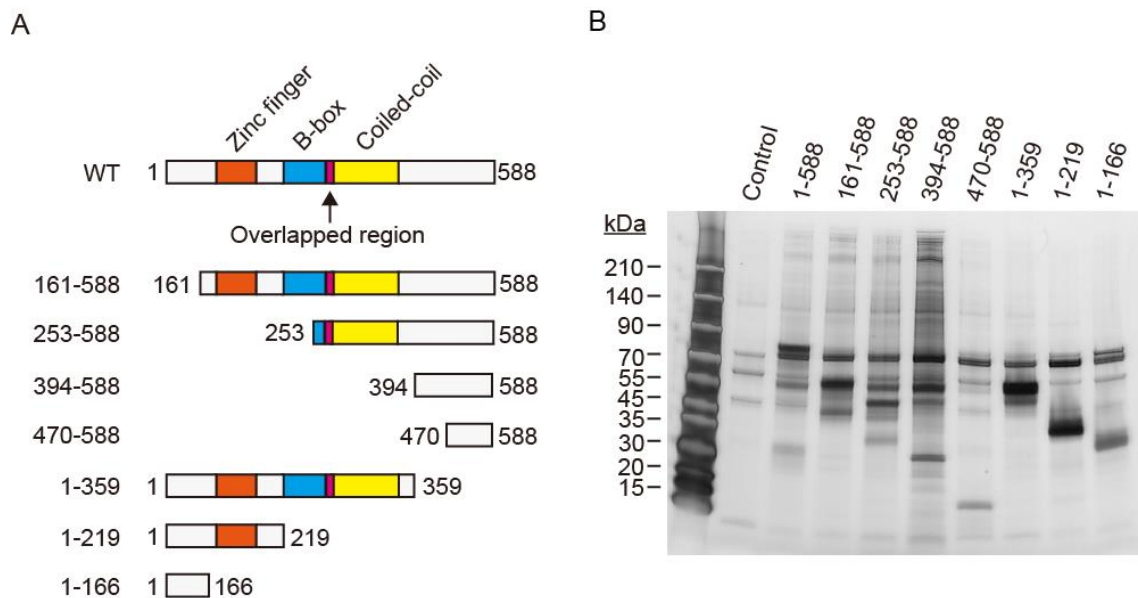


図 12. TRIM29 野生型および変異型に対する結合タンパク質の解析

(A) TRIM29野生型および変異型の構造

(B) FLAG-TRIM29野生型および各変異型の安定発現HeLa S3細胞から核抽出液を調製し、FLAG-TRIM29および結合タンパク質を免疫沈降により精製した。得られた免疫沈降溶液を4-20% グラジエントゲルを用いたSDS-PAGEに展開した。銀染色法によってタンパク質の検出を行った。

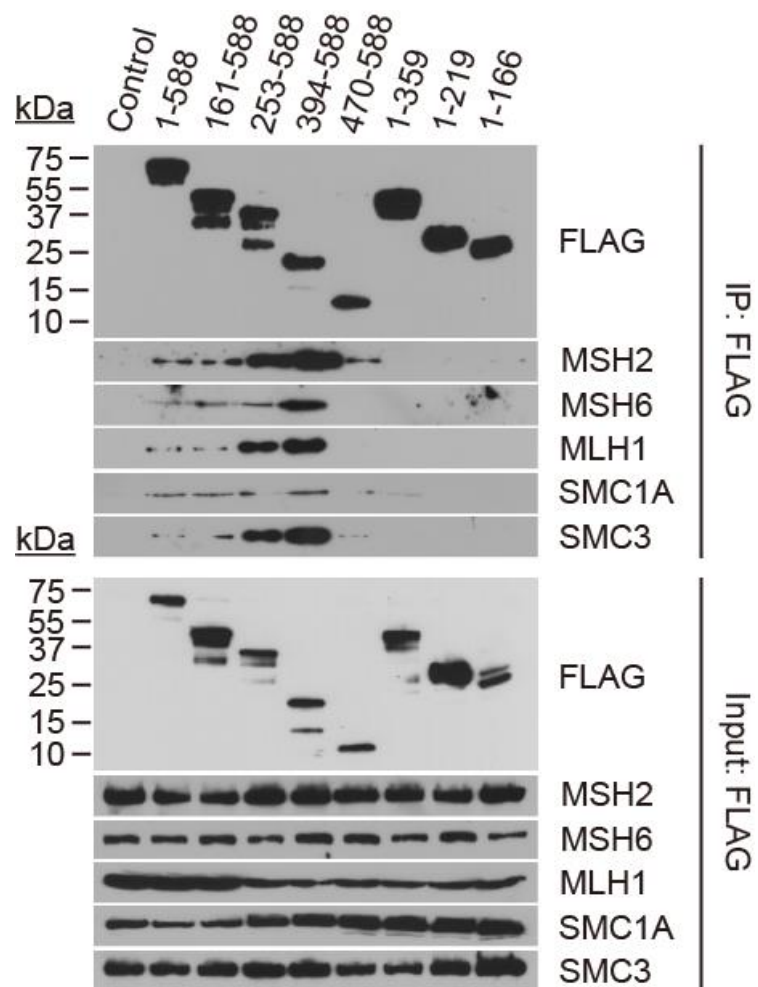


図 13. ウェスタンブロッティングによる FLAG-TRIM29 結合タンパク質の解析

FLAG-TRIM29の野生型および各変異型の安定発現HeLa S3細胞から核抽出液を調製し, FLAG-TRIM29およびTRIM29結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液をSDS-PAGEに展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.

	TRIM29 (394-588)	TRIM29 (470-588)	TRIM29 (1-359)
TRIM29	1516.9	5690.3	5857.0
DNA-PKcs	5.5		
MRE11A	2.0		
BRCA1	0.7		
MSH2	10.1		
MSH6	9.5		
SMC1A	16.5	1.1	
SMC3	9.5		
RFC1	7.7		
RFC2	29.6	2.0	
RFC3	4.4		
RFC4	24.2	3.6	
RFC5	21.2		
BRCA2	1.4		

NSAF×10⁴
10.1<
8.1-10.0
6.1-8.0
4.1-6.0
2.1-4.0
0-2.0

図 14. 質量分析による FLAG-TRIM29 結合タンパク質の解析

FLAG-TRIM29 の変異型 (394-588, 470-588 および 1-359) の安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製し, FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液を多次元タンパク質同定技術によって解析した. NSAF は, 同定されたタンパク質の相対存在量を示す.

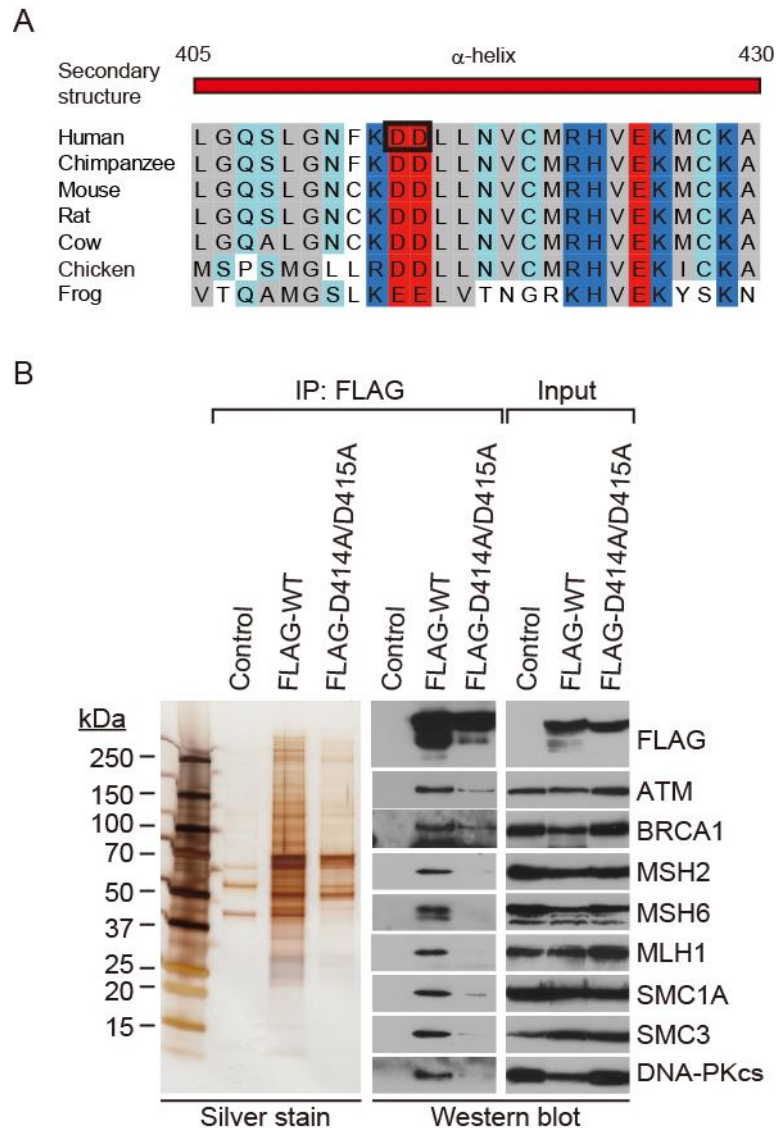


図 15. D414A/D415A 変異が TRIM29 複合体形成に与える影響

- (A) 異なる生物種におけるTRIM29（アミノ酸残基405番から430番）のマルチプルアラインメントを作成した。PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) を用いて二次構造予測を行った。ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いてマルチプルアラインメントを作成した。
- (B) FLAG-TRIM29の野生型およびD414A/D415A変異型の安定発現HeLa S3細胞から核抽出液を調製し、FLAG-TRIM29およびTRIM29結合タンパク質を免疫沈降により精製した。得られた免疫沈降溶液をSDS-PAGEに展開し、銀染色およびウエスタンブロットによって解析した。

第4項 TRIM29に直接結合するタンパク質の同定

質量分析によって同定されたタンパク質の中で、TRIM29が直接結合するタンパク質の同定を行った。大腸菌を用いて作製した組換え体 FLAG-TRIM29 と HeLa S3 の核抽出液を用いた *in vitro* タンパク質結合実験を行った。組換え体 FLAG-TRIM29 は、内在性 MSH2 および ATM と結合した (図 16A)。次に、TRIM29 がアミノ酸残基 405 番から 430 番を介して MSH2 と結合するのかどうかを検討した。TRIM29 のアミノ酸残基 405 番から 430 番のペプチド断片に GST タグを付加し、HeLa S3 の核抽出液を用いて *in vitro* タンパク質結合実験を行った。GST タグ付き TRIM29 ペプチド断片は、MSH2 と結合したが、ATM とは結合しなかった (図 16B)。さらに、TRIM29 が MSH2 に直接結合するかどうかを *in vitro* タンパク質結合実験によって解析したところ、組換え体 His-FLAG-TRIM29 は GST-MSH2 に直接結合した (図 17)。さらに、TRIM29 が D414 および D415 を介して MSH2 に結合しているかどうかを検討した。D414A/D415A 変異においては、TRIM29 の MSH2 に対する結合が減弱した (図 18)。

MSH2 の TRIM29 への結合部位を同定するために、図 19A に示されている MSH2 欠損変異体の His-ProS2-FLAG タグ付き組換え体タンパク質を作製し、His-FLAG-TRIM29 との *in vitro* タンパク質結合実験を行った。NTD1 は、他の変異体よりも特異的に TRIM29 に結合した (図 19B)。したがって、MSH2 はコネクタードメインを介して TRIM29 に結合すると考えられた。MSH2 のコネクタードメインには、原核生物におけるホモログである MutS には保存されていない 3 つのループ構造 (アミノ酸残基番号 150-160, 207-217 および 242-262) がタンパク質表面に存在することが結晶構造解析によって示唆されている⁵³。PyMOL (<http://www.pymol.org/>) を用いて、Human 由来 MSH2 (amino acid residues 125-298) の立体構造 (水色, PDB:2O8B) に E. coli 由来 MutS (amino acid residues 172-262) の立体構造 (紫色, PDB:1W7A) を重ね合わせた (図 20)。MSH2 に特異的に存在している二次構造 (amino acid residues 150-160, 207-217 および 242-262) を青色で示した (図 20)。TRIM29 が真核生物にしか存在しないことを踏まえると、MSH2 はこの 3 つのループを介して TRIM29 に結合する可能性が考えられた。そこで、アミノ酸残基番号 156-159, 209-212 および 246-249 をアラニン残基に置換した FLAG-MSH2 変異体を安定発現する HeLa S3 細胞を作製し、核抽出液を用いてプルダウンアッセイを行った。アミノ酸残基番号 209-212 のアラニン変異は、TRIM29 への結合を低下させた (図 21)。以上の結果より、TRIM29 はアミノ酸残基番号 405-430 からなる α -helix を介して MSH2 に結合することが明らかになった。以上より、MSH2 はアミノ

酸残基番号 207-217 からなる loop 構造を介して TRIM29 に結合することが示唆された.

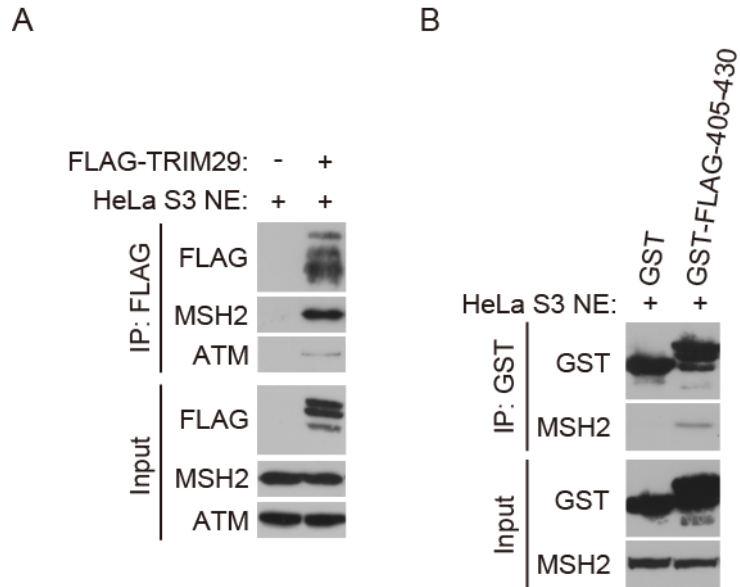


図 16. FLAG-TRIM29 と MSH2 の結合

- (A) 組み換え体FLAG-TRIM29を用いてHeLa S3細胞の核抽出液から結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液をSDS-PAGEに展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.
- (B) 組み換え体GST-FLAG-TRIM29 (アミノ酸残基405番から430番) を用いてHeLa S3細胞の核抽出液から結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液をSDS-PAGEに展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.

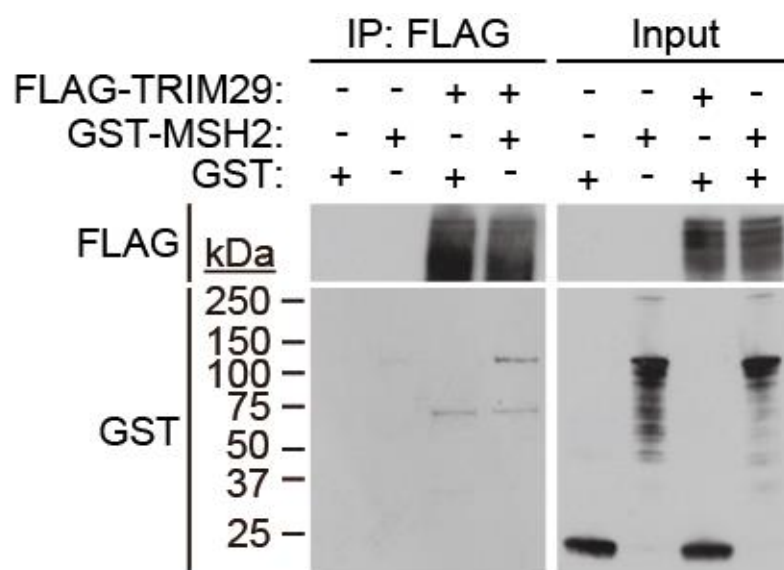


図 17. FLAG-TRIM29 と GST-MSH2 の直接結合

FLAG-TRIM29を坑FLAG-agaroseに吸着させた後，GSTまたはGST-MSH2と反応させた．3×FLAGペプチドを用いて吸着タンパク質を溶出した．得られたタンパク質溶液をSDS-PAGEに展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した．

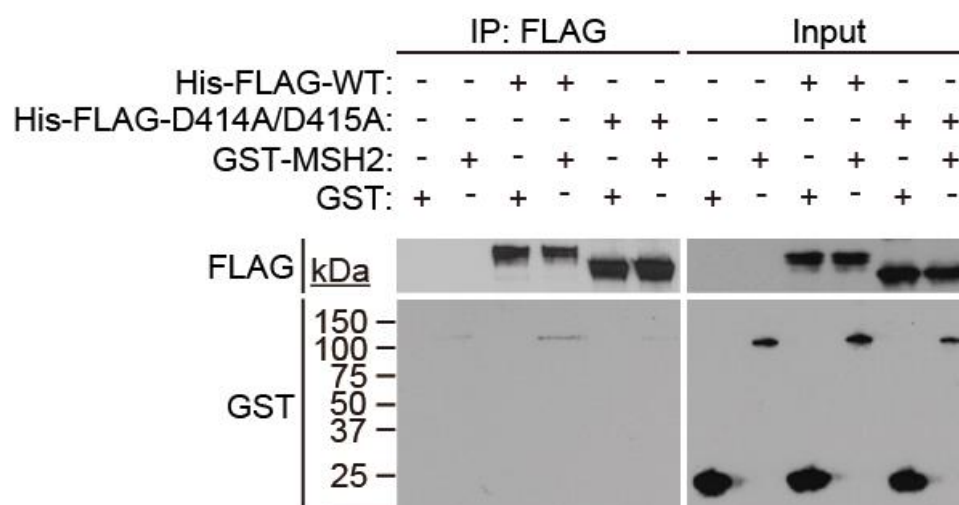


図 18. FLAG-TRIM29 野生型および変異型の GST-MSH2 への結合

FLAG-TRIM29野生型およびD414A/D415A変異型を坑FLAG-agaroseに吸着させた後，GSTまたはGST-MSH2と反応させた．3×FLAGペプチドを用いて吸着タンパク質を溶出した．得られたタンパク質溶液をSDS-PAGEに展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した．

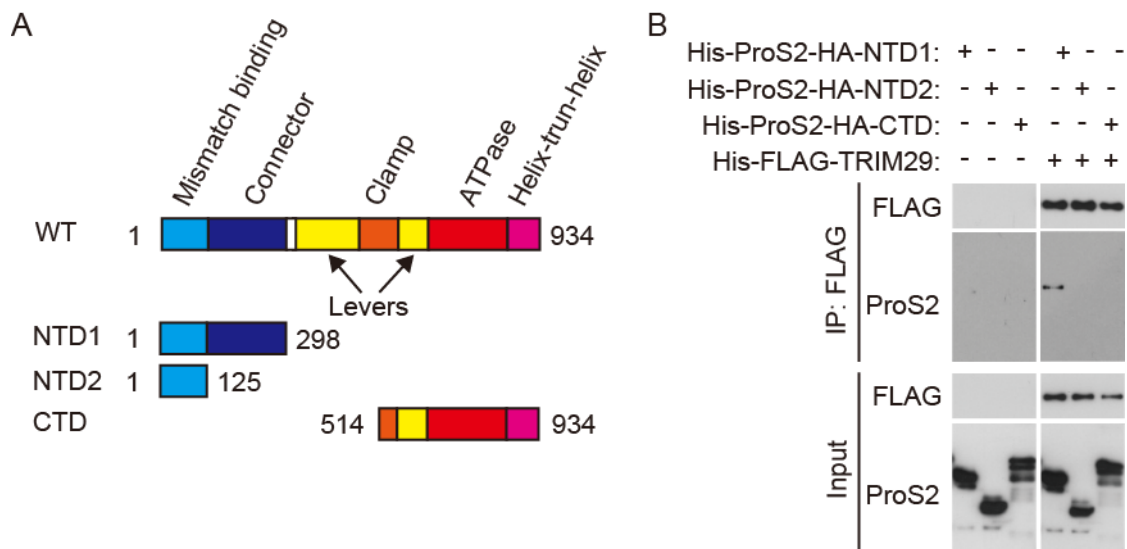


図19. MSH2変異型のHis-FLAG-TRIM29への直接的な結合

(A)MSH2野生型および変異型の構造

(B)FLAG-TRIM29を坑FLAG-agaroseに吸着させた後，各MSH2変異体と反応させた．3×FLAGペプチドを用いて吸着タンパク質を溶出した．得られたタンパク質溶液をSDS-PAGEに展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した．

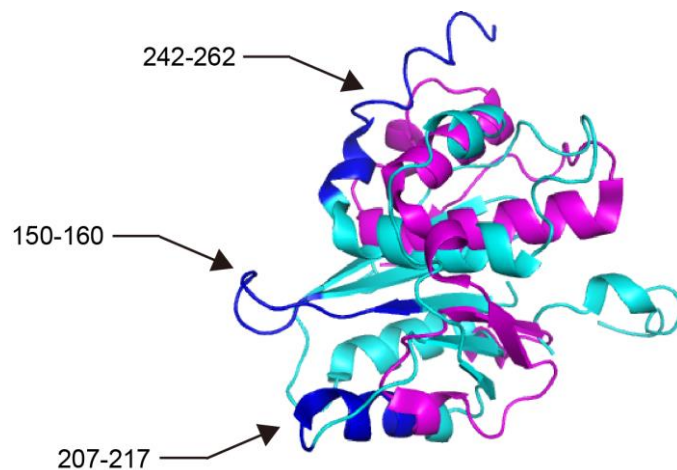


図 20. Human 由来 MSH2 と *E. coli* 由来 MutS のコネクタドメインの重ね合わせ図

Human 由来 MSH2 (amino acid residues 125-298) の立体構造 (水色, PDB: 2O8B) に *E. coli* 由来 MutS (amino acid residues 172-262) の立体構造 (紫色, PDB: 1W7A) を重ね合わせた. MSH2 に特異的に存在している二次構造 (amino acid residues 150-160, 207-217 および 242-262) を青色で示す.

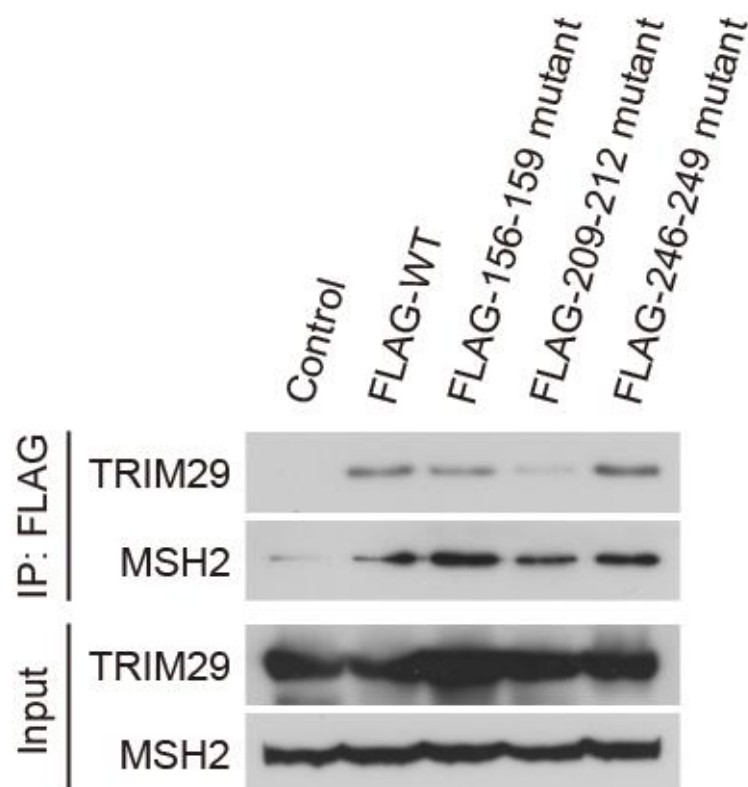


図 21. 野生型および変異型 FLAG-MSH2 の TRIM29 への結合

MSH2 の 156-159, 209-212 および 246-249 のアミノ酸配列をアラニン残基に置換した FLAG-MSH2 変異体の安定発現 HeLa S3 細胞を作製した. FLAG-MSH2 野生型および核変異型の安定発現細胞から核抽出液を調製し, FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.

第 5 項 TRIM29 の TIP60 複合体への結合

TRIM29 は, TIP60 複合体の構成因子である EP400, DMAP1, RUVBL1 および BAF53 と結合することが MudPIT 解析によって示された (表 3 および図 9). 本研究室において, TRIM29 結合タンパク質として TIP60 が Yeast two hybrid 法によって同定されている⁴². そこで, 細胞内で TRIM29 が TIP60 複合体と結合しているかどうかを検討した. FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞の核抽出液を用いて解析したところ, TRIM29 は TIP60, RUVBL1 および BAF53a と結合することが明らかになった (図 22A). TRIM29 と TIP60 複合体の結合の相関関係を明らかにするために, TIP60 複合体の構成因子である TIP60, DMAP1 および ING3 の安定発現 HeLa S3 細胞を作製した. 各核抽出液を用いてプルダウンアッセイを行った結果, TIP60, DMAP1 および ING3 はいずれも TRIM29 と結合した (図 22B-D). 次に, FLAG-TIP60 安定発現細胞から調製した TIP60 複合体および組換え体 His-FLAG-TRIM29 を用いて, *in vitro* タンパク質結合実験を行った. しかしながら, TRIM29 は TIP60 複合体と直接結合しなかった (図 23). したがって, TRIM29 は他のタンパク質を介して TIP60 複合体に間接的に結合していることがわかった.

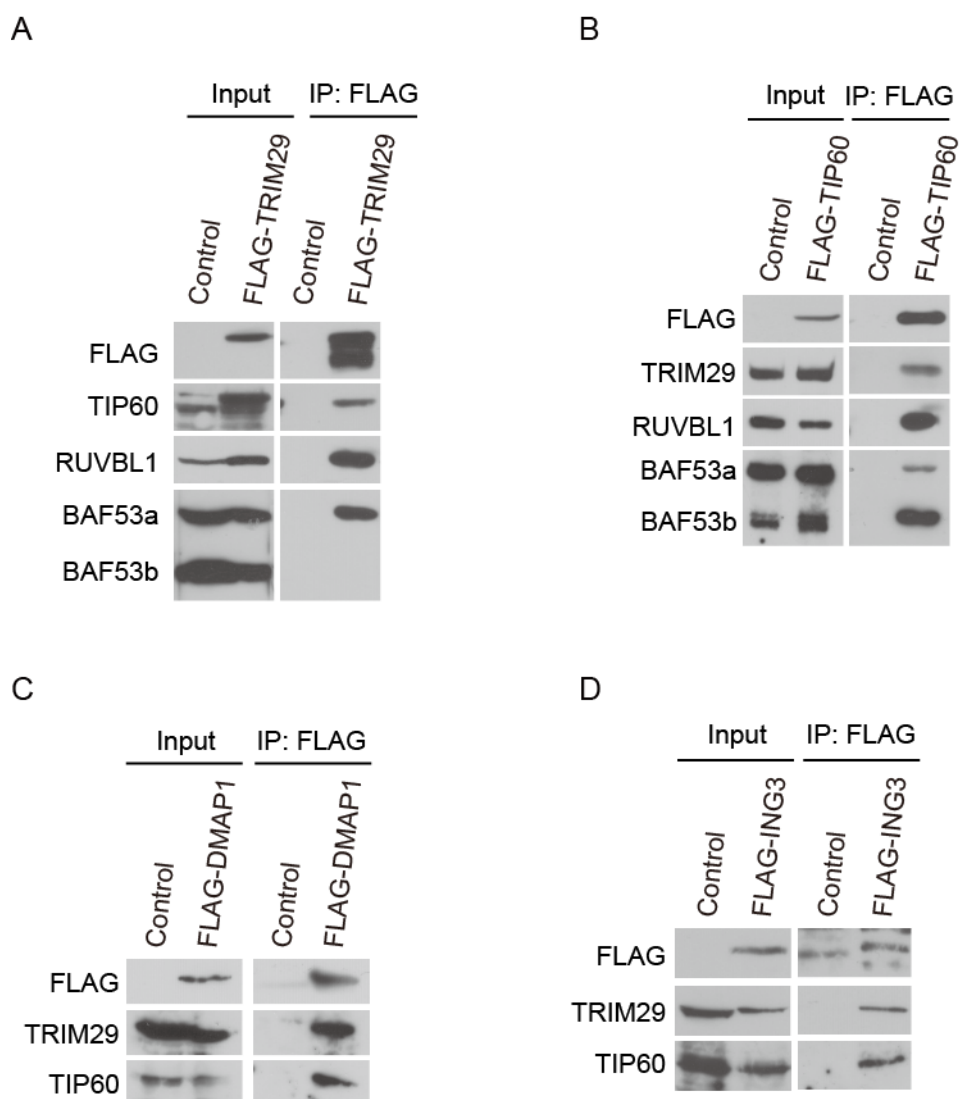


図 22. TRIM29 の TIP60 複合体への相互作用解析

FLAG-TRIM29 (A), FLAG-TIP60 (B), FLAG-DMAP1 (C) および FLAG-ING3 (D) の安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製した。各 FLAG タグ付きタンパク質および結合タンパク質を免疫沈降により精製した。得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し、ウエスタンブロッティングによって解析した。

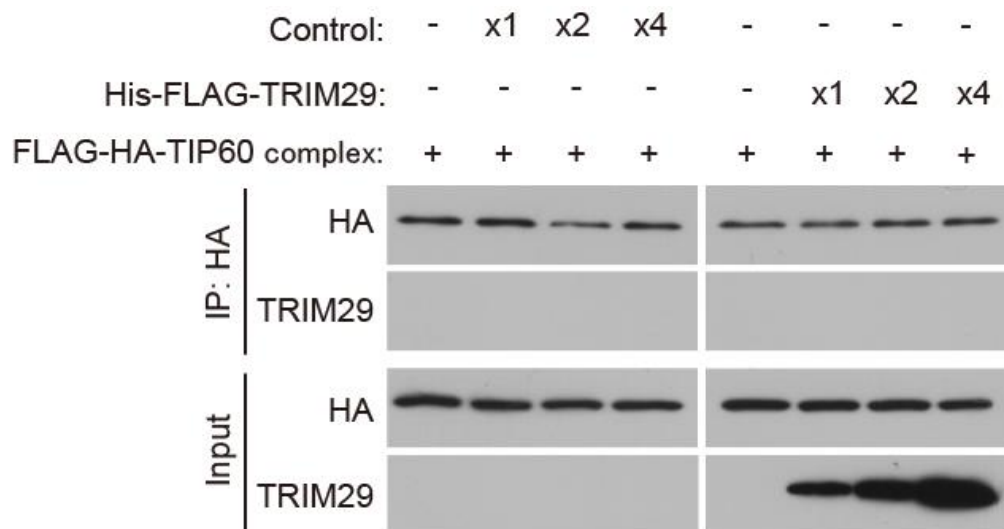


図 23. FLAG-TRIM29 の FLAG-HA-TIP60 を含むタンパク質複合体への直接的な結合

FLAG-TIP60安定発現細胞からFLAG-TIP60複合体を免疫沈降により精製した。Anti-HA agaroseにFLAG-TIP60複合体を吸着させた後，His-FLAG-TRIM29と反応させた。HA-peptideを用い吸着タンパク質を溶出した。得られたタンパク質溶液をSDS-PAGEに展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した。

第6項 TRIM29によるDNA損傷応答の制御

TRIM29は、ATM、DNA-PKcsおよびTIP60に結合することを示された（図10および22）。ATM、DNA-PKcsおよびTIP60は、DSB修復シグナルであるH2AXリン酸化やH4アセチル化の制御に関わることから、TRIM29はDSB修復シグナル制御に関わる可能性が示唆された。TRIM29が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。1時間培養後、ヒストンPTMの変化をウェスタンブロット法によって解析した。TRIM29のノックダウンによって、 γ H2AXの基底レベルが低下し、IR照射によるH2AXのリン酸化レベルがコントロール細胞よりも低かった（図24AおよびB）。TRIM29ノックダウンによって、IR依存的なH4K8、H4K12およびH4K16のアセチル化が抑制された（図24AおよびC）。TRIM29ノックダウンは、他のヒストンPTMに大きな影響を与えなかった（図24A）。さらに、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25AおよびB）。また、SiHa細胞、NIH 3T3細胞やBxPC3細胞においてTRIM29をノックダウンさせると、細胞の放射線耐性能が低下することが報告されている^{40,41}。そこでHeLa S3細胞においても同様の結果が得られるかどうかを確かめた。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26）。

DNA損傷部位において、 γ H2AXのfoci形成はDNA修復経路を活性化するうえで必要不可欠な現象である。TRIM29が γ H2AXのfoci形成に関与する可能性を調べるために、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、 γ H2AXのfoci形成を0分から120分にかけて経時的に解析した（図27）。共焦点顕微鏡を用いて取得した画像をもとに、1細胞当たりの γ H2AXのfoci数を画像解析ソフトCellProfiler (<http://www.cellprofiler.org/>) によって計測した。本解析において、10個以上の γ H2AXのfociを有する細胞を γ H2AX陽性細胞とした。解析結果から、TRIM29をノックダウンすることによって、 γ H2AX陽性細胞の割合が低下することが判明した（図27AおよびB）。 γ H2AXのfoci形成がIR照射前の段階においても検出されたが、これはHeLa S3細胞のクロマチン不安定性または内因性のDNA損傷によって引き起こされているのではないかと推測した。次に、TRIM29がIR照射によるDSB損傷部位に蓄積するかどうかを解析したが、TRIM29は γ H2AXのfociに蓄積しなかった（図28）。同様に、N末端またはC末端にEGFPを付加したTRIM29をHeLa S3細胞に一過的に過剰発現させ、EGFPタグ付きTRIM29がDSB損傷部位に蓄積するかどうかを解析した。しかしながら、内在性TRIM29と同様に、EGFPタグ付きTRIM29は γ H2AXのfociに蓄積しなかつ

った (図29). これらの結果から, TRIM29は, γ H2AXのfoci形成を制御し, DNA修復経路の上流において機能することが明らかになった.

第4項にて, TRIM29はMSH2と結合することを示した. MSH2は, MMR経路において必要不可欠な役割を果たしている¹⁹. したがって, TRIM29はMMR経路の制御に関わる可能性が示唆された. MSH2およびMLH1の欠損細胞では, DNAメチル化剤であるN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) に対する耐性能が上昇することが報告されている⁴⁵. そこで, TRIM29欠損細胞がMNNG耐性能を示すかどうかを解析した. RNA干渉法によってTRIM29を欠損させたHeLa S3細胞を10 μ M MNNGに曝露し, コロニー形成アッセイによって細胞のMNNG耐性能を評価した. HeLa S3細胞においてTRIM29をノックダウンすると, 細胞のMNNG耐性能が上昇した (図30A). また, MSH2およびMLH1は, TRIM29ノックダウンおよびMNNG処理に関係なく安定して発現していた (図30B). さらに, MNNG処理時間が, MSH2およびMLH1のタンパク質安定性に与える影響を解析した. RNA干渉法によってHeLa S3細胞のTRIM29を欠損させた後, 細胞を10 μ M MNNGに0, 1, 2, 4および8時間曝露した. ウェスタンブロットによってMSH2およびMLH1のタンパク質レベルを解析した. MSH2およびMLH1は, MNNG 曝露時間に関係なく, 安定して発現していた (図30C). 以上より, TRIM29は, DSB修復経路およびMMR経路の上流調節因子として機能することが明らかになった.

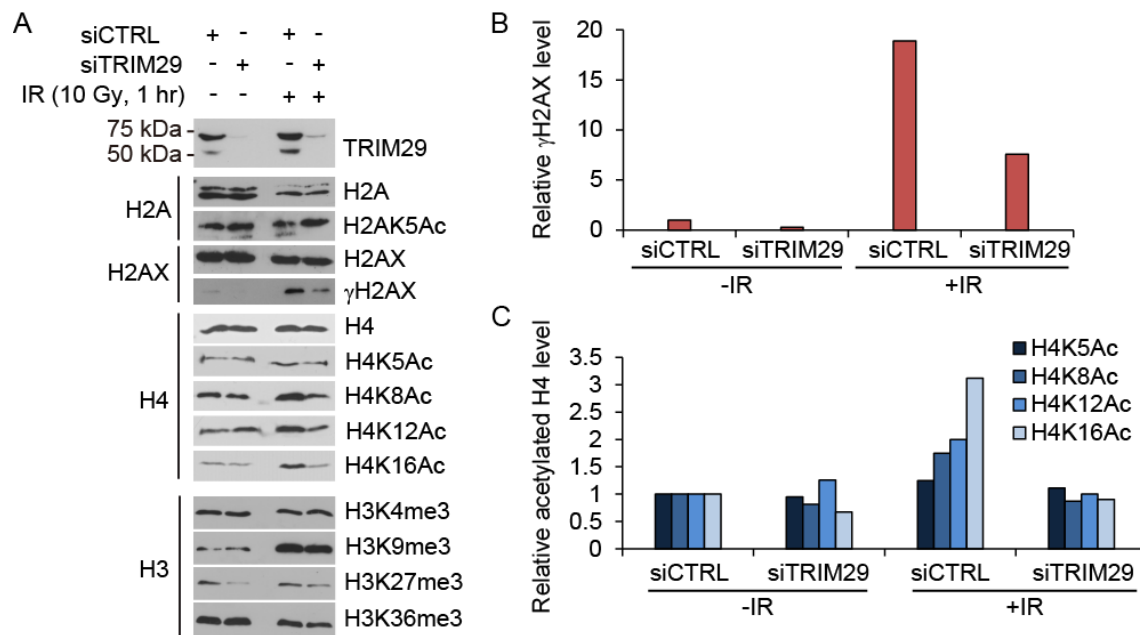


図 24. DNA 損傷によって誘導されるヒストン翻訳後修飾に対する TRIM29 ノックダウンの影響

- (A) siCTRLまたはsiTRIM29を導入しHeLa S3細胞に10 Gyの放射線を照射した。1時間培養後、細胞を回収した。各細胞溶解液をSDS-PAGEに展開し、ウェスタンブロッティングによって解析した。
- (B) siCTRLまたはsiTRIM29を導入しHeLa S3細胞において、DNA損傷によって誘導されるヒストンH2AXリン酸化を定量的に評価した。ウェスタンブロッティングによって検出された各バンドをNIH ImageJを用いて解析した。H2AXリン酸化をH2AXのバンド強度を用いてそれぞれ標準化した。
- (C) siCTRLまたはsiTRIM29を導入しHeLa S3細胞において、DNA損傷によって誘導されるヒストンH4アセチル化を定量的に評価した。ウェスタンブロッティングによって検出された各バンドをNIH ImageJを用いて解析した。H4アセチル化をH2AXおよびH4のバンド強度を用いてそれぞれ標準化した。

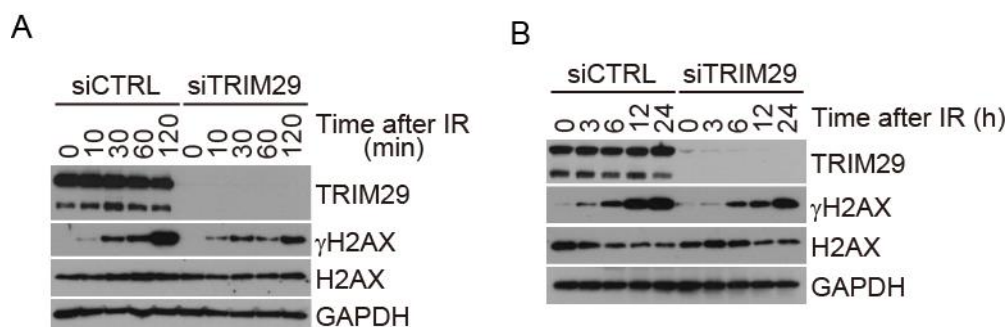


図 25. DNA 損傷によって誘導される γ H2AX に対する TRIM29 ノックダウンの経時的な影響

- (A) siCTRLまたはsiTRIM29を導入しHeLa S3細胞に10 Gyの放射線を照射し、0分、10分、30分、60分および120分培養後、各細胞を回収した。各細胞溶解液をSDS-PAGEに展開し、ウエスタンブロッティングによって各タンパク質を解析した。
- (B) 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。各細胞溶解液をSDS-PAGEに展開し、ウエスタンブロッティングによって各タンパク質を解析した。

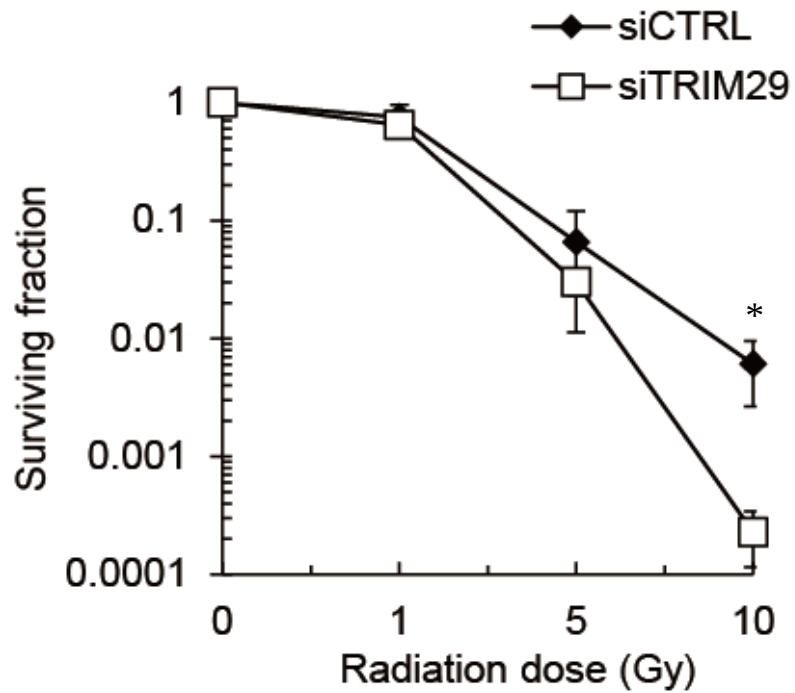


図 26. TRIM29 ノックダウンの放射線耐性能に与える影響

HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した. 48 時間培養後, 各細胞を 6 well plate に播種し, 1, 5 および 10 Gy の IR を照射した. 培養後, 50 個以上の細胞を含むコロニー数を数えた. 3 回の独立した実験を行い, データは平均値±標準偏差として表した. F 検定を用いて等分散であることを確かめ, Student's *t* 検定によって *p* 値を求めた (*, $p < 0.05$).

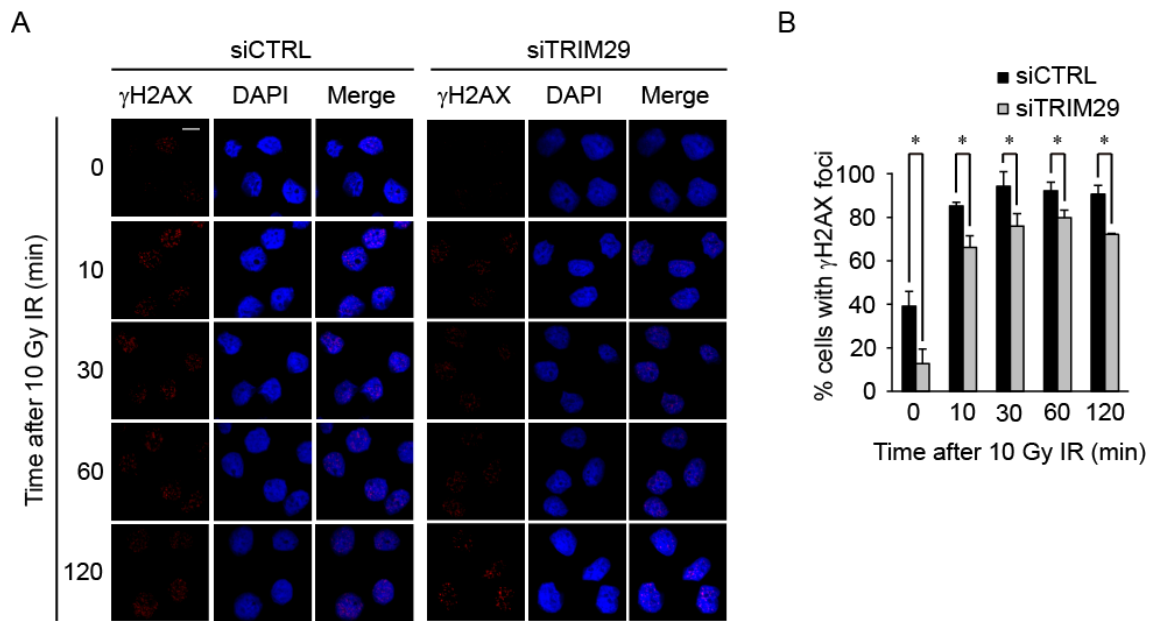


図 27. DNA 損傷によって誘導される γ H2AX foci 形成に対する TRIM29 ノックダウンの経時的な影響

(A) HeLa S3細胞にsiCTRLまたはsiTRIM29を導入した. 各細胞に10 Gyの放射線を照射し, 0分, 10分, 30分, 60分および120分培養後, 各細胞を固定した. 抗 γ H2AX抗体を用いて, γ H2AXを検出した (scale bar: 10 μ m). 0.4 μ g/ml DAPIを用いてDNAを染色した.

(B) 共焦点顕微鏡を用いて取得した画像をもとに, CellProfilerを用いて1細胞における γ H2AX foci数を解析した. 1細胞あたり10個以上の γ H2AX fociを有する細胞を γ H2AX陽性細胞とした. 3回の独立した実験を行い, 1回の解析あたり最低30個以上の細胞を解析した. データは平均値 $\pm$ 標準偏差として表した. Student's *t*検定によって*p*値を求めた (*, $p < 0.05$).

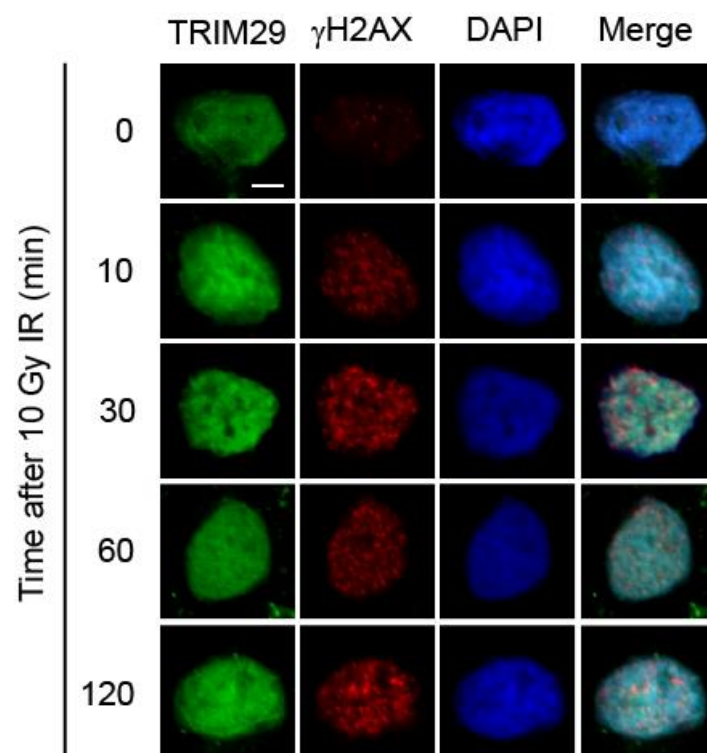


図 28. DNA 損傷後の TRIM29 および γ H2AX の細胞内局在

HeLa S3細胞に10 Gyの放射線を照射し、0分、10分、30分、60分および120分培養後、各細胞を固定した。抗TRIM29抗体および抗 γ H2AX抗体を用いて、TRIM29および γ H2AXを検出した (scale bar: 5 μ m)。0.4 μ g/ml DAPIを用いてDNAを染色した。

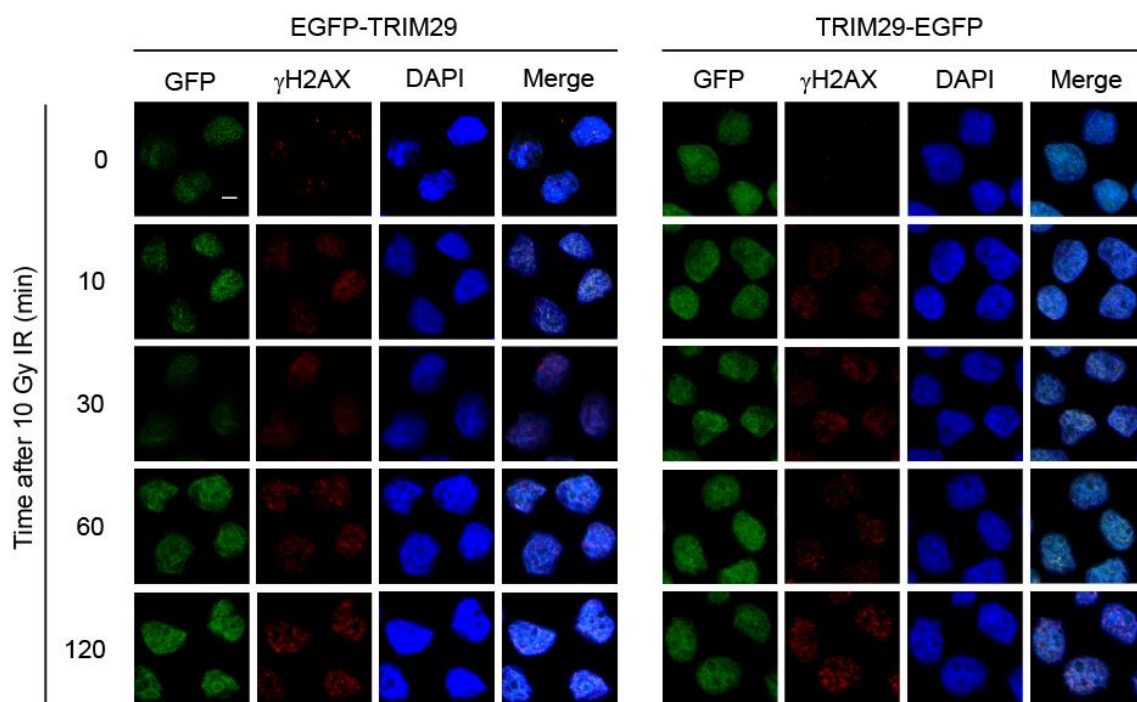


図 29. DNA 損傷後の EGFP-TRIM29 および TRIM29-EGFP の細胞内局在

HeLa S3細胞にEGFP-TRIM29（N末端タグ）およびTRIM29-EGFP（C末端タグ）を一過的に過剰発現させた．各細胞に10 Gyの放射線を照射し，0分，10分，30分，60分および120分培養後，各細胞を固定した．共焦点顕微鏡を用いてEGFPタグ付きTRIM29および γ H2AXを検出した（scale bar: 5 μ m）．0.4 μ g/ml DAPIを用いてDNAを染色した．

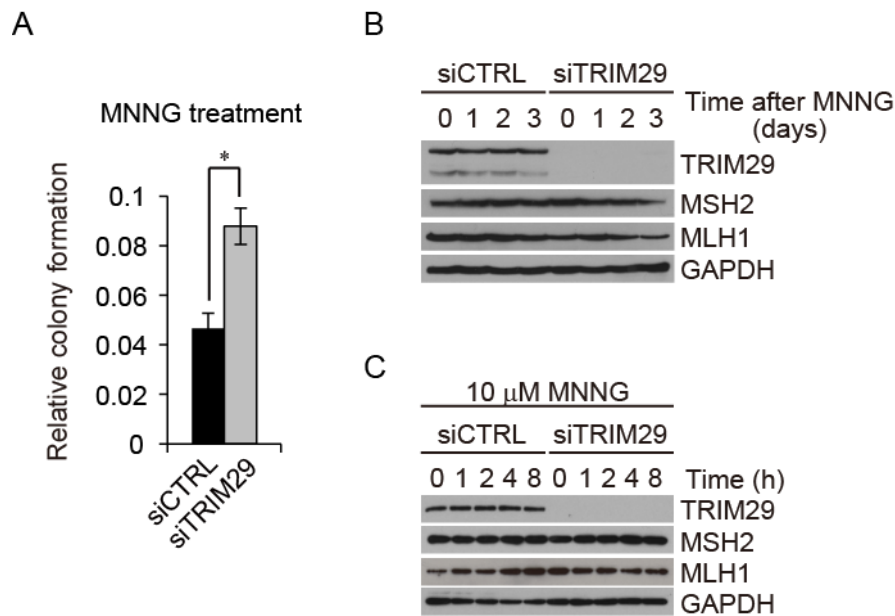


図 30. TRIM29 ノックダウンが MNNG 耐性能に与える影響

- (A) HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した. 48 時間培養後, 10 μ M MNNG を含む培地で 2 時間培養した. HeLa S3 細胞を 6 well plate に播種し, 7 から 10 日間培養後, 50 個以上の細胞を含むコロニー数を数えた. 3 回の独立した実験を行い, データは平均値 $\pm$ 標準偏差として表した. F 検定を用いて不等分散であること確かめ, Welch's *t* 検定によって *p* 値を求めた (*, $p < 0.05$).
- (B) HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した. 48 時間後, 10 μ M MNNG を含む培地で 0, 1, 2, 4 および 8 時間培養した. 各細胞溶解液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって各タンパク質を解析した. ローディングコントロールとして, GAPDH を用いた.
- (C) HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した. 48 時間後, 10 μ M MNNG を含む培地で 0, 1, 2, 4 および 8 時間培養した. 各細胞溶解液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって各タンパク質を解析した. ローディングコントロールとして, GAPDH を用いた.

第7項 TRIM29複合体のH2AXヌクレオソームへの結合

TRIM29はクロマチン上に存在していることを示した。TRIM29がクロマチンに結合するかを明らかにするために、FLAG-TRIM29安定発現細胞からヌクレオソームを豊富に含む核抽出液の調整を行った。Dignam法は、高塩濃度緩衝液を用いてタンパク質とDNAを解離させるため、ヌクレオソームを含む核抽出液の調整には適していない。そこで、クロマチンのリンカーDNAを選択的に切断する酵素活性を持つMNaseを用いて、ヌクレオソームを豊富に含む核抽出液を調製した。得られた核抽出液を用いて、TRIM29複合体を各濃度のNaCl存在下で精製した (図31)。Dignam法により調製した核抽出液から精製したTRIM29複合体をコントロールとして用いた。TRIM29は、NaCl非存在においてH2AXを含むヌクレオソームに結合したが、100 mM 以上のNaCl存在下では、DNA修復タンパク質およびヌクレオソームから解離した (図32)。

DNA 修復タンパク質のクロマチン上での機能は、ヒストンの PTM によって複雑に制御されている。そこで、TRIM29 複合体のクロマチンへの結合様式を解析するために、FLAG タグ付き H2AX の野生型および 139 番目のセリン残基をアラニン残基に置換した S139A 変異体を安定発現する HeLa S3 細胞を作製した。IR 照射前と IR 照射後の各安定発現細胞株の核抽出液から、FLAG-H2AX 野生型または S139A 変異型と結合タンパク質から成る複合体を免疫沈降によって精製した。また、核抽出液に含まれる DNA をヌクレアーゼで分解することによって、DNA を介した間接的なタンパク質同士の結合を排除した。銀染色によってコアヒストンが精製されていることを確認した (図 33)。ウェスタンブロット法によって TRIM29 および DNA 修復タンパク質のヒストン複合体への結合を評価した。TRIM29 および TRIM29 複合体の構成因子は H2AX を含むヒストン複合体に結合したが、TRIM29, MSH6 および MLH1 と H2AX の結合は IR 照射によって低下した (図 34)。一方で、ATM, BRCA1, SMC1A および SMC3 は、DSB に応答して γ H2AX に集積するという報告と一致して、これらのタンパク質と H2AX の結合は IR 照射によって増加した (図 34)。S139A 点変異は、TRIM29 とヒストン複合体との結合を弱めた (図 34)。S139A の点変異導入によって、ATM, DNA-PKcs, BRCA1 および DNA ミスマッチ修復タンパク質のヒストン複合体への結合が消失した (図 34)。一方で、SMC1A および SMC3 のヒストン複合体への結合は、S139A 点変異導入による影響を受けなかった (図 34)。以上より、DNA 損傷に応答して TRIM29, MSH6 および MLH1 が H2AX を含むヒストン複合体から解離することによって、DSB 修復タンパク質のクロマチンへの集積が促進されることが示唆された。

H3K36me2/me3, H4K16Ac および H4K20me2 は、DNA 修復タンパク質がクロマチンに集積するための足場として機能することが知られている^{27,29,33}。そ

こで、DNA 損傷に応答した TRIM29 の H2AX を含むヒストン複合体からの解離が、H3K36me2/me3, H4K16Ac および H4K20me2 と関係があるのかどうかを調べた。H2AX のリン酸化に付随して、H3K36me2, H4K16Ac および H4K20me2 が低下し、H3K36me2 が増加した (図 34)。この結果は、DNA 損傷前の TRIM29 複合体は H3K36me2 および H4K16Ac に高い親和性を示す一方で、DNA 損傷後の TRIM29 複合体が H3K36me3 に結合しないという結果と一致している。さらに、TRIM29 が DNA 損傷に応答して H3K36me3 から解離するかどうかを免疫染色法により解析した。TRIM29 は IR 照射に関係なく、H3K36me3 と部分的に共局在した (図 35)。これらの結果から、TRIM29 複合体の H2AX ヌクレオソームへの結合は、H4K16Ac, H4K20me2 および H3K36me2/3 によって制御されていることが判明した。

次に、TRIM29複合体が特定のヒストンPTMに結合する能力を持つのかどうかを検討するために、ヒストンH2A, H2B, H3およびH4のN末端側尾部の多様なPTMの組み合わせで形成されているMODified Histone Peptide Arrayを用いた。本アレイは、384通りの組み合わせのヒストンPTMで構成されている。データの解析にはArray Analyze Software (<http://www.activemotif.com/>) を用いた。FLAG-TRIM29安定発現HeLa S3細胞から精製し、MODified Histone Peptide Arrayと反応させた (図36A)。TRIM29複合体は、翻訳後修飾されたH4テール (アミノ酸残基番号16-20) やH3K36に対して、高い結合能を示した (図37)。次に、TRIM29複合体とヒストンPTMの結合が、DNA損傷によって制御されているのかどうかを調べた。IR照射後のFLAG-TRIM29安定発現HeLa S3細胞から精製し、MODified Histone Peptide Arrayと反応させた (図36B)。TRIM29複合体は、修飾されたH4テールに対してIR照射前と同様に結合したが、修飾されたH3K36に対して結合しなかった (図37)。以上の結果から、TRIM29複合体は、翻訳後修飾されたH4テール (アミノ酸残基番号16-20) やH3K36を介してクロマチンに結合することが明らかになった。さらに、TRIM29複合体のクロマチンへの結合はDNA損傷依存的であり、H3K36のPTMによって制御されることが示唆された。

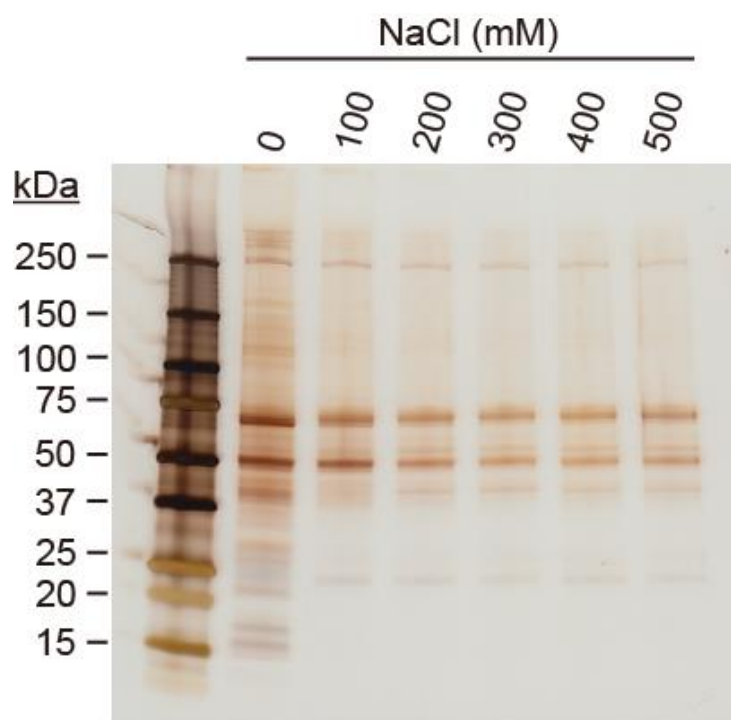


図 31. 銀染色による FLAG-TRIM29 複合体のヌクレオソームに対する結合の解析

FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞から無傷核を調製し，各濃度の NaCl 存在下において免疫沈降を行った．得られた免疫沈降溶液を 4-20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE に展開した．銀染色法によってタンパク質の検出を行った．

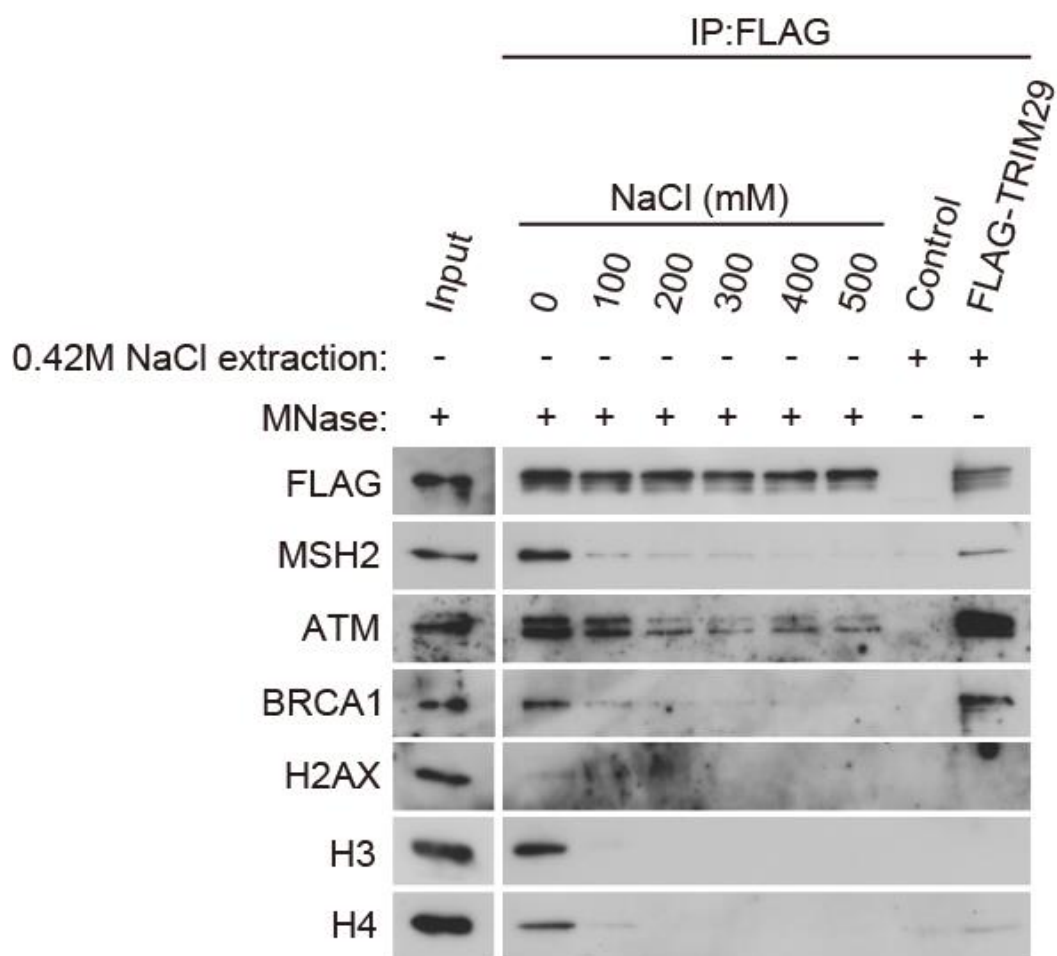


図 32. ウェスタンブロッティングによる FLAG-TRIM29 複合体のヌクレオソームに対する結合の解析

FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞から無傷の細胞核を調製し、各条件下で免疫沈降を行った。得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し、ウェスタンブロッティングによって解析を行った。

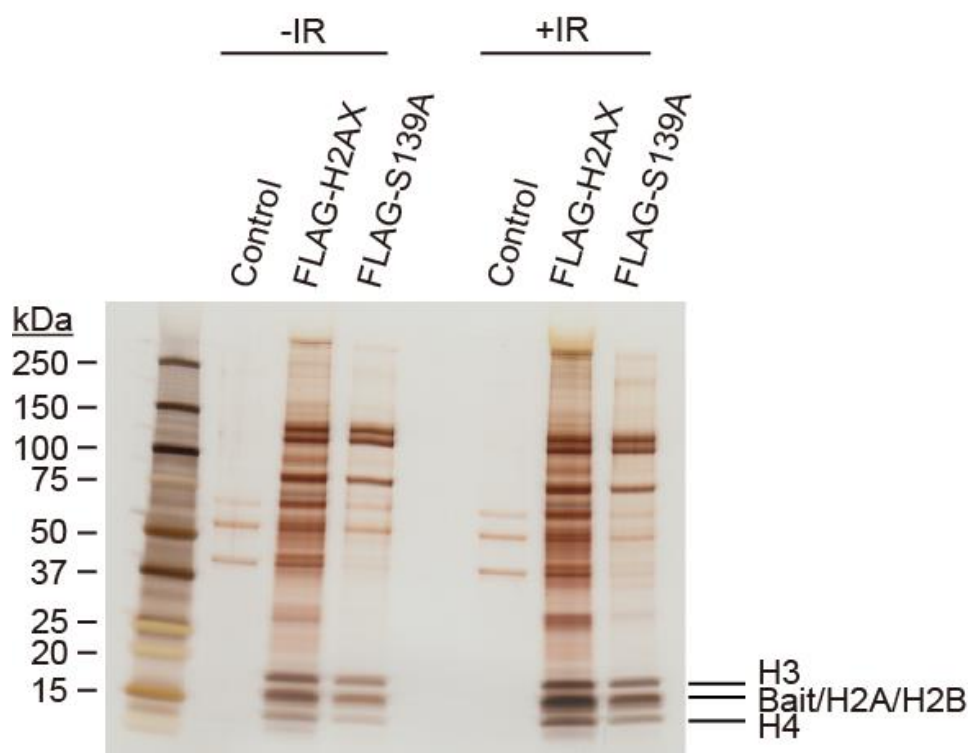


図 33. 銀染色による FLAG-H2AX 野生型および S139A 変異型に対する結合タンパク質の解析

FLAG-H2AX 野生型および S139A 変異型の安定発現 HeLa S3 細胞に 10 Gy の放射線を照射した. 1 時間培養後, 各細胞から核抽出液を調製し, FLAG-H2AX および結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液を 4-20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE に展開した. 銀染色法によってタンパク質の検出を行った.

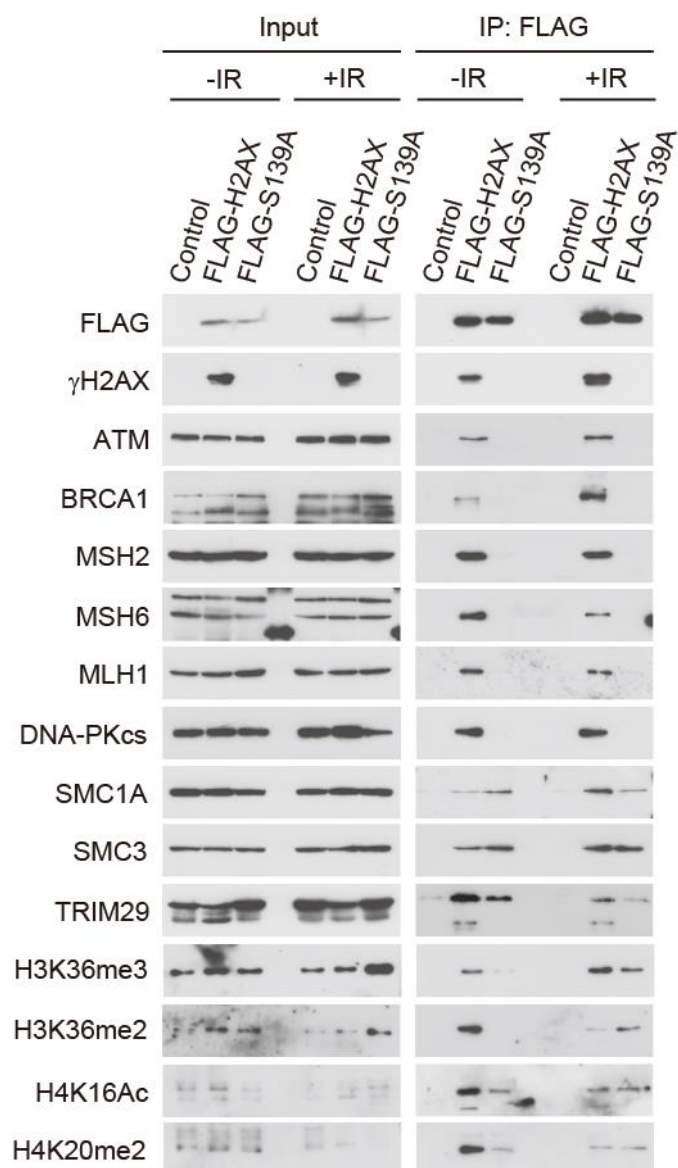


図 34. ウェスタンブロッティングによる FLAG-H2AX 野生型および S139A 変異型に対する結合タンパク質の解析

FLAG-H2AX野生型およびS139A変異型の安定発現HeLa S3細胞に10 Gyの放射線を照射した。1時間培養後、各細胞から核抽出液を調製し、FLAG-H2AX および結合タンパク質を免疫沈降により精製した。得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGEに展開し、ウェスタンブロッティングによって解析した。

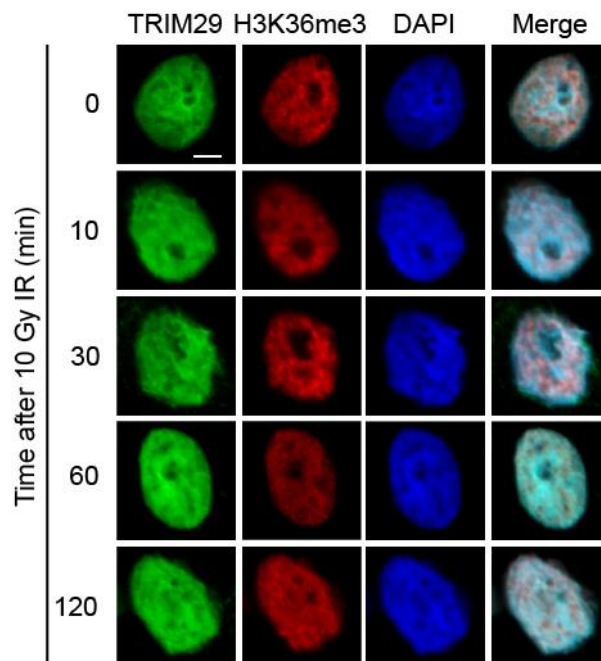


図 35. DNA 損傷後の TRIM29 および H3K36me3 の細胞内局在

HeLa S3細胞に10 Gyの放射線を照射し、0分、10分、30分、60分および120分培養後、各細胞を固定した。抗TRIM29抗体および抗 γ H2AX抗体を用いて、TRIM29およびH3K36me3を検出した (scale bar: 5 μ m). 0.4 μ g/ml DAPIを用いてDNAを染色した。

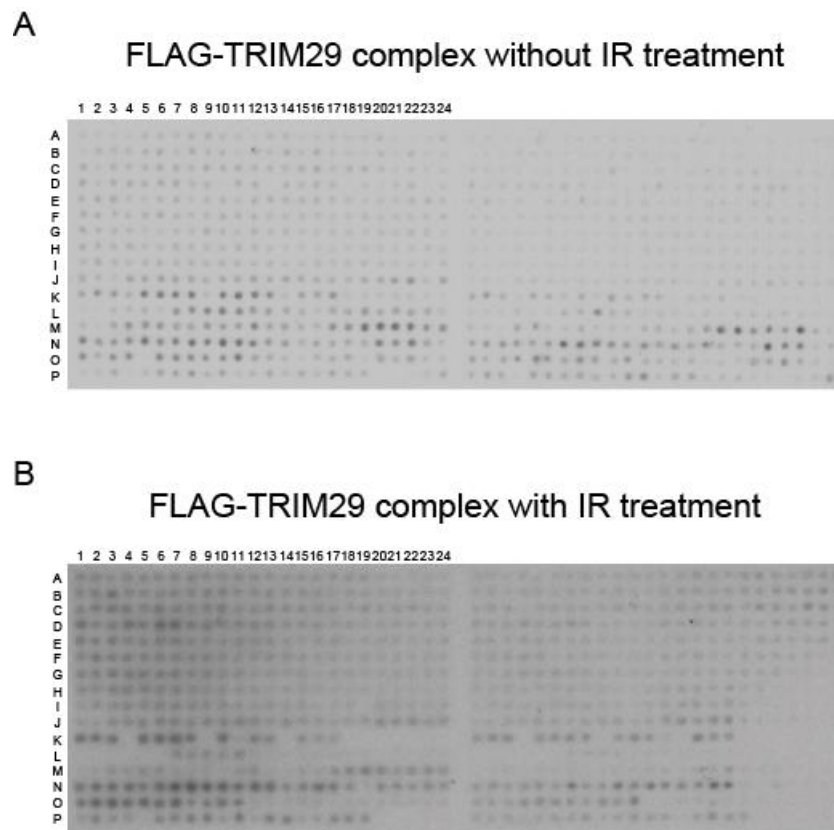


図 36. TRIM29 複合体のヒストン翻訳後修飾への結合特異性の解析

IR非照射 (A) および照射後 (B) のFLAG-TRIM29安定発現HeLa S3細胞から核抽出液を調製し，免疫沈降によりFLAG-TRIM29複合体を精製した．各TRIM29複合体をModified Histone Peptide Arrayと反応させた．

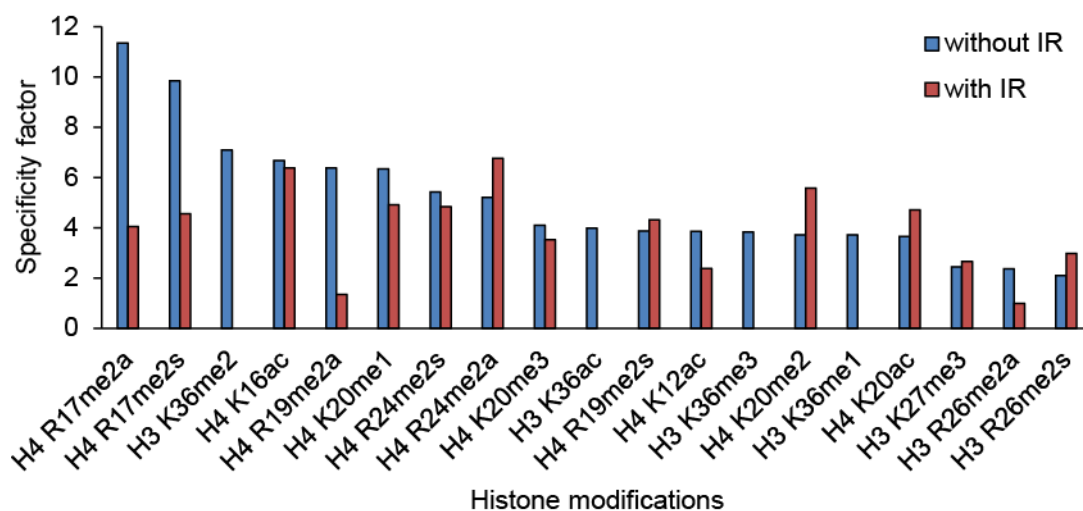


図 37. TRIM29 複合体のヒストン翻訳後修飾への結合特異性

IR非照射および照射後のFLAG-TRIM29安定発現HeLa S3細胞から核抽出液を調製し、免疫沈降によりFLAG-TRIM29複合体を精製した。Modified Histone Peptide Arrayを用いて、各FLAG-TRIM29複合体のヒストン翻訳後修飾への結合特異性を評価した。

第8項 TRIM29のクロマチンへの結合

TRIM29のクロマチンへの結合部位を同定するために、FLAG-TRIM29の野生型および各変異体（アミノ酸残基番号1-588, 161-588, 253-588, 1-219）からヌクレオソームを豊富に含む核抽出液を調整し、プルダウンアッセイを行った。野生型TRIM29はヌクレオソームに結合したが、N末端側のアミノ酸配列の欠損変異体（アミノ酸残基番号166-588）はヌクレオソームに結合しなかった（図38）。また、C末端側のアミノ酸配列の欠損変異体（アミノ酸残基番号1-219および1-166）もヌクレオソームに結合しなかった（図38）。したがって、TRIM29がクロマチンに結合するためには、N末端ドメインおよびC末端ドメインが必要であることが示唆された。

TRIM29のN末端ドメインに機能的なモチーフが存在しないかどうかを探索した。TRIM29のN末端側のアミノ酸残基48番から55番の配列は、ATPaseにおいて高度に保存されているWalker Aモチーフ（GXXXXGKS/T）であることがわかった⁵⁴（図39A）。Walker Aモチーフのリジン残基はATPの γ 位のリン酸基と水素結合を形成し、セリン/スレオニン残基は Mg^{2+} と結合することが生化学的な実験や結晶構造解析によって示されている^{55,56}。そこで、TRIM29がATPまたはADP結合能を持つかどうかを調べるために、54番目のリジン残基と55番目のセリン残基をアラニン残基に置換した組換え体FLAG-K54A/S55Aを作製した。ATPおよびADPによるプルダウンアッセイを行った結果、野生型TRIM29はATPおよびADPに結合したが、K54A/S55Aの変異導入によってATPおよびADPに対する結合は低下した（図39B）。

TRIM29のN末端ドメインおよびC末端ドメインがクロマチンへの結合に必要であるという結果から、Walker A motifおよびMSH2への結合部位が、TRIM29のクロマチンへの結合に必要ではないかと推察した。TRIM29のATP結合能およびMSH2への結合能が、TRIM29のクロマチンへの結合に必要であるかどうかを調べるために、FLAGタグ付きTRIM29のK54A/S55A変異体およびK54A/S55A/D414A/D415A変異体を安定発現するHeLa S3細胞を作製した。FLAG-TRIM29野生型、FLAG-K54A/S55A変異体、FLAG-D414A/D415A変異体およびFLAG-K54A/S55A/D414A/D415A変異体の安定発現細胞からヌクレオソームを豊富に含む核抽出液を調製し、TRIM29のMSH2、H3およびATMに対する結合をプルダウンアッセイによって評価した。D414A/D415A変異体はH3に対して野生型よりも強く結合し、MSH2結合能を欠損しているにも関わらず、MSH2に結合した（図40A）。MSH2は、H3K36me3結合能をもつMSH6とヘテロダイマーを形成している。この報告を踏まえると、D414A/D415A変異体はH3を介してMSH2に結合しているのかもしれない。TRIM29へのK54A/S55A変異導入は、MSH2とH3に対する結合を安定化した（図40A）。また、

K54A/S55A/D414A/D415A変異導入は、TRIM29のMSH2およびH3に対する結合能を野生型よりも減衰させた (図40A). さらに、各TRIM29タンパク質におけるH3に対するMSH2の結合量を評価した. D414A/D415A変異導入によってMSH2への結合量が減少し、K54A/S55A変異導入によってMSH2への結合量が増加した (図40B). K54A/S55A/D414A/D415A変異体では、H3に対するMSH2の結合が消失した (図40B). 興味深いことに、ATMはK54A/S55A/D414A/D415A変異体にのみ結合した (図40A). 以上の結果から、TRIM29のクロマチンへの結合は、Walker A motifおよびMSH2に依存していることが明らかになった. また、TRIM29がATMに結合するためには、クロマチンからの解離が必要であることが示唆された.

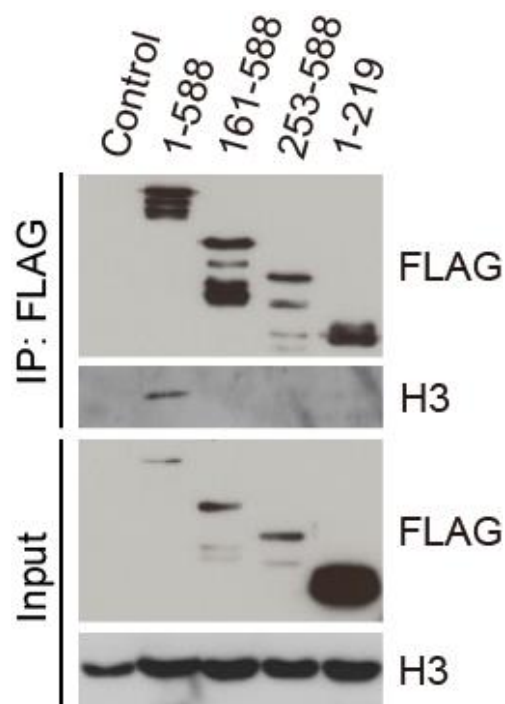


図 38. FLAG-TRIM29 のヌクレオソームに対する結合部位の同定

FLAG-TRIM29 野生型および変異型 (1-588, 161-588, 253-588 および 1-219) 安定発現 HeLa S3 細胞からヌクレオソームを含む核抽出液を調製し，免疫沈降を行った．得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し，ウエスタンブロッティングによって解析を行った．

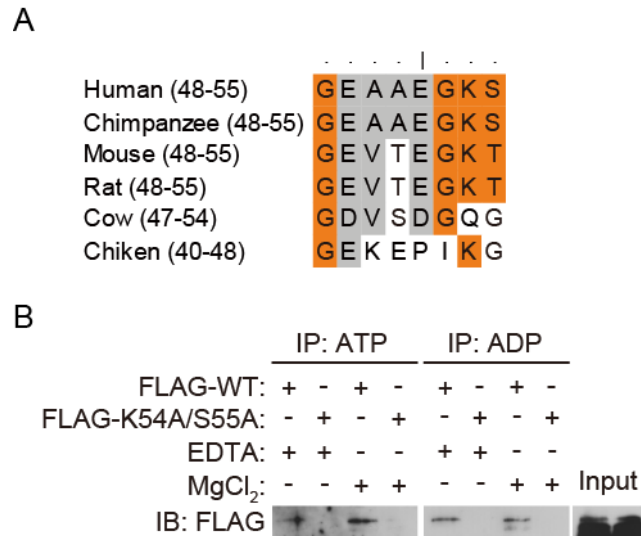


図 39. TRIM29 の ATP および ADP に対する結合能の評価

- (A) TRIM29 (アミノ酸残基 48 番から 55 番) の Walker A motif のマルチプルアラインメント ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いてマルチプルアラインメントを作成した.
- (B) 10 mM EDTA または MgCl₂ 存在下において, FLAG-TRIM29 野生型または K54A/S55A 変異型を ATP-agarose または ADP-agarose に吸着させた. 非吸着タンパク質を除去し, 10 mM ATP を加えることによって吸着タンパク質を溶出した. 得られたタンパク質溶液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.

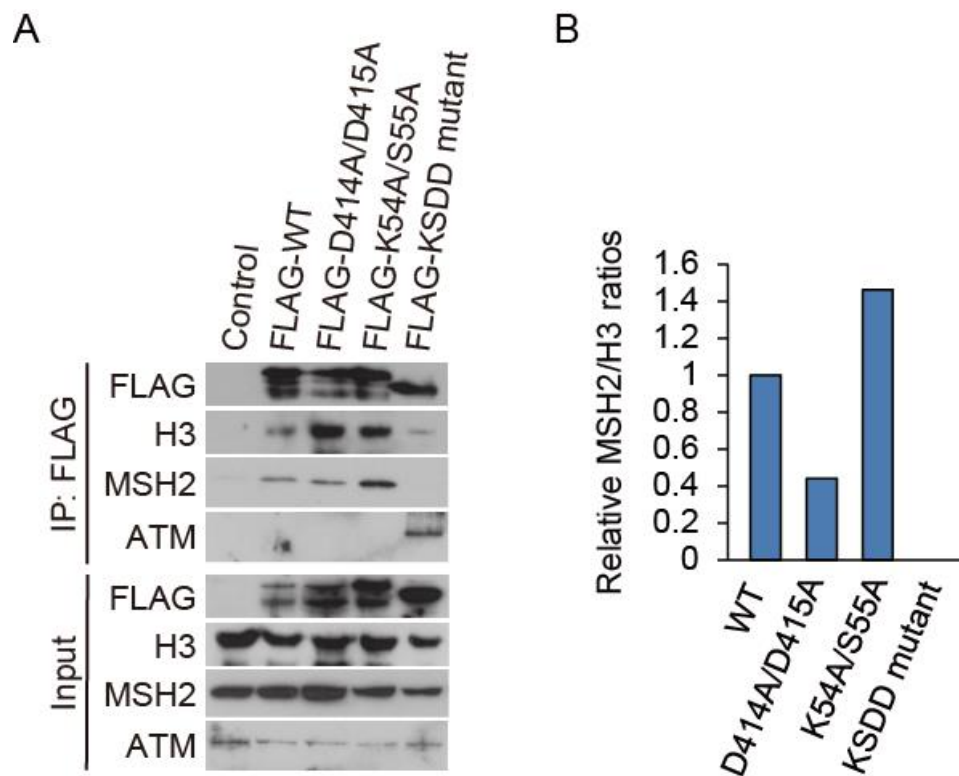


図 40. TRIM29 の Walker A motif および DNA 修復タンパク質への結合部位がクロマチン結合に果たす役割

- (A) FLAG-TRIM29 野生型および変異型 (D414A/D415A, K54A/S55A および K54A/S55A/D414A/D415A) 安定発現 HeLa S3 細胞からヌクレオソームを含む核抽出液を調製し、免疫沈降を行った。得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し、ウエスタンブロッティングによって解析を行った。
- (B) FLAG-TRIM29 タンパク質への MSH2 および H3 の結合量を相対評価した。ウエスタンブロッティングによって検出された MSH2 および H3 のバンドを NIH ImageJ を用いて解析した。MSH2 を H3 のバンド強度を用いてそれぞれ標準化した。

第9項 TRIM29のヒストン結合能の評価

TRIM29 がクロマチンに直接結合するのかどうかを検討した。HeLa 細胞から精製したモノヌクレオソーム (EpiCypher 社より購入) および組換え体ヒストンオクタマー (EpiCypher 社より購入) を用いた *in vitro* タンパク質結合実験を 150 mM NaCl 存在下で行った。まず、モノヌクレオソームおよびコアヒストンの PTM をウェスタンブロットによって解析した。モノヌクレオソームには PTM が含まれ、コアヒストンには PTM が含まれないことを確認した (図 41A)。本解析では、モノヌクレオソームに巻き付いている DNA を benzonase で分解したヒストンを翻訳後修飾されたヒストンとした。TRIM29 はモノヌクレオソームに含まれる H3 に結合しなかったが、TRIM29 は翻訳後修飾された H3 に結合した (図 41B)。TRIM29 は、組換え体ヒストンにも結合した (図 41B)。K54A/S55A 変異体は、翻訳後修飾された H3 に対して野生型よりも弱い結合能を示し、翻訳後修飾された H3 よりも組換え体ヒストンに対して強い結合を示した (図 41B)。銀染色によって、TRIM29 は H3/H4 ダイマーに結合することが明らかとなった (図 42)。また、150 mM NaCl 存在下において TRIM29 がヌクレオソーム結合しなかったことから、TRIM29 の DNA に対する結合能は低いと考えられた。この可能性を確かめるために、各濃度の NaCl 存在下における TRIM29 の DNA への結合能を評価した。TRIM29 は、NaCl 非存在下において DNA に結合したが、100 mM 以上の NaCl 存在下では DNA に結合しなかった (図 43)。この結果は、TRIM29 の DNA への結合能が弱いことを示している。

TRIM29 が特定のヒストン PTM に結合し、その結合が Walker A motif 依存적であるかどうかを検討した。MODifie Histone Peptide Array を用いて、組換え体 FLAG-TRIM29 野生型および K54A/S55A 変異型のヒストン PTM 結合能を評価した (図 44A および B)。野生型は、H3K36me3 に対して最も高い結合特異性を示し、H4 tail (アミノ酸残基 26 番から 45 番) に対しても親和性を示した (図 45A および B)。一方で、K54A/S55A 変異型は H4K16Ac に対して最も高い結合特異性を示し、H4 tail (アミノ酸残基 1 番から 16 番) に対しても親和性を示した (図 45A および B)。さらに、TRIM29 が H3K36me3 に Walker A motif 依存的に結合するのかどうかを *in vitro* タンパク質結合実験によって解析した。本解析には、*Xenopus laevis* 由来 H3K36me3 (Active motif 社より購入) を用いた。TRIM29 は、K54A/S55A の変異導入に関係なく、H3K36me3 に結合した (図 46)。これらの結果から、Walker A motifa はヌクレオソームヒストンに存在する翻訳後修飾されたヒストンテールへの結合の制御に関わることが示唆された。

いくつかの ATPase は Walker A motif 依存的に多量体を形成することが報告されている^{57,58}。ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、TRIM29 が Walker A

motif依存的に多量体を形成するかどうかを解析した．野生型TRIM29は，分子量75 kDaから650 kDaの画分に溶出された（図47A）．同様に，K54A/S55A変異型もまた分子量75 kDaから650 kDaの画分に溶出された（図47B）．Walker A motif依存的な変化は確認されなかった．したがって，TRIM29のWalker A motifは，翻訳後修飾されたヒストンへの結合の制御に関わっているが，TRIM29の多量体化には関係がないことがわかった．

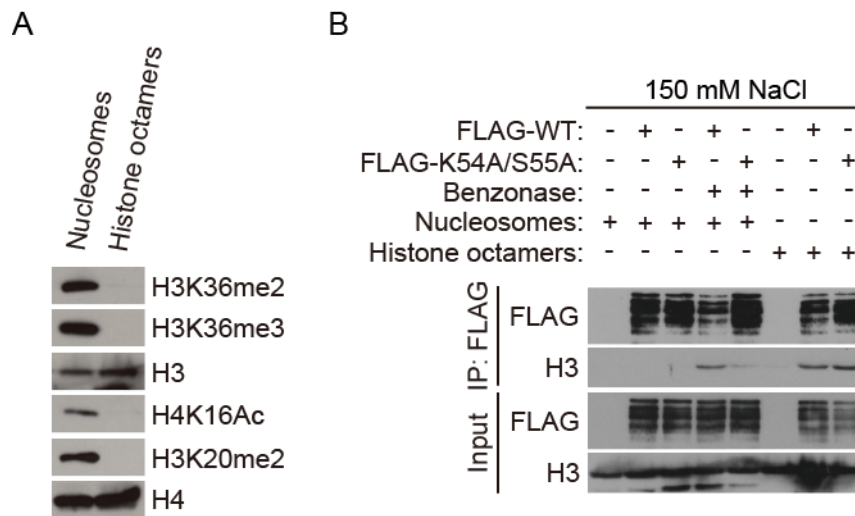


図 41. TRIM29 のヌクレオソームおよびヒストンオクタマーに対する結合能の解析

- (A) 0.5 μ g の HeLa 細胞由来 mononucleosome および組換え体 histone octamer を SDS-PAGE に展開し，ウエスタンブロットによって解析した．
- (B) FLAG-TRIM29野生型またはK54A/S55A変異型をM2-agaroseに吸着させた後，モノヌクレオソーム，benzonase処理したモノヌクレオソームまたはヒストンオクタマーと反応させた．非吸着タンパク質を除去し，3 $\times$ FLAGペプチドを加えることによって吸着タンパク質を溶出した．得られたタンパク質溶液をSDS-PAGEに展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した．

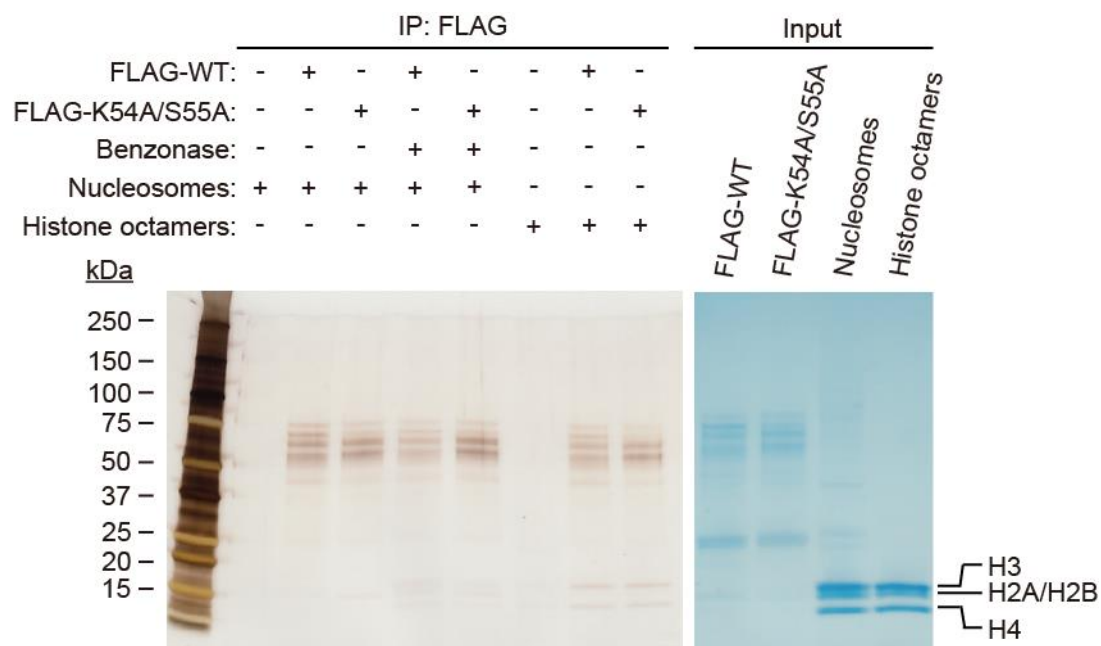


図 42. TRIM29 のヌクレオソームおよびヒストンオクタマーに対する結合能の解析

FLAG-TRIM29野生型またはK54A/S55A変異型をM2-agaroseに吸着させた後、モノヌクレオソーム, benzonase処理したモノヌクレオソームまたはヒストンオクタマーと反応させた. 非吸着タンパク質を除去し, 3×FLAGペプチドを加えることによって吸着タンパク質を溶出した. 得られた免疫沈降溶液を4-20%グラジエントゲルを用いたSDS-PAGEに展開した. 銀染色法によってタンパク質の検出を行った.

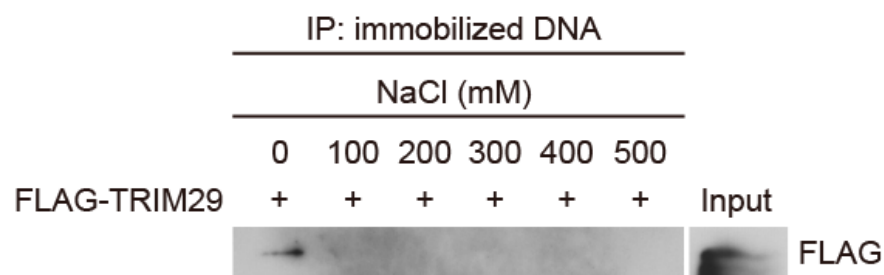


図 43. TRIM29 の DNA に対する結合能の解析

各濃度のNaCl存在下において，FLAG-TRIM29をDNA断片が付加されたDynabeadsと反応させた．非吸着タンパク質を除去し，SDS-PAGE sample bufferを加えることによって吸着タンパク質を溶出した．得られたタンパク質溶液をSDS-PAGEに展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した．

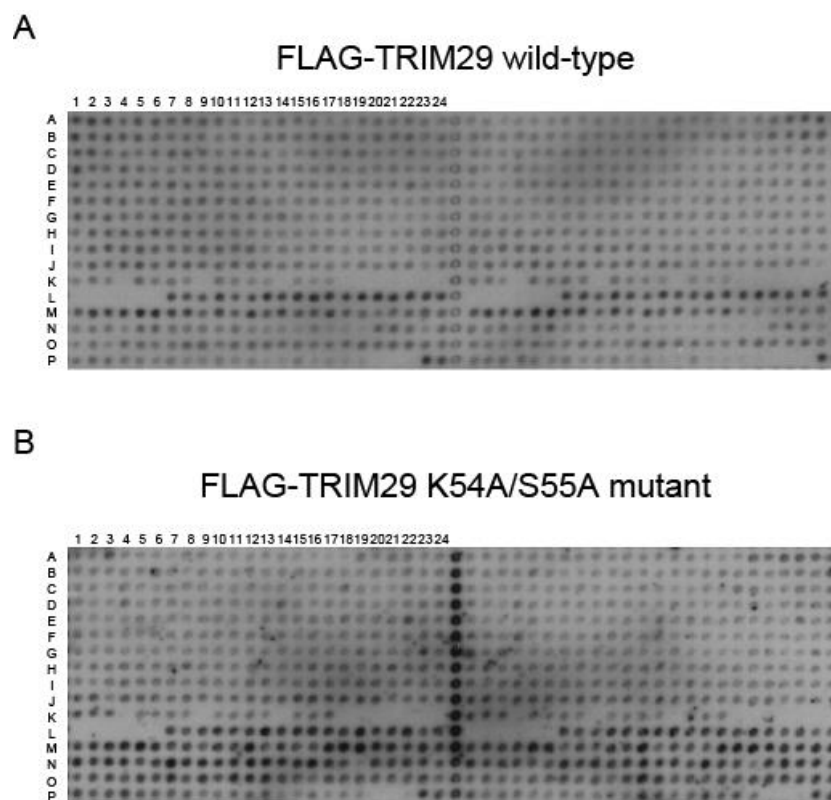


図 44. TRIM29 のヒストンペプチドへの結合

大腸菌を用いて組換え体FLAG-TRIM29野生型 (A) およびK54A/K55A変異型 (B) を作製し，Modified Histone Peptide Arrayと反応させた．

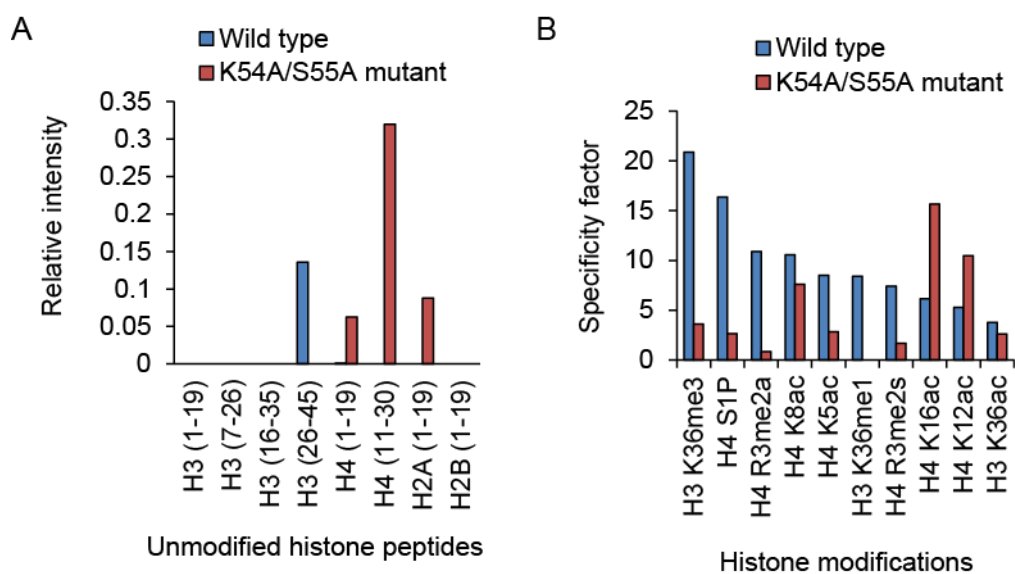


図 45. TRIM29 のヒストンペプチドへの結合

- (A) Modified Histone Peptide Arrayを用いて, FLAG-TRIM29のヒストンペプチドへの結合能を評価した.
- (B) Modified Histone Peptide Arrayを用いて, FLAG-TRIM29の翻訳後修飾されたヒストンペプチドへの結合特異性を評価した.

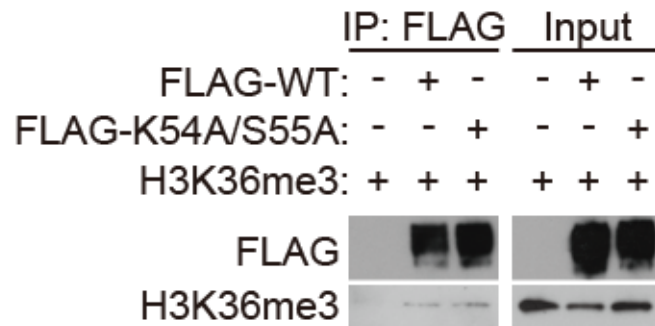


図 46. TRIM29 の H3K36me3 モノマーへの結合

FLAG-TRIM29野生型またはK54A/S55A変異型をM2-agaroseに吸着させた後、H3K36me3と反応させた。M2-agaroseから非吸着タンパク質を除去し、3×FLAGペプチドを加えることによって吸着タンパク質を溶出した。得られたタンパク質溶液をSDS-PAGEに展開し、ウエスタンブロッティングによって解析した。

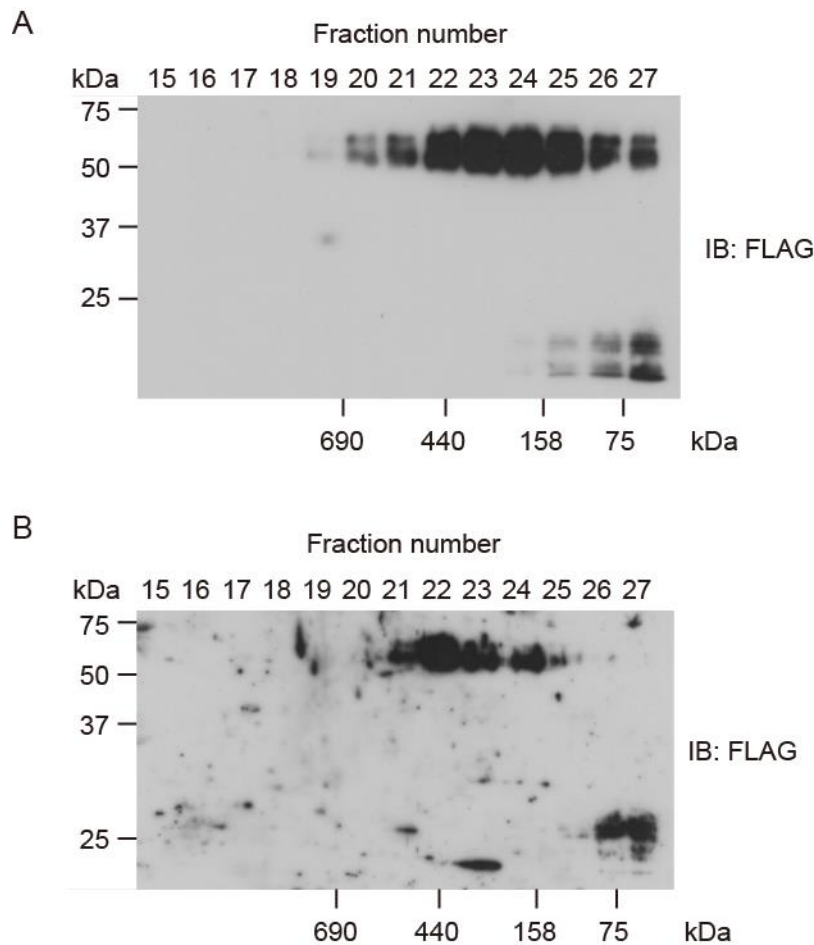


図 47. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TRIM29 野生型および K54A/S55A 変異体の解析

- (A) 150 mM NaCl および 10% (v/v) glycerol を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9) で平衡化した Superose 6 HR 10/30 fast protein liquid chromatography column にて 8.5 μ g の FLAG-tagged TRIM29 を分析した. 流速を 20 μ l/min に設定し, 65 μ l ずつ分画した. 画分 15 から 27 を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロット法によって解析した.
- (B) 150 mM NaCl および 10% (v/v) glycerol を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.9) で平衡化した Superose 6 HR 10/30 fast protein liquid chromatography column にて 0.35 μ g の FLAG-TRIM29 K54A/S55A 変異体を分析した. 流速を 20 μ l/min に設定し, 65 μ l ずつ分画した. 画分 15 から 27 を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロット法によって解析した.

第10項 TRIM29のクロマチン結合能とDNA修復の関係

第1項において、TRIM29-EGFPは、HeLa S3細胞においてクロマチン上に存在するが、U2OS細胞ではクロマチン上に存在しないことを示した (図6). DDRの活性化におけるTRIM29の役割を決定するために、TRIM29の核内局在がDDRの活性化に必要であるかどうかを検討した. TRIM29-EGFP安定発現HeLa S3細胞およびU2OS細胞に10 GyのIRを照射し、TRIM29-EGFPの細胞内局在およびH2AXのリン酸化レベルを解析した. HeLa S3細胞およびU2OS細胞において、TRIM29-EGFPの細胞内局在はIR照射前後において変化しなかった (図48A). HeLa S3細胞では、TRIM29-EGFPの過剰発現によって γ H2AXのbasalな存在量が上昇したが、IR照射による γ H2AXの誘導も正常に起こった (図48B). U2OS細胞では、TRIM29-EGFPの過剰発現によってIR依存的なH2AXのリン酸化が抑制され (図48B)、放射線耐性能が低下した (図48C). 以上より、TRIM29はクロマチン上に存在することが、DNA損傷依存的にH2AXがリン酸化されるために必要であり、細胞質への蓄積はDNA修復シグナルを抑制することが判明した.

次に、TRIM29のクロマチンへの結合が、DDRの活性化に必要であるかどうかを検討した. TRIM29のヒストンおよびDNA修復タンパク質への結合は、それぞれK54/S55およびD414/D415によって制御されていることを示した. さらに、K54/S55およびD414/D415への変異導入によって、TRIM29のクロマチンへの結合が低下することが判明した (図40). そこで、FLAG-TRIM29野生型および変異型 (K54A/S55A, D414A/D415AおよびK54A/S55A/D414A/D415A) の安定発現HeLa S3細胞にIRを照射し、H2AXのリン酸化レベルを解析した. 野生型の過剰発現によって γ H2AXのbasalレベルが上昇したが、IR照射による γ H2AXの誘導も正常に行われた (図49A). K54A/S55A変異は、TRIM29過剰発現による γ H2AXのbasalレベルの上昇を抑制し、コントロールと同様の表現型を示した (図49A). D414A/D415A変異は、 γ H2AXのbasalレベルを上昇させたが、IR照射に応答したH2AXのリン酸化を抑制した (図49A). K54A/S55A/D414A/D415A変異は、IR照射に応答したH2AXのリン酸化をドミナントネガティブに抑制した (図49A). 次に、各細胞の放射線耐性能をコロニー形成アッセイによって解析した. TRIM29野生型の過剰発現は、放射線耐性能に対して大きな影響を与えなかった (図49B). K54A/S55AおよびD414A/D415Aの過剰発現は、細胞の放射線耐性能を低下させた (図49B). K54A/S55A/D414A/D415A変異体の過剰発現は、放射線耐性能をTRIM29ノックダウンと同程度まで低下させた (図49B). K54A/S55A/D414A/D415A変異体は、ヌクレオソーム結合能を持たないが、ATMに結合することができる (図40). したがって、K54A/S55A/D414A/D415A変異体はATMのクロマチンへの集積を

阻害することによって、DDRに対してドミナントネガティブな効果を示したと考えられた。

これらの結果から、TRIM29のクロマチンへの結合は、DDRを正常に活性化するために必要であることが判明した。内在性TRIM29をノックダウンすることによって、DDRにおけるTRIM29の機能をさらに解析した。内在性TRIM29をノックダウンするために、*TRIM29* mRNAの3' UTRに作用するsiRNAを用いた。TRIM29野生型およびK54A/S55A/D414A/D415Aの安定発現HeLa S3細胞にsiCTRLまたはsiTRIM29を導入した。72時間培養後、10 Gyの放射線を照射した。1時間培養後、各細胞を回収した。放射線照射前および照射後のH2AXのリン酸化レベルをウェスタンブロットによって解析した。内在性TRIM29存在下において、K54A/S55A/D414A/D415A変異型は γ H2AXのbasalレベルを低下させた(図50)。内在性TRIM29をノックダウンした場合、 γ H2AXのbasalレベルは野生型の過剰発現によって上昇したが、変異型の過剰発現では上昇しなかった(図50)。内在性TRIM29存在下において、DNA損傷によって誘導されるH2AXのリン酸化は、野生型の過剰発現によって上昇し、変異型の過剰発現によって抑制された(図50)。さらに、野生型および変異型の過剰発現に関係なく、内在性TRIM29ノックダウンによって、DNA損傷によって誘導されるH2AXのリン酸が抑制された(図50)。TRIM29ノックダウンした場合、野生型の過剰発現は放射線耐性能を上昇させたが、変異型の過剰発現は放射線耐性能を上昇させなかった(図51)。以上より、TRIM29のクロマチンへの結合は、 γ H2AXの誘導および放射線耐性能の制御において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

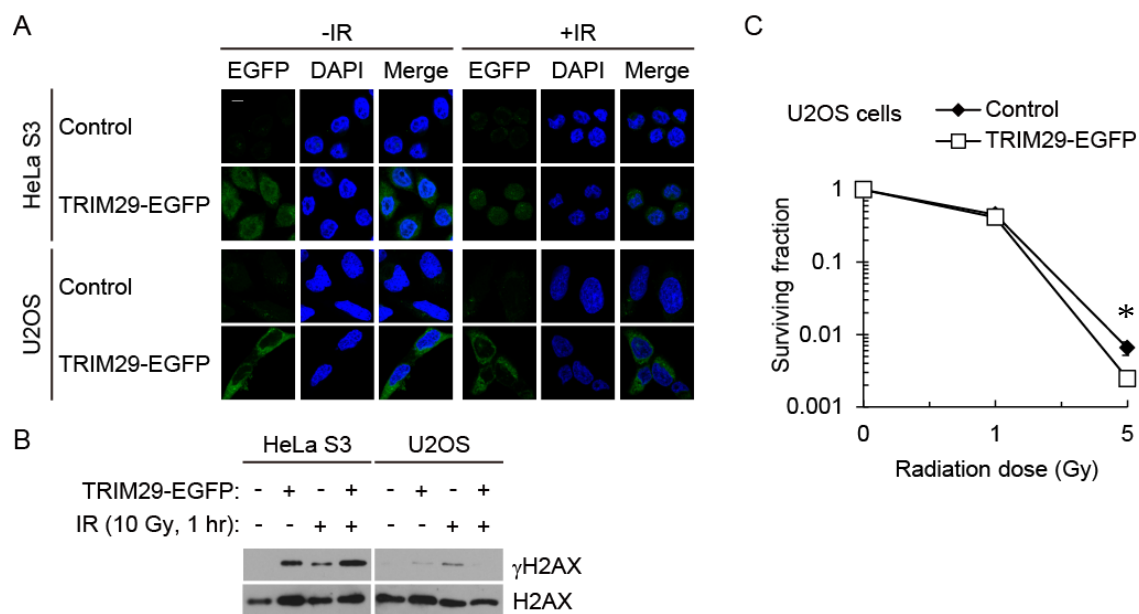


図 48. TRIM29 過剰発現が H2AX のリン酸化および放射線耐性に与える影響

- (A) TRIM29-EGFP を安定に発現する HeLa S3 細胞および U2OS 細胞に 10 Gy の放射線を照射した. 1 時間培養後, 各細胞を固定した. 共焦点顕微鏡を用いて TRIM29-EGFP の細胞内局在を解析した (scale bar: 5 μ m). 0.4 μ g/ml DAPI を用いて DNA を染色した.
- (B) TRIM29-EGFP の安定発現 HeLa S3 細胞および U2OS 細胞に 10 Gy の放射線を照射した. 1 時間培養後, 各細胞を回収した. 各細胞溶解液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した. ローディングコントロールとして, GAPDH を用いた.
- (C) TRIM29-EGFP の安定発現 U2OS 細胞を 6 well plate に播種し, 1, 5 および 10 Gy の IR を照射した. 培養後, 50 個以上の細胞を含むコロニー数を数えた. 3 回の独立した実験を行い, データは平均値 $\pm$ 標準偏差として表した. F 検定を用いて不等分散であること確かめ, Welch's *t* 検定によって *p* 値を求めた (*, $p < 0.05$).

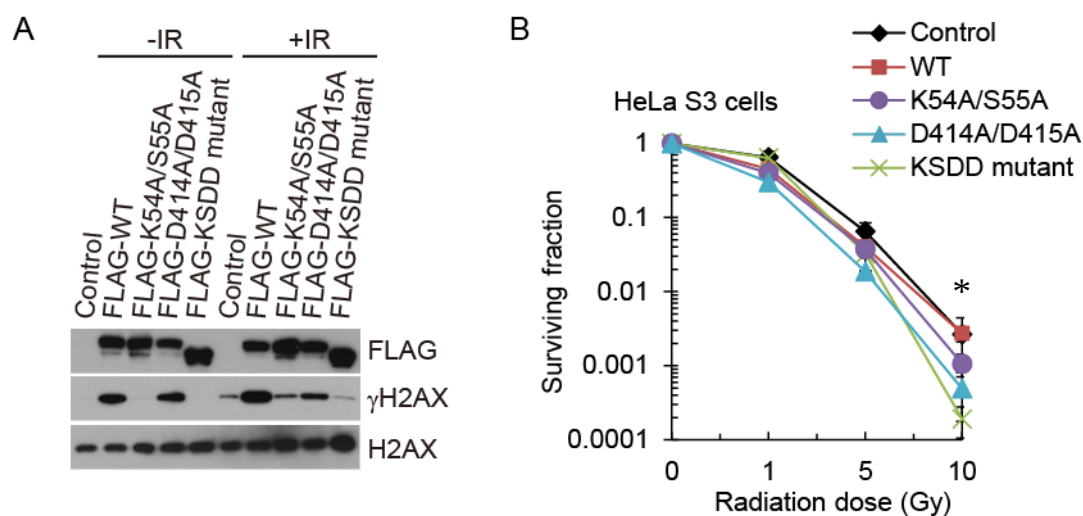


図 49. TRIM29 野生型および変異体の過剰発現が H2AX のリン酸化および放射線耐性に与える影響

- (A) FLAG-TRIM29野生型および変異型 (D414A/D415A, K54A/S55Aおよび K54A/S55A/D414A/D415A) 安定発現HeLa S3細胞に10 Gyの放射線を照射した. 1時間培養後, 各細胞を回収した. 各細胞溶解液をSDS-PAGEに展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.
- (B) FLAG-TRIM29 野生型および K54A/S55A, D414A/D415A および K54A/S55A/D414A/D415A 変異型の安定発現 HeLa S3 細胞を 6 well plate に播種し, 1, 5 および 10 Gy の IR を照射した. 培養後, 50 個以上の細胞を含むコロニー数を数えた. 3 回の独立した実験を行い, データは平均値 $\pm$ 標準偏差として表した. F 検定を用いて等分散であること確かめ, Student's t 検定によって p 値を求めた (*, $p < 0.05$).

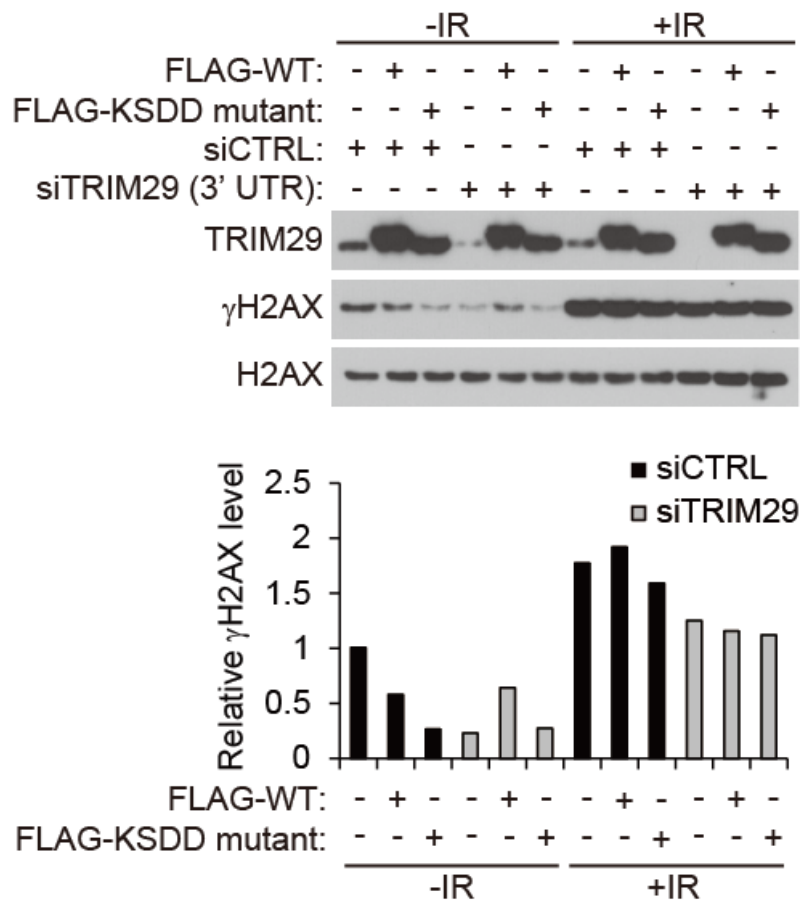


図 50. TRIM29 野生型および変異体の過剰発現が H2AX のリン酸化に与える影響

FLAG-TRIM29野生型およびK54A/S55A/D414A/D415A変異型の安定発現 HeLa S3細胞にsiCTRLまたはsiTRIM29 (3' UTR) を導入した。72時間培養後、各細胞に10 Gyの放射線を照射した。1時間培養後、各細胞を回収した。各細胞溶解液をSDS-PAGEに展開し、ウエスタンブロッティングによって解析した。

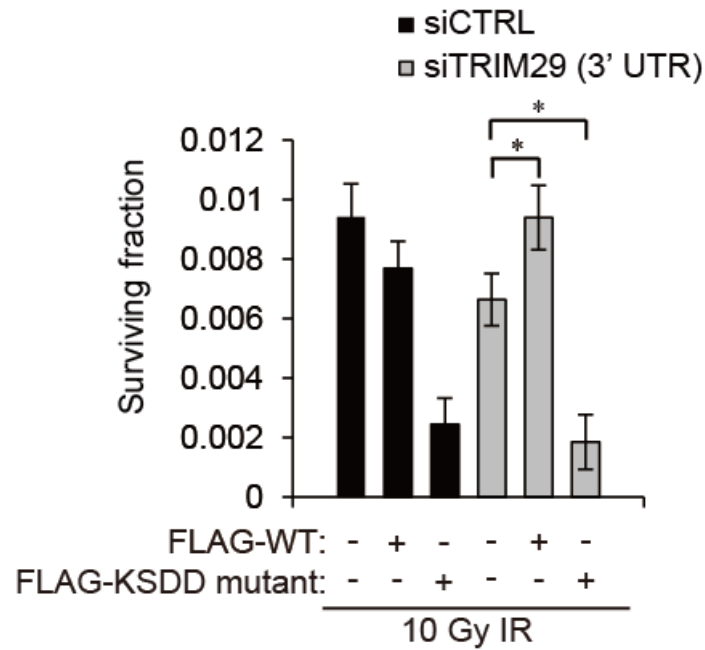


図 51. TRIM29 野生型および変異型の過剰発現が放射線耐性能に与える影響

FLAG-TRIM29 野生型および K54A/S55A/D414A/D415A 変異型の安定発現 HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 (3' UTR) を導入した. 72 時間培養後, 各細胞を 6 well plate に播種し, 10 Gy の IR を照射した. 培養後, 50 個以上の細胞を含むコロニー数を数えた. 3 回の独立した実験を行い, データは平均値±標準偏差として表した. F 検定を用いて不等分散であることを確かめ, Welch's *t* 検定によって *p* 値を求めた (*, $p < 0.05$).

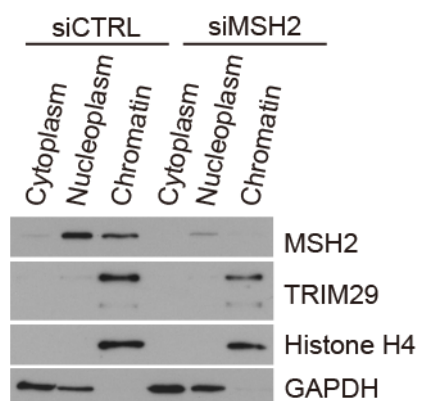
第11項 TRIM29におけるMSH2の役割

TRIM29 は、ヒストン結合タンパク質であるが、一般的な核移行シグナルを持たない。したがって、TRIM29 は結合タンパク質と複合体を形成することによって、核移行すると考えられる。第4項にて、TRIM29 はMSH2 に直接結合することを示した。MSH2 は、MSH6 の細胞内局在を制御することが報告されている⁵⁹。TRIM29 の核移行がMSH2 に依存しているのかどうかを解析した。RNA 干渉法によって HeLa S3 細胞および FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞の MSH2 をノックダウンし、各細胞を細胞質、核質およびクロマチン画分に分画した。ウェスタンブロットによって内在性および FLAG タグ付き TRIM29 の細胞内局在を解析した。MSH2 ノックダウンは、TRIM29 の細胞内局在に影響を与えなかった (図 52A および B)。

次に、TRIM29 が MSH2 を介して DNA 修復タンパク質と結合しているかどうかを検討した。RNA 干渉法によって FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞の MSH2 をノックダウンし、Dignam 法によって核抽出液を調製した。抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、FLAG-TRIM29 複合体を精製した。MSH2 ノックダウンは、TRIM29 の ATM への結合には大きな影響を与えなかったが、MLH1 への結合を低下させた (図 53A)。銀染色によって、MSH2 ノックダウンは TRIM29 複合体の形成に対して大きな影響を与えないことが明らかになった (図 53B)。以上より、TRIM29 は MSH2 を介して MMR タンパク質に結合し、他のタンパク質を介して ATM などのタンパク質と結合することが判明した。

クロマチン上で機能するタンパク質の多くが、ATP 依存的な機能を持つことが知られている⁶⁰。そこで、TRIM29-MSH2 複合体のクロマチンへの結合が ATP 依存的であるかどうかを検討した。FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞のヌクレオソーム抽出液に 1 mM ATP または 50 μ M ATP γ S を加え、プルダウンアッセイを行った。しかし、ATP 存在下において TRIM29-MSH2 複合体の H3 への結合は変化しなかった (図 54A)。一方で、ATP γ S 存在下において TRIM29-MSH2 複合体は H3 に結合しなかった (図 54B)。これらの結果から、TRIM29-MSH2 複合体のクロマチンへの結合は、ATP の加水分解に依存していることが明らかになった。

A



B

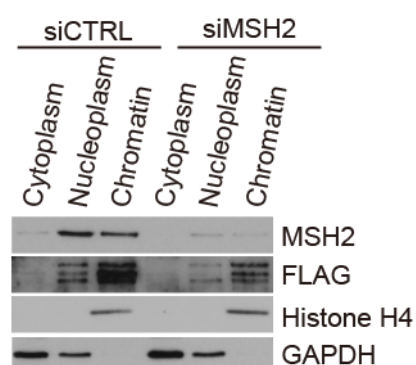


図 52. MSH2 ノックダウンが TRIM29 の細胞内局在に与える影響

- (A) RNA 干渉法により MSH2 をノックダウンした HeLa S3 細胞を細胞質，核質およびクロマチンに分画した．各タンパク質溶液を SDS-PAGE に展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した．
- (B) RNA 干渉法により MSH2 をノックダウンした FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞を細胞質，核質およびクロマチンに分画した．各タンパク質溶液を SDS-PAGE に展開し，ウエスタンブロッティングによって解析した．

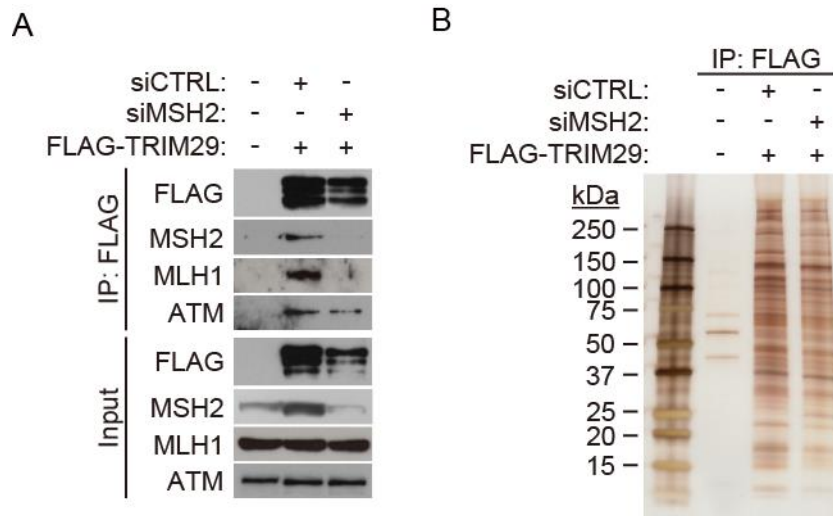


図 53. MSH2 ノックダウンが TRIM29 複合体形成に与える影響

- (A) RNA 干渉法により MSH2 をノックダウンした FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製した. 各核抽出液から FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.
- (B) RNA 干渉法により MSH2 をノックダウンした FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製した. 各核抽出液から FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液を 4-20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE に展開した. 銀染色法によってタンパク質の検出を行った.

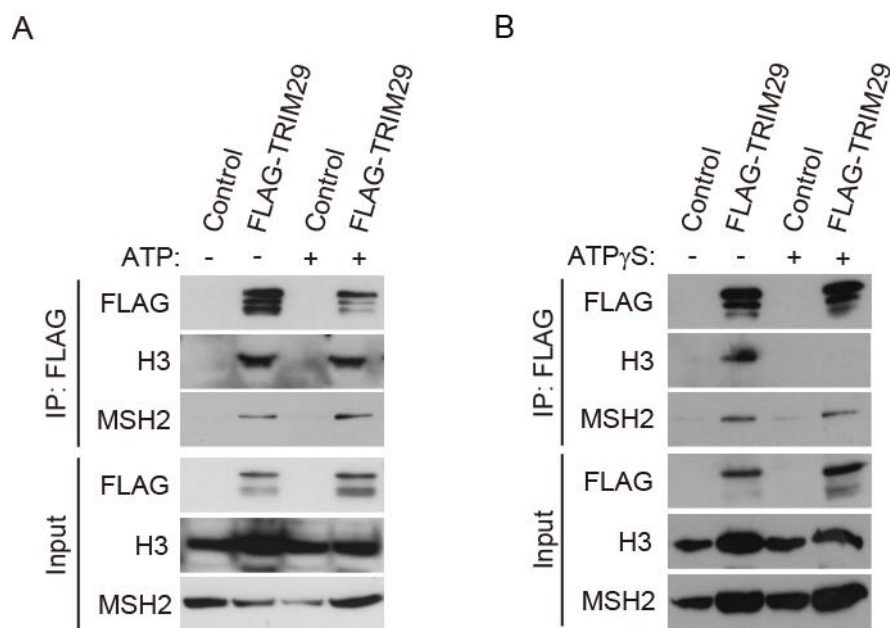


図 54. ATP または ATP γ S 存在下における FLAG-TRIM29 の H3 および MSH2 への結合

- (A) FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞からヌクレオソームを含む核抽出液を調製し、1 mM ATP 存在下または非存在下において免疫沈降を行った。得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し、ウエスタンブロッティングによって解析を行った。
- (B) FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞からヌクレオソームを含む核抽出液を調製し、50 μ M ATP γ S 存在下または非存在下において免疫沈降を行った。得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し、ウエスタンブロッティングによって解析を行った。

第12項 TRIM29のヒストン結合ドメインの予測

第9項にて, TRIM29 が H3K36me3 に結合することを示した. ヒストン結合タンパク質は, PTM を認識するドメインを介してヒストンに結合することが報告されている⁶¹. SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) を用いて, TRIM29 がヒストン PTM を認識するドメインを持つかどうかを予測した. ホモロジーモデリングを行った結果, TRIM29 の N 末端領域 (アミノ酸残基 59 番から 110 番) は, staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 (SND1) の Tudor ドメインと 32%の配列一致度および 33%の配列類似度を示した (図 55A). SND1 は, RNA 干渉の制御因子であり, C 末端に Tudor ドメインを持つことが示されている^{62,63}. Tudor ドメインは, 芳香族アミノ酸残基によって構成される aromatic cage と呼ばれる認識ポケットを持ち, メチル化されたヒストンのリジン残基を認識することが知られている⁴. PyMOL (<http://www.pymol.org/>) を用いて, TRIM29 の N 末端領域 (アミノ酸残基 59 番から 110 番) の立体構造モデルに SND1 の Tudor ドメインを重ね合わせた (図 55B). SND1 の aromatic cage (F740, Y746, Y763, Y766 および N768) に TRIM29 の構造モデルを重ね合わせた結果, TRIM29 の認識ポケットは F70, R76, S95, S98 および E100 によって構成されることが予測された (図 55C). 以上より, TRIM29 は Tudor ドメインを持つことが予想された.

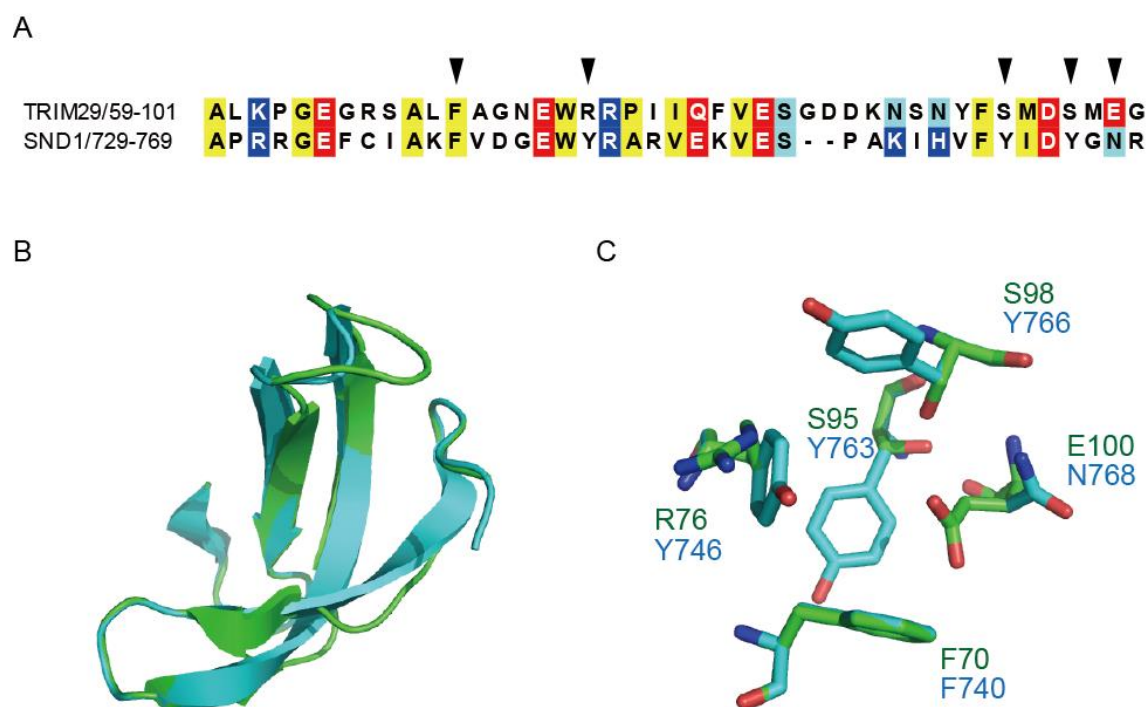


図 55. TRIM29 (アミノ酸残基 59 番から 101 番) の立体構造モデル

- (A) TRIM29 (アミノ酸残基 59 番から 101 番) の SND1 (アミノ酸残基 729 番から 769 番) のマルチプルアラインメント
- (B) TRIM29 (アミノ酸残基 59 番から 101 番) の立体構造モデル (緑) に SND1 の Tudor ドメイン (水色, PDB : 2O4X) を重ね合わせた.
- (C) TRIM29 (アミノ酸残基 59 番から 101 番) の aromatic cage の立体構造モデル (緑) に SND1 の aromatic cage (水色, PDB : 2O4X) を重ね合わせた.

第4節 考察

TRIM29 はヒストン結合タンパク質であり、クロマチンに結合することによってDDRの活性化を制御することを明らかにした (図56). TRIM29は, BASC, コヒーシン, DNA-PKcs および TIP60 複合体からなる DNA 修復複合体に含まれることを示した. これらのタンパク質は, DNA 複製や転写などの様々な現象に関わることが知られているが, DNA 修復の制御に関わるという点が共通している. これらの DNA 修復タンパク質の中で, TRIM29 は DNA ミスマッチ修復タンパク質の一つである MSH2 と直接結合する. さらに, TRIM29 のクロマチンへの結合は, DDR の活性化に必要であることを示した. MSH2 を含む DNA ミスマッチ修復タンパク質は, ATM を活性化するために DNA 損傷部位で molecular scaffold として機能し, MRE11 の DNA 損傷部位への蓄積に必要であることが報告されている^{22,64}. 本研究の結果と併せて考えると, TRIM29 はクロマチン上で DNA ミスマッチ修復タンパク質と molecular scaffold を形成し, DDR の活性化に関与していると推察される. TRIM29 はクロマチン結合能を有するが, TRIM29 はクロマチンから解離することによって ATM と結合することができる (図40). この結果から, TRIM29 のクロマチンへの結合は, ATM によって制御されている可能性が示唆される. DNA 損傷に応答して TRIM29 は ATM によってリン酸化されることが報告されている⁴⁰. したがって, TRIM29 のクロマチンへの結合は, ATM によるリン酸化の制御に依存しているかもしれない. TRIM29 のクロマチンへの結合の制御メカニズムを明らかにするためには, ATM による TRIM29 のリン酸化が果たす役割を解析する必要がある.

DSB修復タンパク質は, γ H2AX fociに蓄積することによってDNA修復を促している. TRIM29はDSB修復タンパク質と結合することを示したが, TRIM29 の γ H2AX fociへの蓄積を検出することができなかった (図28). DNA-PKcs, Ku70, SMC1, SMC3 および hnRNPUL1/2は, fociに蓄積するタンパク質量が少ないため, 顕微鏡を用いても検出できないことが報告されている⁶⁵⁻⁶⁷. 同様の理由で, TRIM29の γ H2AXへの一時的な蓄積を検出することができなかったのかもしれない. また, TRIM29はH2AX上でDNA修復タンパク質と複合体を形成するが, DNA損傷に応答して γ H2AXから解離した (図34). THRAP3, hnRNPUL proteins 1/2 および SAFB1は, DNA損傷に応答してDNA損傷部位に迅速にリクルートされた後, DNA損傷部位から迅速に排除される^{66,68,69}. DNA 損傷部位への一時的な蓄積は, DDRを正常に活性化するために重要な役割を果たしていると考えられている. 上記のタンパク質と同様に, TRIM29は γ H2AX から解離することによって, DDRの正常な活性化に寄与しているかもしれない.

ヒストンの翻訳後修飾は, DNA修復経路の選択において大きな役割を担って

いる²⁶. 本研究では, H2AXを含むヌクレオソーム上のH3K36me2/3, H4K16Ac およびH4K20me2のクロストークが, TRIM29およびDNA修復タンパク質を H2AXヌクレオソームに集積させるために必要であることを見出した. TIP60によるH4K16のアセチル化は, クロマチンへの53BP1の蓄積を阻害することによってBRCA1の蓄積を促進することが報告されている³³. TRIM29複合体にTIP60が含まれることは, BASC複合体のH2AXを含むヌクレオソームへの蓄積を促進しているのかもしれない. H2AXを含むヌクレオソーム上ではDNA損傷に応答して, H3K36me3レベルが上昇し, H4K16Ac および H4K20me2レベルが低下した (図34). ヒストンメチルトランスフェラーゼであるSETD2依存的なH3K36のトリメチル化は, DSB損傷部位へのRAD51の蓄積を誘導し, HR修復を促進することが報告されている^{27,29}. 今回の質量分析において, TRIM29の結合タンパク質としてSETD2を同定している. TRIM29複合体のクロマチンへの結合は, SETD2依存的なH3K36me3によって制御されているかもしれない.

TRIM29は, ヌクレオソーム上に存在するヒストンテールに結合することを示した. ヒストンペプチドアレイ解析によって, TRIM29はH3K36me3および翻訳後修飾されたH4テールに対して高い結合特異性を示すことがわかった. また, ホモロジーモデリングの結果から, TRIM29はTudor-likeドメインを持つことが予想された (図55). Tudorドメインは, 4本または5本の β ストランドからなるバレル構造であり, ヒストンのメチル化されたリジン残基に特異的に結合する⁷⁰. Tudorドメインには, 芳香族アミノ酸残基によって構成されるaromatic cageと呼ばれる認識ポケットが存在している⁴. 53BP1, PHF1, PHF19などのタンパク質がTudorドメインを有するタンパク質として知られ, 立体構造および生物学的な機能について詳細に解析されている^{32-34,71-74}. しかしながら, TRIM29は部分的なaromatic cageを持つことが予想された. Tudorドメインと同様に, PHDドメインもaromatic cageを介してヒストンのメチル化されたリジン残基を認識することが知られている. PHDドメインのaromatic cageは, 芳香族アミノ酸だけで構成されている場合と芳香族アミノ酸が部分的に存在している場合がある⁴. これらの報告を踏まえると, TRIM29は新規のTudorドメインまたはPHDドメインを持つ可能性がある. TRIM29のH3K36me3およびH4テールへの結合様式を明らかにするためには, TRIM29のN末端ドメインの立体構造解析が必要と考えられる.

TRIM29はヒストン結合能を持つので, TRIM29のクロマチンへの局在は, すべての細胞株において共通しているべきである. しかしながら, TRIM29はHeLa細胞ではクロマチン上に局在したが, U2OS細胞では細胞質に蓄積した. この違いは, TRIM29の細胞内局在を制御する特定の因子が存在することを示唆している. TRIM29が扁平上皮細胞に特異的に発現していることを踏まえると,

TRIM29の細胞内局在の制御因子も扁平上皮細胞に特異的に発現している可能性が高い。上皮細胞と間葉系細胞の違いとして、転写因子の発現パターンの違いが挙げられる。上皮細胞では、p53遺伝子ファミリーの一つであるp63が特異的に発現しているのに対して⁷⁵, 間葉系細胞ではSNAIL1/2, TWIST1/2, ZEB1/2などの転写因子が特異的に発現している⁷⁶。TRIM29の細胞内局在のメカニズムを明らかにするためには、TRIM29と上述の転写因子の関係を検討する必要があるかもしれない。

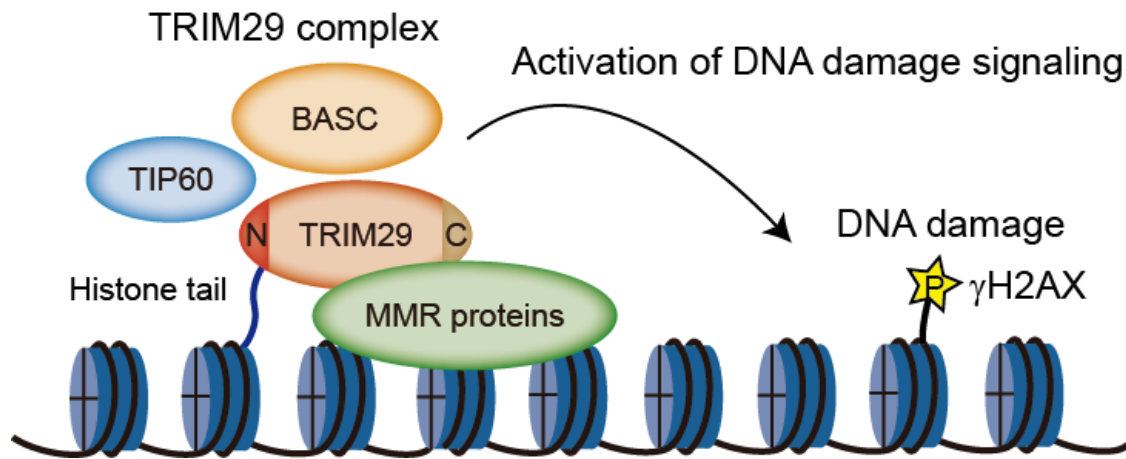


図 56. DNA 修復シグナル活性化における TRIM29 の役割

TRIM29は、翻訳後修飾されたヒストンテールに直接結合し、クロマチン上でDNAミスマッチ修復タンパク質とmolecular scaffoldを形成している。TRIM29はクロマチンに結合することによって、ATMやTIP60などのDNA修復タンパク質のクロマチンへの結合を仲介している。TRIM29のクロマチンおよびDNA修復タンパク質への結合は、DDRを正常に活性化するために必要である。また、TRIM29およびDNA修復タンパク質のクロマチンへの集積は、H3K36me2/3, H4K16AcおよびH4K20me2のクロストークによって制御されている。

第5節 要約

1. HeLa細胞において, TRIM29はクロマチン上に存在する.
2. TRIM29は, DNA修復タンパク質と複合体を形成し, DNA損傷応答の制御に関わる.
3. TRIM29複合体のクロマチンへの結合は, H3K36me2/3, H4K16AcおよびH4K20me3によって制御されている.
4. TRIM29は, H3K36me3および翻訳後修飾されたH4テールに結合し, その結合はTudor-likeドメインによって制御される可能性がある.
5. TRIM29のクロマチンへの結合は, DNA修復タンパク質のクロマチンへの集積を仲介し, DDRを活性化するために必要である.

TRIM29は, クロマチン上でMMRタンパク質とmolecular scaffoldを形成し, 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を明らかにした. TRIM29複合体のクロマチンへの結合は, H3K36およびH4 tailのPTMによって制御されていることが判明した. TRIM29はヒストンPTMの認識タンパク質として機能することが考えられる. 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.

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. 今後は, 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.

第2章 TRIM29によるp63標的遺伝子の発現制御

第1節 緒言

第1項 p63によるがん細胞転移の制御

がん細胞は上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を経て、転移能を獲得すると考えられている⁷⁶。EMTを経たがん細胞の特徴として、細胞の細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) への接着能や浸潤能の変化が挙げられる⁷⁶。細胞とECMの結合は、主にインテグリンと呼ばれる細胞接着分子によって仲介されている⁷⁶。インテグリンは、 α 鎖サブユニットおよび β 鎖サブユニットで構成されているヘテロ二量体であり、フィブロネクチンやコラーゲンなどの受容体として機能している⁷⁷。また、インテグリンは matrix metalloproteinase (MMP) と結合し、MMPのECM分解活性を制御している⁷⁸。MMPによるECMの分解は、がん細胞の微小環境の変化を引き起こし、がん細胞の浸潤を促進させる⁷⁸。EMTに関わる遺伝子の発現は、SNAIL1/2, TWIST1/2, ZEB1/2などの転写因子によって制御されている⁷⁶。EMTの過程において、これらの転写因子の発現レベルは上昇するが、その発現パターンは細胞や組織によって異なる⁷⁶。

p53遺伝子ファミリーの一つであるp63は、EMTを抑制する機能を持つ。p63は、上皮細胞分化のマスターレギュレーターとして同定された⁷⁹⁻⁸¹。p63はmiR-205の発現を促し、EMT関連遺伝子の一つであるZEB1の発現を抑制していることが明らかになっている^{84,85}。また、p63は細胞接着因子である $\beta 4$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 6$ -インテグリンおよびフィブロネクチンの発現を制御している⁸²。ゲノム解析によって、p63は細胞接着遺伝子のエンハンサー領域に結合していることが報告されている⁸³。p63遺伝子には、2つの異なるプロモーターがあり、transactivating p63 (TAp63) および N-terminal truncated p63 (Δ Np63) のアイソフォームが存在する⁸¹。また、選択的スプライシングによってC末端ドメインが異なるp63 α 、p63 β およびp63 γ が存在する。TAp63はがん細胞の転移を抑制する機能を持つが、 Δ Np63はTAp63に対してドミナントネガティブな作用を示すことが知られている^{75,81,86}。p63のアイソフォームの発現パターンは細胞や組織によって異なるため、p63の機能はまだ十分に解明されていない。

第2項 子宮頸がんの転移能

子宮頸がんは、女性特有のがんであり、乳がんに次いで世界で2番目に多く発生している⁸⁷。ヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus: HPV) は、侵襲性子宮頸がんの重要なリスクファクターである⁸⁸。HPV-18は、子宮頸部腺

がんと密接に関係している^{89,90}。HPV-16は、子宮頸部腺がんよりも子宮頸部扁平上皮がんにおいて高い頻度で検出される^{89,90}。HPV感染は、MMPの機能を活性化し、細胞浸潤能を上昇させることが明らかになっている⁹¹。子宮頸がん細胞では、上皮細胞成長因子がSNAIL1および $\alpha 5 \beta 1$ integrin 依存的に上皮間葉移行を促進させることが報告されている⁹²。また、 $\alpha 5 \beta 1$ integrin と fibronectin の結合は、MMP-9を活性化し、細胞遊走能を上昇させる⁹³。以上より、子宮頸がん細胞の機能は、様々な要因によって制御されている。

第3項 TRIM29によるがん細胞の機能制御

TRIM29は、p63と同様に、上皮細胞に特異的に発現している⁹⁴。TRIM29は膀胱がん、結腸直腸がん、胃がん、肺がんおよびすい臓がんなどの様々な癌の悪性度と密接に関係していることが報告されている³⁵。TRIM29は、がん細胞の転移に関わることが明らかになっている。乳がん細胞において、TRIM29はTWIST1の発現を抑制することによって浸潤能を抑制している⁹⁵。肺がん細胞において、TRIM29はMMP-9の機能を制御することによって細胞浸潤を促進することが報告されている⁹⁶。TRIM29は、EMTを促進することによってすい臓がん細胞の浸潤能を制御している⁹⁷。TRIM29は、様々ながん細胞の機能制御に関わっているが、どのようにしてTRIM29が子宮頸がん細胞の機能を制御しているについてはまだ十分に解明されていない。

第4項 概要

本研究では、TRIM29が子宮頸がん細胞の機能を制御するかどうかを検討した。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は接着能および浸潤能の制御することが明らかになったが、TRIM29による制御は細胞株依存的であった。TRIM29は、TAp63 α の転写調節因子であることが判明した。また、TRIM29ノックダウンによってインテグリンの発現パターンが変化し、ZEB1の発現レベルが上昇した。遺伝子発現制御におけるTRIM29の機能を予測するために、TRIM29の結合タンパク質の同定を質量分析計およびプルダウンアッセイ法を用いて行った。TRIM29は、TAp63 α 、RNA polymerase II および Mediator 複合体に結合することが判明した。以上の結果から、TRIM29はTAp63 α 、RNA polymerase II および Mediator 複合体に結合し、子宮頸がん細胞の機能を制御することが示唆された。

第2節 実験材料および方法

第1項 プラスミド

Johns Hopkins 大学 David Sidransky 教授より恵与された pCDNA3.1-TAp63 α -FLAG (Addgene plasmid # 27008) を用いた.

第2項 抗体

Mouse anti-p63 (H-137: sc8343), rabbit anti-Pol II (N-20: sc-899), mouse anti-p53 (DO-1: sc-126) および anti-actin(C-2: sc-8432) は Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA.) より購入した. Rabbit anti-Integrin β 4 (4707) は Cell Signaling Technology 社 (Beverly, MA) より購入した. Rabbit-Integrin β 1 (ab52971) は Abcam 社 (Cambridge, UK) より購入した. Rabbit anti-MED12 は Bethyl Laboratories 社 (Bethyl Laboratories) より購入した.

第3項 細胞浸潤アッセイ

CytoSelect 24-well cell invasion assay kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA) を用いて, *in vitro* 細胞浸潤アッセイを行った. HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入し, 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インサート上で無血清 DMEM 培地を用いて培養した. 細胞を 5% CO₂, 37°C の条件下で 24 時間培養した後, インサート内部の非浸潤細胞を除去し, 浸潤細胞をキット付属の Cell Stain Solution を用いて染色した. Extraction Solution を用いて染料を抽出し, 595 nm の吸光度を測定した.

第4項 細胞接着アッセイ

CytoSelect 48-well cell adhesion assay extracellular matrix array (Cell Biolabs) を用いて, fibronectin, fibrinogen, collagen I, collagen IV および laminin I に対する細胞接着アッセイを行った. HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入し, 種々の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上で無血清 DMEM 培地を用いて培養した. 細胞を 5% CO₂, 37°C の条件下で 1 時間培養した後, 非接着細胞を除去し, 接着細胞をキット付属の Cell Stain Solution を用いて染色した. Extraction Solution を用いて染料を抽出し, 595 nm の吸光度を測定した.

第5項 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて培養細胞から total RNA を抽出した。培養後の細胞を 1.5 ml エッペンチューブに回収し、1 ml の ISOGEN II に溶解した。これに 0.4 ml の滅菌水を加え、15 秒間攪拌した。溶解液を室温で 15 分間静置した後、13,000 rpm で 15 分間遠心した。750 μ l の上清を回収し、これに 750 μ l のイソプロパノールを加えた後、転倒混和した。混合溶液を 13,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を捨てた後のエッペンチューブに 0.5 ml の 80% EtOH を加え、13,000 rpm で 10 分間遠心した。この操作を 2 回行った。得られた沈殿物を 10 μ l の滅菌水に溶解した。

ReverTra-Plus kit (TOYOBO, Japan) により cDNA を調製した。反応チューブに 1 μ g total RNA および 5 μ l プライマーを加え、溶液の全量が 12 μ l になるように滅菌水を加えた。溶液を 65°C で 5 分間熱処理を行った後、氷冷した。熱処理後の溶液に 4 μ l 5 $\times$ RT buffer, 2 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l RNase inhibitor および 1 μ l ReverTra Ace を加えた。30°C で 10 分間、42°C で 60 分間、85°C で 5 分間の順に逆転写反応を行った。

Express SYBRGreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen) および ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて qRT-PCR を行った。反応チューブに Express SYBRGreenER qPCR Supermix Universal 10 μ l, cDNA 9.2 μ l, 10 μ M sense prime 0.4 μ l および 10 μ M antisense primer 10 μ l を加え、全反応液量を 20 μ l とした。95°C で 20 秒間の初期熱変性を行った後、熱変性を 95°C で 1 秒間および伸張反応を 65°C で 20 秒間とし、40 サイクルの増幅反応を行った。Internal control として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。解析に用いた各プライマーを表 4 に示す。

第 6 項 フォーカルアドヒージョンアッセイ

任意の細胞をフィブロネクチンカバースリップ (Corning) 上で 24 時間培養した。第 1 章の実験方法に従って、細胞を固定し、抗 ITGB1 抗体を用いて細胞を染色した。NIH ImageJ を用いて、ITGB1 で染色された領域と DAPI で染色された領域を定量した。ITGB1 で染色された領域を DAPI で染色された領域で除した値を focal adhesion area と定義した。20 個の細胞の focal adhesion area を測定した。

第 7 項

特に明記しない限り、100-mm plastic dish (Corning 430167; Corning Co., NY, USA) を用いて細胞を培養した。

第 8 項 他の実験手法

抗体, siRNA transfection, ウェスタンブロッティングなど特に明記しない実験材料および手法は第 1 章のそれに従う.

表 4. qRT-PCR に用いたプライマー

mRNA	Forward	Reverse
TRIM29	5'-GCAGCTGAGGGCAAGAG-3'	5'-ACTCGACAAACTGGATGATGG-3'
p63	5'-GCAGCTTTGCAAACCCATTA-3'	5'-GCTCGGAAGTCCTAGGTTTATT-3'
TAp63	5'-TGTATCCGCATGCAGGACT-3'	5'-CTGTGTTATAGGGACTGGTGGAC-3'
Δ p63	5'-GAAAACAATGCCCAGACTCAA-3'	5'-TGCGCGTGGTCTGTGTTA-3'
p63 α	5'-ATTGATGCTGTGCGATTACAC-3'	5'-TGTTGCTTATTGCGGCGAG-3'
p63 β	5'-AACGCCCTCACTCCTACAAC-3'	5'-GACTTGCCAGATCCTGACAATG-3'
p63 γ	5'-GCAGCACCAGCACTTACTTCA-3'	5'-TGTTTTTGAGTTTCTCTCCGG-3'
SNAIL2	5'-TTTCTGGGCTGGCCAAACATAAGC-3'	5'-ACACAAGGTAATGTGTGGGTCCGA-3'
ZEB1	5'-CAGGAAAGGAAGGGCAAGAA-3'	5'-TCTGCATCTGACTCGCATTC-3'
p53	5'-TTTCGACATAGTGTGGTGGTG-3'	5'-GCCCATGCAGGAACTGTTA-3'
ITGB1	5'-CCTGAAAGTCCCAAGTGTCAT-3'	5'-ACCAACACGCCCTTCATT-3'
ITGB4	5'-GAGCTGCATCGGCTCAA-3'	5'-AACACGTAGGAGTGGTTGG-3'
ITGA3	5'-AAACTGTGGAGGATGTAGGAAG-3'	5'-CACTCCAGACCTAGGACCA-3'
ITGA5	5'-GGGACCTCAGATCCTGAAATG-3'	5'-CTGCAGACTTTGGCTCTCTT-3'
ITGA6	5'-AGACTCTTAACTGTAGCGTGAAC-3'	5'-ATAAGAGACGCCTTGCTGTC-3'
FN1	5'-AGGAATATCTCGGTGCCATTT-3'	5'-CTTCGGGACTGGGTTCAC-3'
VIM	5'-ATCCAAGTTTGCTGACCTCTC-3'	5'-CTCAGTGGACTCCTGCTTTG-3'
SOX2	5'-TACAGCATGATGCAGGACCA-3'	5'-TACTGCAGGGCGCTCAC-3'
RB1	5'-GGATGGAGTATTGGGAGGTTAT-3'	5'-AGTGAACGACATCTCATCTAGG-3'
FOXM1	5'-AAGATGAGTTCTGATGGACTGG-3'	5'-AAGGCTCCTCAACCTTAACC-3'

表 4. 続き

mRNA	Forward	Reverse
E2F1	5'-GGAGAAGTCACGCTATGAGAC-3'	5'-GTCGACGACACCGTCAG-3'
E2F2	5'-GTCCCTGAGTTCCCAACC-3'	5'-GAAGTGTGCATACCGAGTCTTCT-3'
E2F3	5'-AGGCTGGAGCTAGGAGAAA-3'	5'-CGTAGTGCAGCTCTTCCTTT-3'
E2F4	5'-CCGGGAGATTGCTGACAAA-3'	5'-CCTTGTGCTGGTCTAGTTCTT-3'
E2F5	5'-ACCAATGTCTTAGAGGGAATTGA-3'	5'-TTTAGTATTACAGCCAGCACCT-3'
E2F6	5'-TCCAAGAACCATATTAGATGGATAGG-3'	5'-ATTAACTCATCCAAAGCATCTTCC-3'
HOXB5	5'-TCCGCAAATATTTCCCCTGGA-3'	5'-CGGGTCAGGTAGCGGTTGAA-3'
HOXB7	5'-GACTTGCGCGCGGAGAGTAA-3'	5'-CAGGGTCTGGTAGCGGGTGT-3'
HOXB9	5'-CCACTGGCTGCTGGACTGTT-3'	5'-TATGACTGGGCCAGGTTCTTTG-3'
BRCA1	5'-GCATGCTGAACTTCTCAACC-3'	5'-CGTACTTTCTTGTAGGCTCCTT-3'
GAPDH	5'-GTCAACGGATTTGGTCGTATTG-3'	5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'

第3節 実験結果

第1項 TRIM29による細胞接着および浸潤の制御

まず, TRIM29 が子宮頸がん細胞の細胞接着能を制御するかどうかを調べた. 細胞外マトリックスである fibronectin, fibrinogen, collagen I, collagen IV および laminin I によってコーティングされた細胞培養プレートを用いて, *in vitro* での細胞接着アッセイを行った. 本解析では, HeLa S3 細胞 (HPV-18 陽性), HeLa 細胞 (HPV-18 陽性) および SiHa 細胞 (HPV-16 陽性) を用いた. TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 細胞は, fibronectin, fibrinogen, collagen IV, collagen I に対する結合が, それぞれ 4.4 倍, 2.6 倍, 1.7 倍, 1.5 倍まで上昇した (図 57A). TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 細胞は, fibronectin, collagen IV, collagen I に対する結合が, それぞれ 2.2 倍, 2.7 倍, 3.8 倍まで上昇した (図 57B). 一方で, SiHa 細胞における TRIM29 ノックダウンは, 細胞接着能に大きな変化を与えなかった (図 57C). 細胞の細胞外マトリックスへの結合は細胞浸潤において重要な過程である⁷⁶. TRIM29 は, すい臓がん細胞, 乳がん細胞および肺がん細胞の浸潤能を制御することが報告されている⁹⁵⁻⁹⁷. そこで, TRIM29 が子宮頸がん細胞の浸潤能を制御するかどうかを解析した. 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 58). さらに, TRIM29 ノックダウンが細胞形態に与える影響を解析した. TRIM29 ノックダウンは, HeLa S3 細胞の形態を変化させたが, HeLa 細胞および SiHa 細胞には影響を与えなかった (図 59). 以上より, TRIM29 は子宮頸がん細胞の浸潤能および接着能を制御することが明らかになった. しかしながら, TRIM29 による浸潤能および接着能の制御は, 細胞株依存的であった.

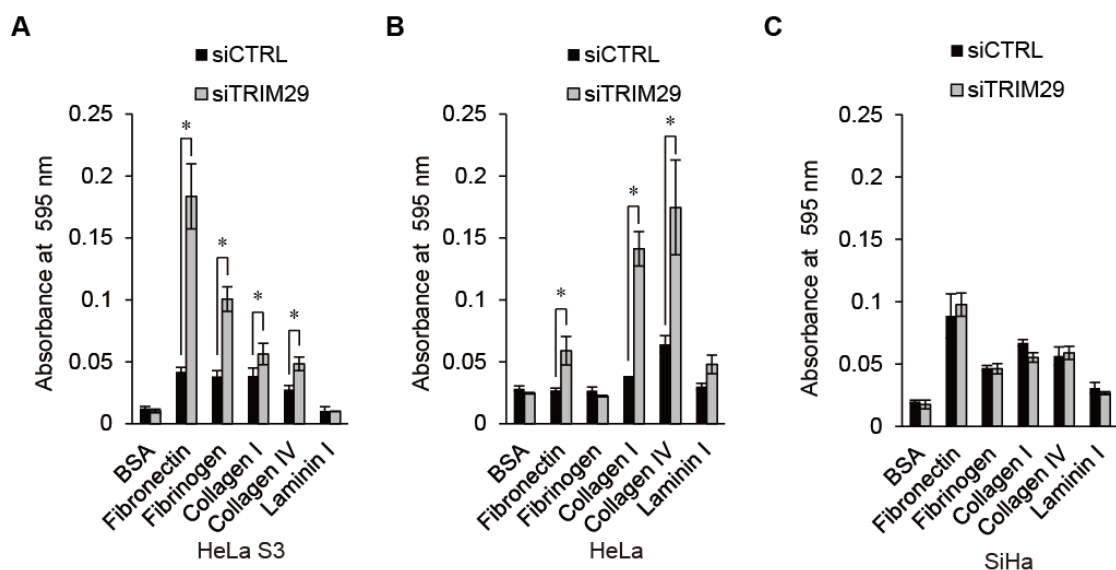


図 57. TRIM29 ノックダウンが細胞接着能に与える影響

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、各細胞を種々の細胞外マトリックス (fibronectin, fibrinogen, collagen I, collagen IVおよびlaminin I) でコーティングされた細胞培養プレート上で1時間培養した。培養プレートに接着した細胞を染色し、各細胞外マトリックスに対する細胞接着能を評価した。3回の独立した実験を行い、データは平均値±標準偏差として表した。F検定を用いて等分散であることを確かめ、Student's *t* 検定によって*p*値を求めた (*, $p < 0.05$)。

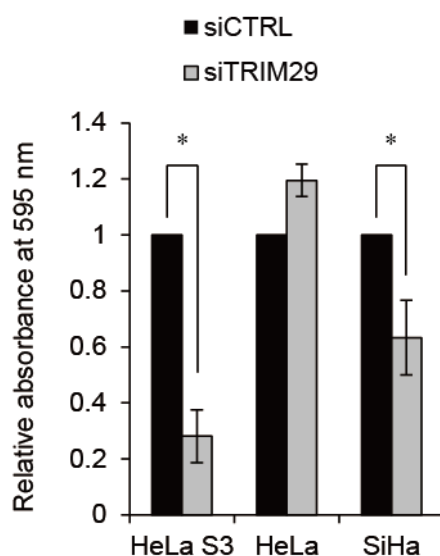


図 58. TRIM29 ノックダウンが細胞浸潤能に与える影響

HeLa S3細胞, HeLa細胞およびSiHa細胞にsiCTRLまたはsiTRIM29を導入した. 48時間培養後, 各細胞を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インサート上で培養した. 基底膜マトリックスに浸潤した細胞を染色し, それぞれの細胞の浸潤能を評価した. 3回の独立した実験を行い, データは平均値±標準偏差として表した. F検定を用いて不等分散であること確かめ, Welch's *t*検定によって*p*値を求めた (*, $p < 0.05$).

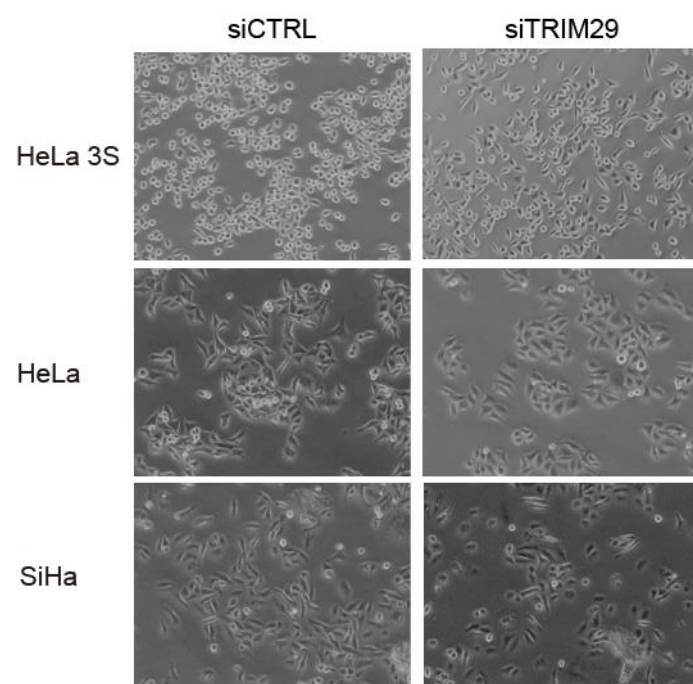


図 59. TRIM29 ノックダウンが細胞形態に与える影響

HeLa S3 細胞，HeLa 細胞および SiHa 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した．48 時間培養後，顕微鏡を用いて各細胞の細胞形態を観察した．

第2項 TRIM29による TAp63 アイソフォームの発現制御

がん細胞の接着能や浸潤能は、p63やEMT関連の転写因子によって複雑に制御されている^{75,76}。どのようにしてTRIM29が子宮頸がん細胞の機能を制御しているかを明らかにするために、TRIM29ノックダウンがp63やEMT関連の転写因子の発現レベルに与える影響を検討した。また、がんの進行を制御する転写因子であるE2FおよびHOXBの発現レベルについても検討した^{98,99}。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 60)。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 60)。

p63 遺伝子は、2つの異なるプロモーターから TAp63 および Δ Np63 を発現し、選択的スプライシングによって C 末端ドメインが異なる p63 α , p63 β および p63 γ を生じる。TRIM29 が、どの p63 アイソフォームの発現を制御しているの明らかにするために、TAp63, Δ Np63, p63 α , p63 β および p63 γ の mRNA に対して特異的に作用するプライマーを過去の文献に基づいて設計した。qRT-PCR によって各 mRNA レベルを解析した。N 末端アイソフォームの中では、 Δ Np63 の発現レベルよりも TAp63 の発現レベルが高かった (図 61)。C 末端アイソフォームの中では、p63 α の発現レベルが最も高かった (図 61)。TRIM29 ノックダウンによって、TAp63, p63 α および p63 γ の発現レベルが低下した (図 61)。以上の結果から、子宮頸がん細胞において、TRIM29 は TAp63 α の発現を制御していることが明らかになった。

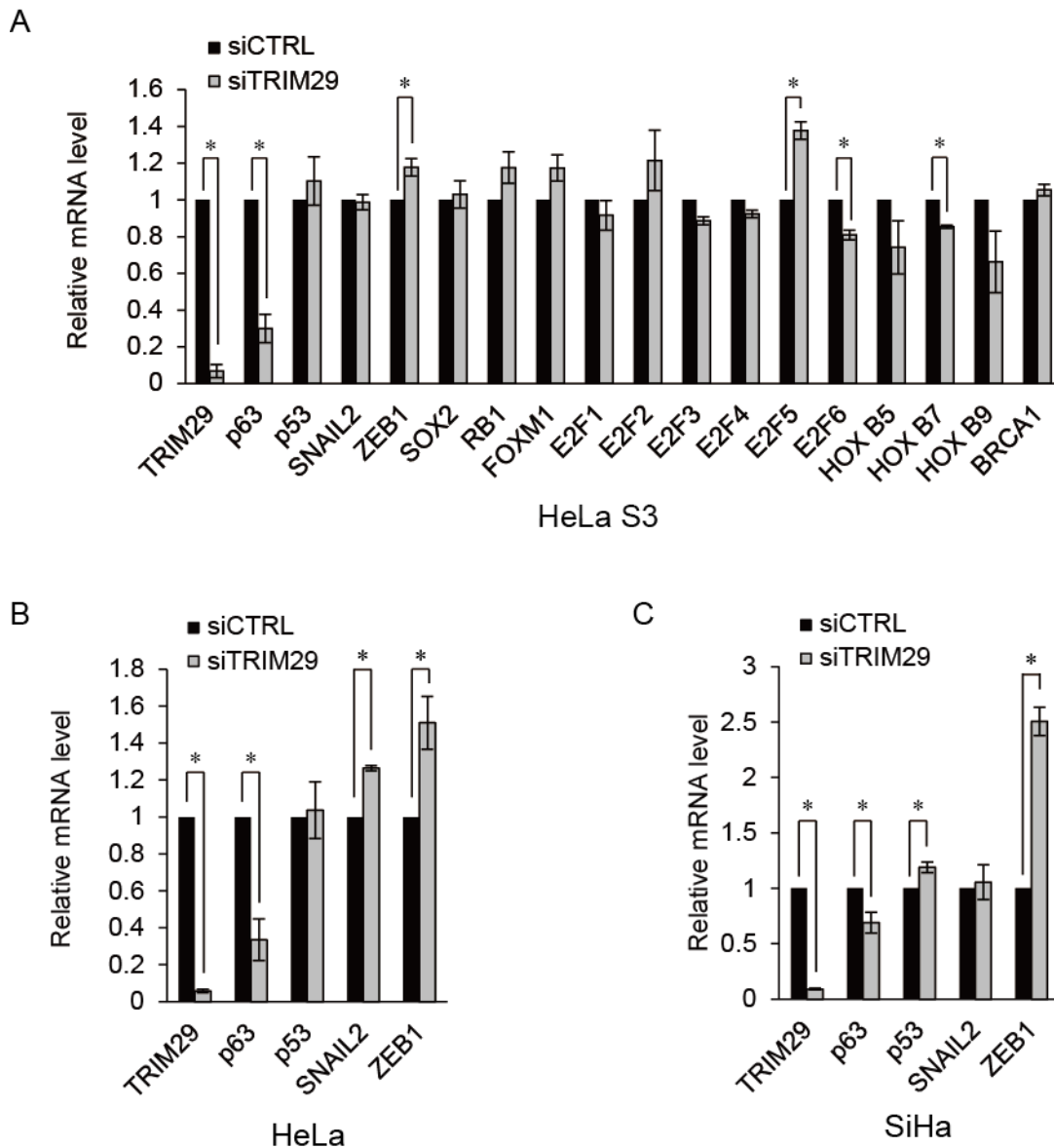


図 60. TRIM29 ノックダウンが p63 および EMT 関連転写因子の mRNA レベルに与える影響

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, データは平均値±標準偏差として表した. F検定を用いて等分散であること確かめ, Student's *t* 検定によって*p*値を求めた (*, $p < 0.05$).

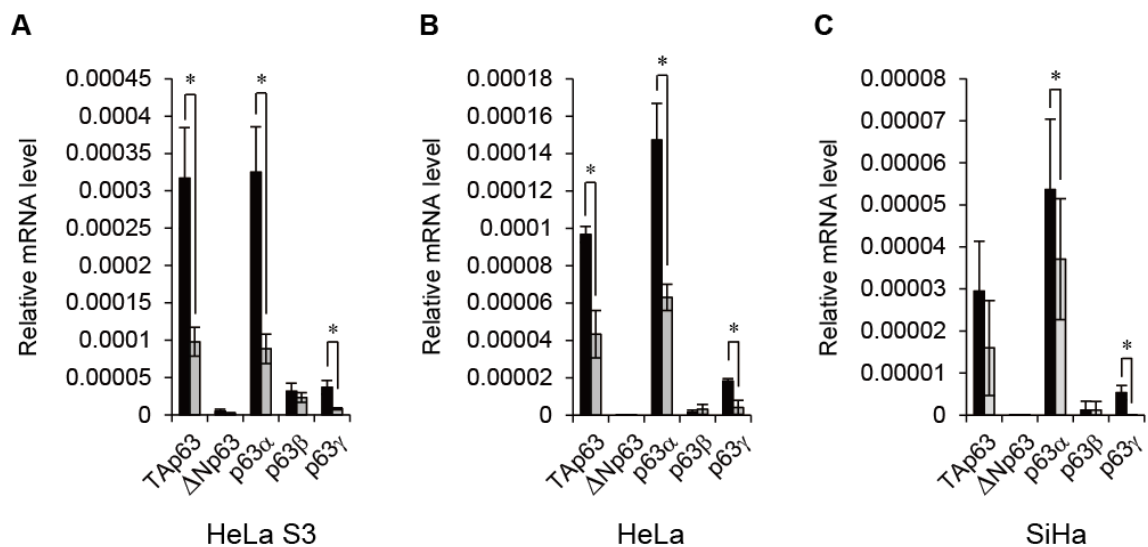


図 61. TRIM29 ノックダウンが p63 アイソフォーム mRNA の発現に与える影響

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 p63 アイソフォームの mRNA レベルを解析した. 3 回の独立した実験を行い, データは平均値±標準偏差として表した. F 検定を用いて等分散であること確かめ, Student's *t* 検定によって *p* 値を求めた (*, $p < 0.05$).

第3項 TRIM29による細胞接着因子の発現制御

p63 は、細胞接着因子である β 1-integrin (ITGB1), β 4-integrin (ITGB4), α 3-integrin (ITGA3), α 5-integrin (ITGA5), α 6-integrin (ITGA6), fibronectin (FN1) および vimentin (VIM) の発現を制御することが報告されている⁸². TRIM29 ノックダウンが、これらの細胞接着因子の mRNA の発現パターンに与える影響を qRT-PCR によって解析した. ITGB1 は、HeLa S3 細胞および HeLa 細胞よりも SiHa 細胞において高発現していた (図 62). VIM は、SiHa 細胞よりも HeLa S3 細胞および HeLa 細胞において高発現していた (図 62). TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 および HeLa 細胞では、ITGB1 の発現レベルが著しく上昇し、ITGB4, ITGA5 および FN1 の発現レベルが低下した (図 62). TRIM29 ノックダウンした SiHa 細胞では、ITGB4 および VIM の発現レベルが上昇し、FN1 の発現レベルの低下した (図 62). 以上の結果から、TRIM29 は細胞接着因子の発現制御に関わるが、TRIM29 による発現制御は細胞株に依存することが示唆された.

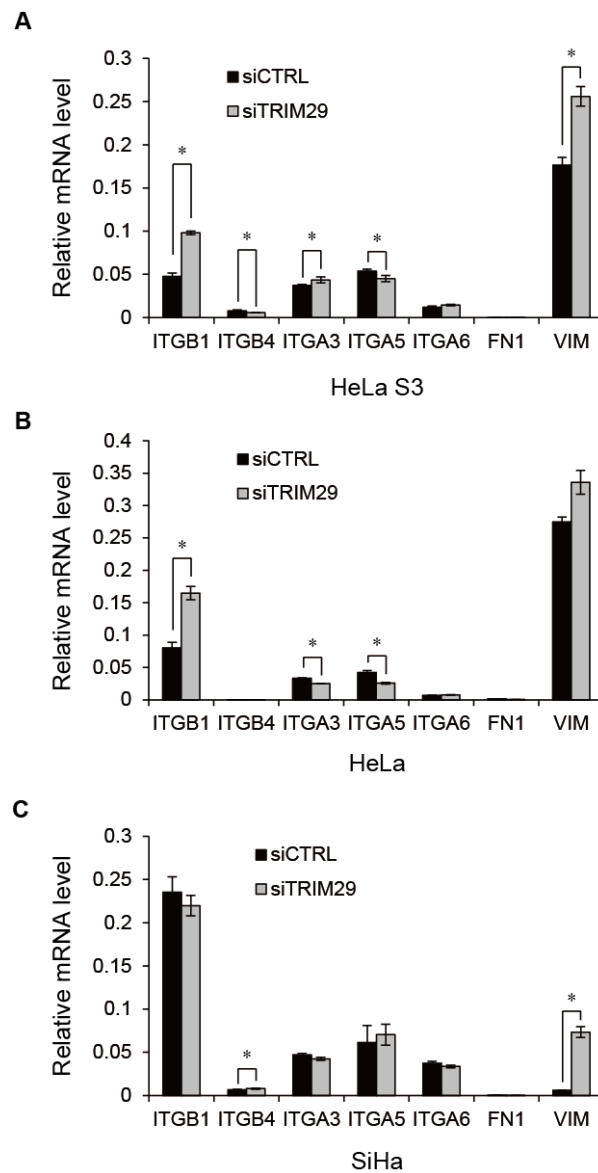


図 62. TRIM29 ノックダウンが細胞接着因子の mRNA レベルに与える影響

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, データは平均値±標準偏差として表した. F 検定を用いて等分散であること確かめ, Student's *t* 検定によって *p* 値を求めた (*, $p < 0.05$).

第4項 TRIM29によるp63, ZEB1, ITGB1およびITGB4の発現制御

TRIM29 ノックダウンが、p63 のタンパク質レベルに与える影響をウェスタンブロット法によって解析した。qRT-PCR による遺伝子発現解析の結果と一致して、子宮頸がん細胞では TAp63 α のタンパク質レベルが高発現していた (図 63)。しかしながら、TRIM29 ノックダウンによって p63 の mRNA レベルが低下したのに対して (図 61), p63 のタンパク質レベルは減少しなかった (図 63)。

TRIM29 ノックダウンが、p63 の標的遺伝子である ZEB1, ITGB1 および ITGB4 のタンパク質レベルに与える影響を解析した。ZEB1 は、TRIM29 をノックダウンした全ての細胞株において上昇した (図 63)。この結果は、TRIM29 が子宮頸がん細胞において ZEB1 の発現抑制に必要なタンパク質であることを示している。ITGB1 は、TRIM29 をノックダウンした HeLa S3 および HeLa 細胞において上昇したが、SiHa 細胞では変化しなかった (図 63)。ITGB4 は、TRIM29 ノックダウンによって HeLa 細胞では減少し、SiHa 細胞では上昇した (図 63)。TRIM29 による細胞接着因子の発現制御は、細胞株に依存することが示唆された。

ITGB1は、細胞とECMの接着を仲介し、フォーカルアドヒージョンの形成に必要な不可欠な分子である¹⁰⁰。TRIM29ノックダウンが、細胞のフォーカルアドヒージョン形成に与える影響を解析した。TRIM29をノックダウンしたHeLa S3細胞, HeLa細胞およびSiHa細胞をフィブロネクチンでコーティングされたカバースリップ上で24時間培養した。抗ITGB1抗体およびDAPIを用いて、ITGB1およびDNAをそれぞれ染色した (図64)。DAPIで染色された領域に対してITGB1で染色された領域を細胞当たりのフォーカルアドヒージョン形成範囲と定義した。TRIM29ノックダウンによって、HeLa S3細胞およびHeLa細胞のフォーカルアドヒージョン形成範囲は拡大したが、SiHa細胞では変化しなかった (図65)。これらの結果は、TRIM29ノックダウンがECMへの接着能に与える影響と一致していた。

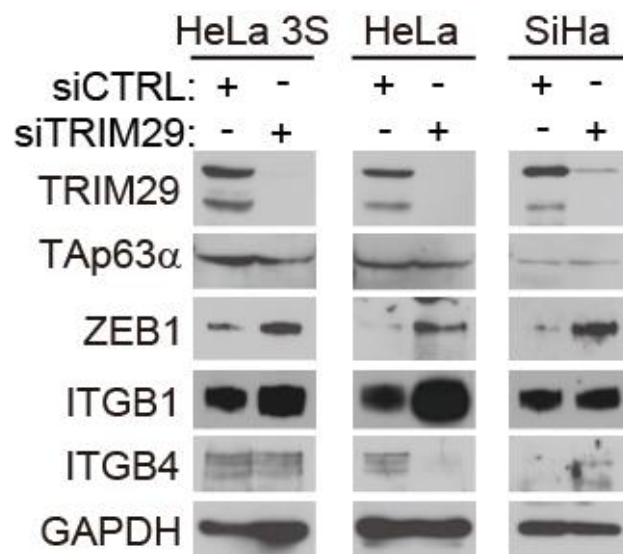


図 63. TRIM29 ノックダウンが p63, ZEB1, ITGB1 および ITGB4 のタンパク質レベルに与える影響

HeLa S3細胞, HeLa細胞およびSiHa細胞にsiCTRLまたはsiTRIM29を導入した. 48時間培養後, 各細胞を回収した. 各細胞溶解液をSDS-PAGEに展開し, ウェスタンブロッティングによって各タンパク質を解析した. ローディングコントロールとして, GAPDHを用いた.

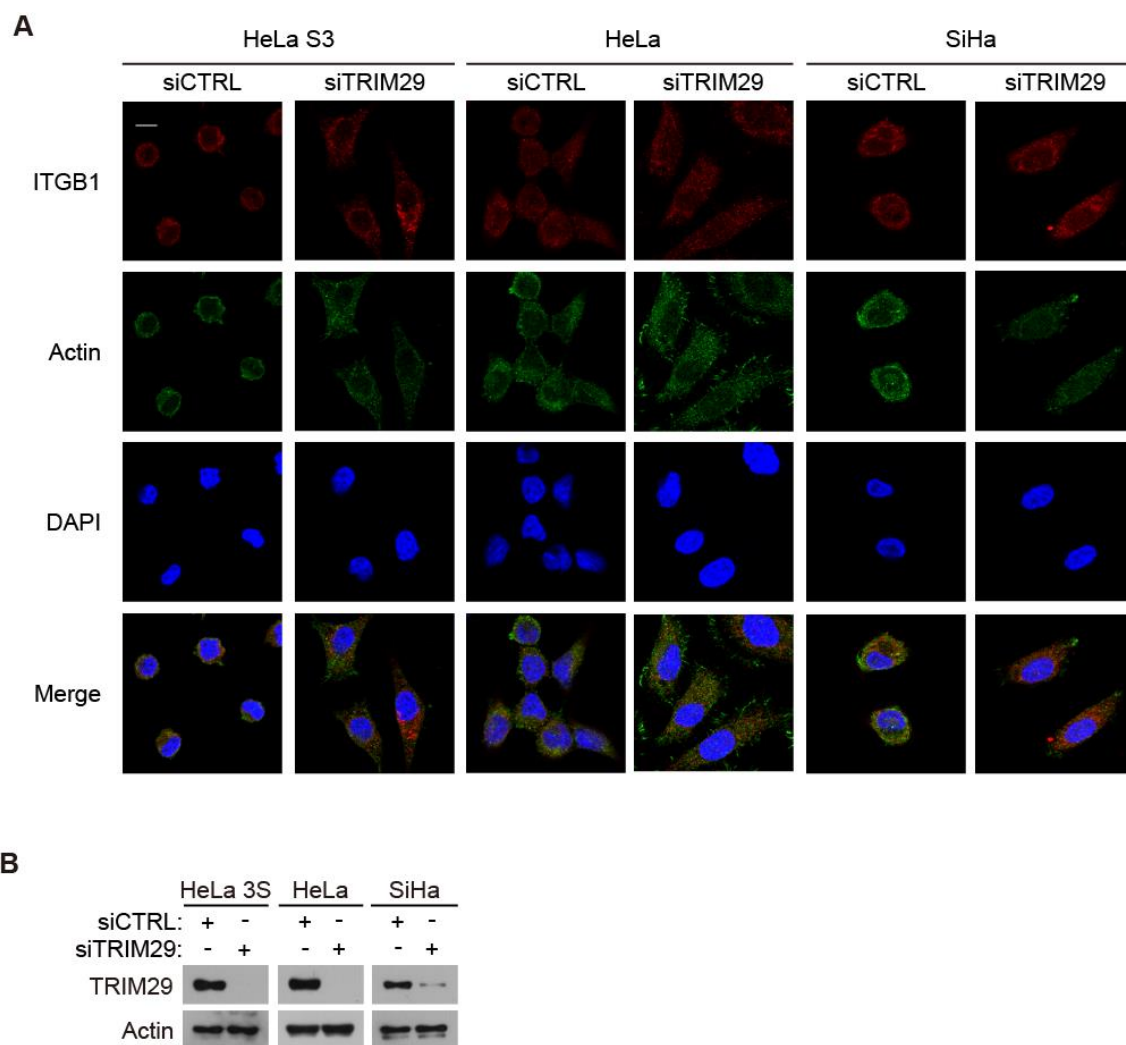


図 64. TRIM29 ノックダウンがフォーカルアドヒージョン形成に与える影響

(A) HeLa S3 細胞, HeLa 細胞および SiHa 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した. 48 時間培養後, 各細胞を fibronectin でコーティングされたカバーガラス上に播種した. 24 時間培養後, 抗 ITGB1 抗体および抗 Actin 抗体を用いて, ITGB1 および Actin を検出した (scale bar: 40 μ m). 0.4 μ g/ml DAPI を用いて DNA を染色した.

(B) TRIM29 ノックダウン細胞の溶解液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって TRIM29 のタンパク質レベルを解析した. ローディングコントロールとして, Actin を用いた.

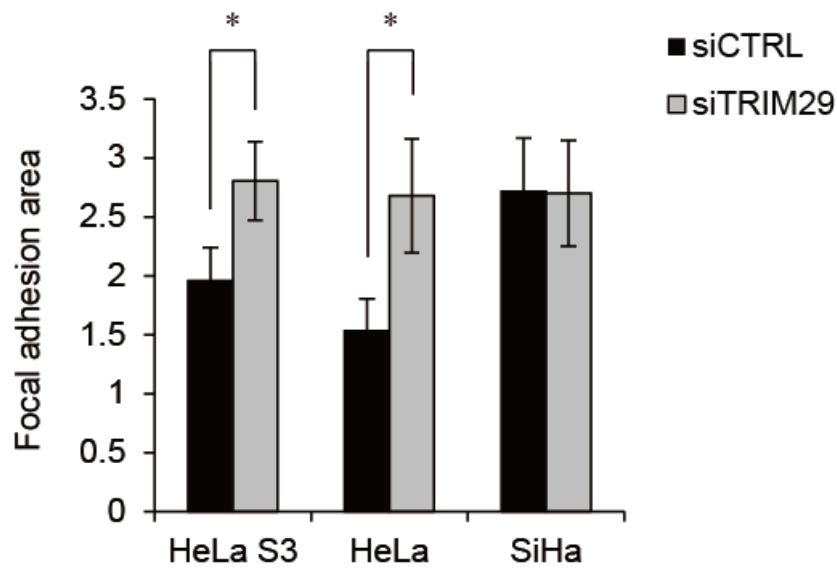


図 65. TRIM29 ノックダウンがフォーカルアドヒージョン形成に与える影響

ITGB1 で染色された領域と DAPI で染色された領域を NIH ImageJ を用いて定量した. ITGB1 で染色された領域を DAPI で染色された領域で除した値を focal adhesion area と定義した. 3 回の独立した実験を行い, データは平均値 $\pm$ 標準偏差として表した. F 検定を用いて等分散であること確かめ, Welch's t 検定によって p 値を求めた (*, $p < 0.05$).

第 5 項 TRIM29 による転写制御

遺伝子発現制御におけるTRIM29の役割を明らかにするために、TRIM29の結合タンパク質の解析を行った。質量分析を用いたTRIM29の結合タンパク質の解析によって、TRIM29はRNAポリメラーゼII (Pol II) や転写メディエーターと結合することが明らかになった (表3および図66)。TRIM29がPol IIおよびMED12と結合するかどうかを確認するために、FLAG-TRIM29安定発現HeLa S3細胞の核抽出液を用いてプルダウンアッセイを行った。TRIM29は、Pol IIおよびMED12と結合することが明らかになった (図67)。

第 4 項にて、TRIM29 ノックダウンによって TAp63 α のタンパク質レベルが減少しないにも関わらず、ZEB1 のタンパク質レベルが上昇することを示した。TAp63 が ZEB1 の発現を抑制することを踏まえると、TRIM29 は TAp63 α の機能制御を通じて ZEB1 の発現を抑制している可能性が示唆された。この可能性を確認するために、TRIM29 が TAp63 α と結合するかを調べた。HeLa S3 細胞において、TRIM29 は TAp63 α と結合することが判明した (図67)。

子宮頸がん細胞において、p63 が転写因子として機能するためには、核内に存在していることが必要不可欠である。そこで、TRIM29 ノックダウンが p63 の細胞内局在に与える影響を免疫染色法によって解析した。しかしながら、TRIM29 ノックダウンによる p63 の細胞内局在の変化は観察されなかった (図68)。以上より、TRIM29 は、TAp63 α 、Pol II および MED12 に結合することによって、インテグリンおよび ZEB1 の発現を制御していることがわかった。

	TRIM29 (wild-type)	TRIM29 (394-588)	TRIM29 (470-588)	TRIM29 (1-359)
TRIM29	2053.9	1516.9	5690.3	5857.0
POLR2A	0.2			
POLR2B	0.8	1.2		
MED12	0.7	0.6		
MED14	1.2			
MED16	0.3			

NSAF×10⁴

10.1<
8.1-10.0
6.1-8.0
4.1-6.0
2.1-4.0
0-2.0

図 66. 質量分析による FLAG-TRIM29 結合タンパク質の解析

FLAG-TRIM29 の変異型 (394-588, 470-588 および 1-359) の安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製し, FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液に含まれるタンパク質を多次元タンパク質同定技術によって解析した. NSAF は, 同定されたタンパク質の相対存在量を示す.

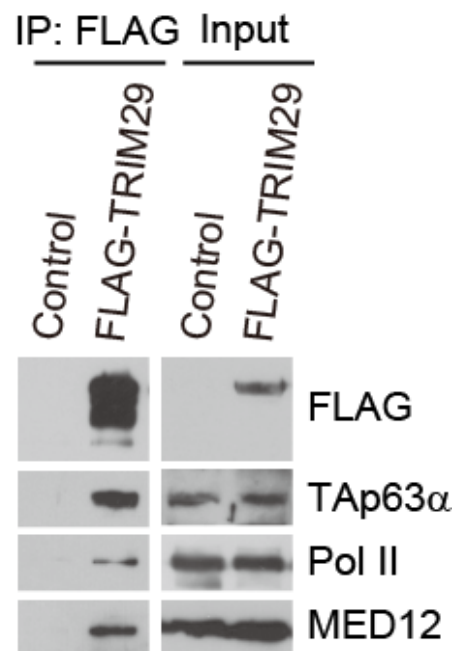


図 67. TRIM29 と TAp63α, RNA ポリメラーゼ II および MED12 の結合

FLAG-TRIM29 の安定発現 HeLa S3 細胞から核抽出液を調製し, FLAG-TRIM29 および TRIM29 結合タンパク質を免疫沈降により精製した. 得られた免疫沈降溶液を SDS-PAGE に展開し, ウェスタンブロッティングによって解析した.

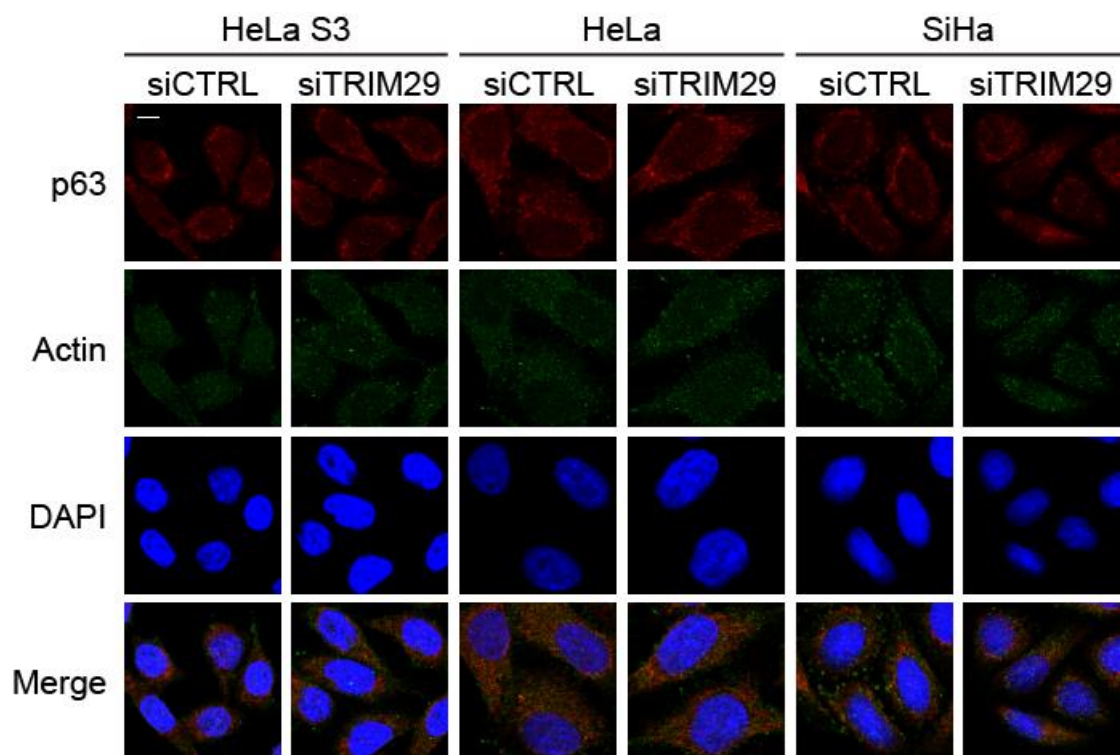


図 68. TRIM29 ノックダウンが p63 の細胞内局在に与える影響

HeLa S3 細胞, HeLa 細胞および SiHa 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した. 48 時間培養後, 各細胞をカバーガラス上に播種した. 24 時間培養後, 抗 p63 抗体および抗 Actin 抗体を用いて, p63 および Actin を検出した (scale bar: 40 μ m). 0.4 μ g/ml DAPI を用いて DNA を染色した.

第 6 項 TRIM29 過剰発現が細胞浸潤能および接着能に与える影響

TRIM29 が p63 の転写活性化因子として機能するかを明らかにするために、HeLa S3 細胞における TRIM29 過剰発現が p63 の mRNA レベルを上昇させるかどうかを qRT-PCR によって調べた。TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞において、TRIM29 の mRNA レベルが上昇していることを確認した (図 69A)。FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞では、TAp63, p63 α , p63 β および p63 γ の発現レベルが上昇したが、 Δ Np63 の発現レベルは上昇しなかった (図 69B)。次に、FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞におけるインテグリンの発現パターンを解析した。TRIM29 の過剰発現は、ITGB4, ITGA3 および ITGA6 の発現レベルを上昇させた (図 69C)。TRIM29 過剰発現が ITGB1 の発現レベルに与える影響は、TRIM29 ノックダウンによる影響よりも大きかった (図 62 および図 69C)。FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞における TAp63 α , ITGB1 および ITGB4 のタンパク質レベルを解析した。TRIM29 過剰発現によって、TAp63 α および ITGB1 のタンパク質レベルは変化しなかったが、ITGB4 のタンパク質レベルは上昇した (図 69D)。

TRIM29 過剰発現が、HeLa S3 細胞の細胞浸潤能および接着能に与える影響を検討した。TRIM29 過剰発現は、HeLa S3 細胞の浸潤能を 1.9 倍まで上昇させた (図 70)。ECM への接着能は、TRIM29 過剰発現によって変化しなかった (図 71)。FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞の形態を解析した。TRIM29 過剰発現によって、HeLa S3 細胞は敷石状の形態を示した (図 72)。

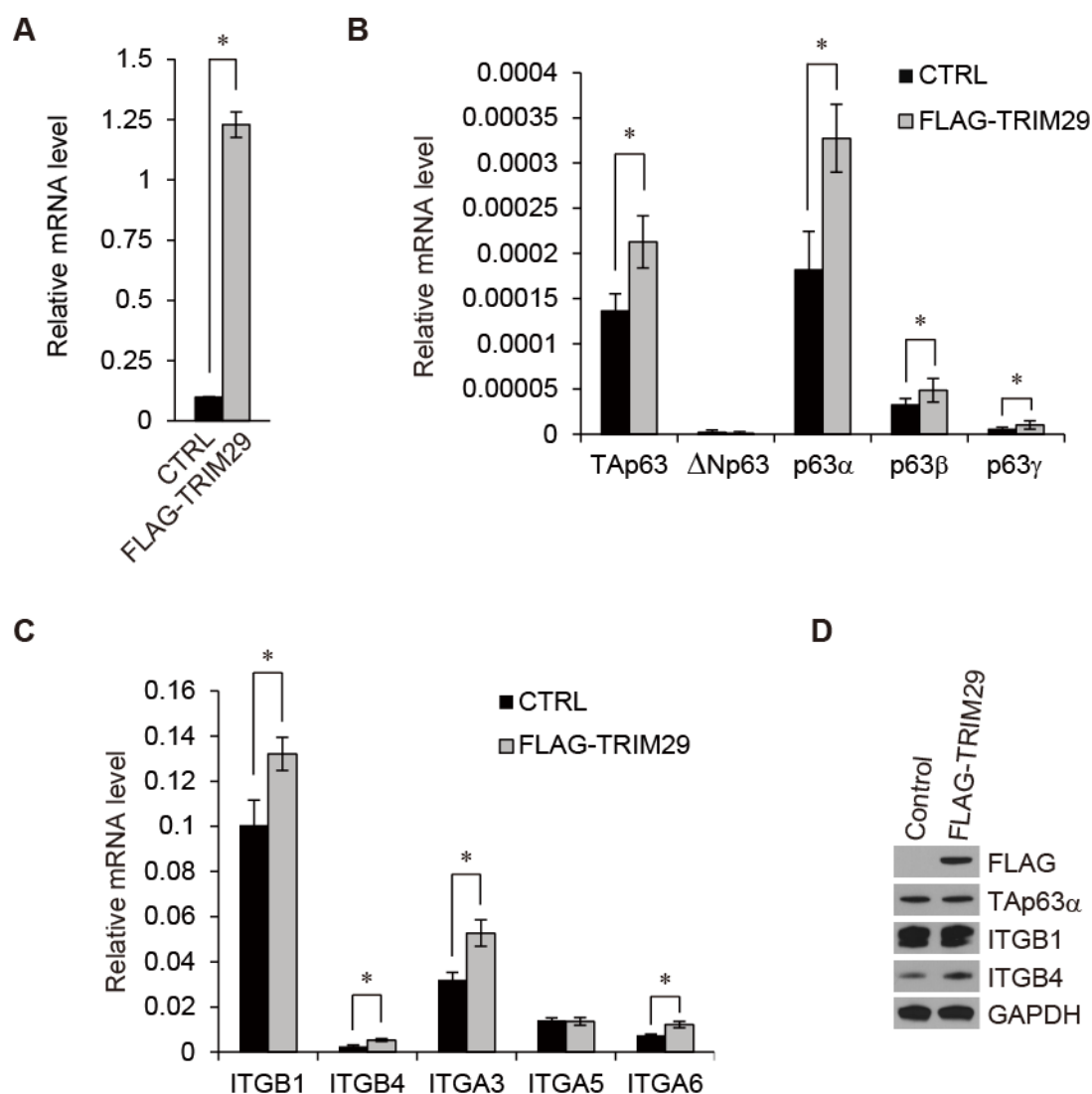


図 69. TRIM29 過剰発現が p63 およびインテグリンの発現レベルに与える影響

(A-C)FLAG-TRIM29の安定発現HeLa S3細胞からRNAを抽出し、qRT-PCRによりTRIM29 (A), p63 isoforms (B), integrins (C) のmRNAレベルを解析した. 3回の独立した実験を行い、データは平均値±標準偏差として表した. F検定を用いて等分散であること確かめ、Student's *t* 検定によって*p*値を求めた (*, $p < 0.05$).

(D)FLAG-TRIM29の安定発現HeLa S3細胞の溶解液をSDS-PAGEに展開し、ウェスタンブロッティングによって各タンパク質を解析した. ローディングコントロールとして、GAPDHを用いた.

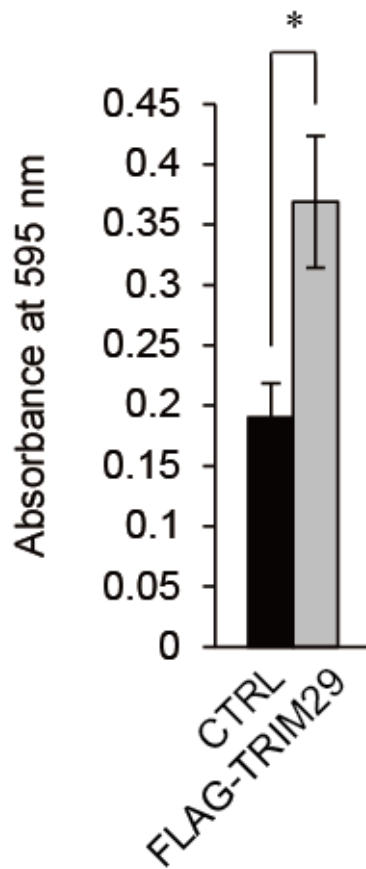


図 70. TRIM29 過剰発現が ECM への浸潤能に与える影響

FLAG-TRIM29安定発現HeLa S3細胞を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インサート上で培養した．基底膜マトリックスに浸潤した細胞を染色し，それぞれの細胞の浸潤能を評価した．3回の独立した実験を行い，データは平均値±標準偏差として表した．F検定を用いて不等分散であることを確かめ，Welch's *t*検定によって*p*値を求めた (*, $p<0.05$).

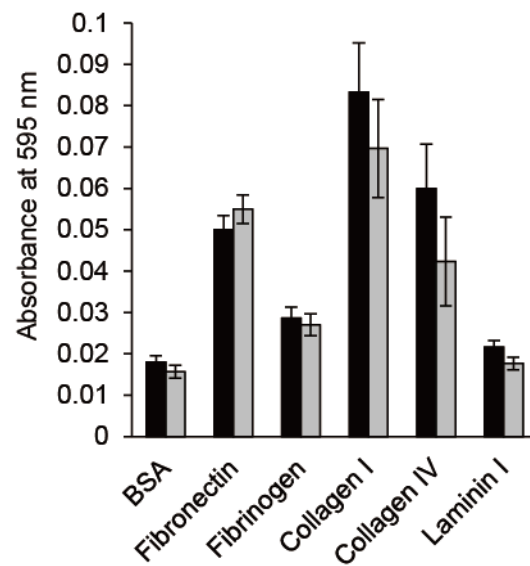


図 71. TRIM29 過剰発現が ECM への細胞接着能に与える影響

FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞を種々の細胞外マトリックス (fibronectin, fibrinogen, collagen I, collagen IV および laminin I) でコーティングされた細胞培養プレート上で培養した。培養プレートに接着した細胞を染色し、各細胞外マトリックスに対する細胞接着能を評価した。3回の独立した実験を行い、データは平均値±標準偏差として表した。

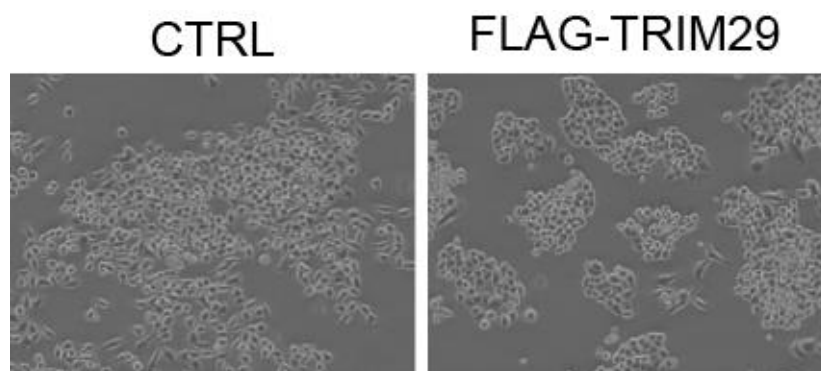


図 72. TRIM29 過剰発現が細胞形態に与える影響

顕微鏡を用いて, FLAG-TRIM29 安定発現 HeLa S3 細胞の細胞形態を観察した.

第 7 項 TRIM29 と p63 の機能的な関係

TRIM29 と TAp63 α の機能的な関係を明らかにするために、FLAG-TAp63 α の安定発現 HeLa S3 細胞を作製した。FLAG-TAp63 α が、内在性 TAp63 α よりも高発現していることを確認した (図 73A および B)。RNA 干渉法によって HeLa S3 細胞および FLAG-TAp63 α 安定発現 HeLa S3 細胞に発現している TRIM29 をノックダウンし、ZEB1 および ITGB1 の発現レベルを解析した。TRIM29 ノックダウンは、ZEB1 および ITGB1 の発現レベルを上昇させた (図 73A および B)。しかしながら、FLAG-TAp63 α 過剰発現は、TRIM29 ノックダウンによる ZEB1 および ITGB1 の発現レベルの上昇を抑制しなかった (図 73A および B)。以上の結果から、TRIM29 による ZEB1 および ITGB1 の発現制御は、TAp63 α 非依存的であることが明らかになった。

TRIM29 ノックダウンによる細胞接着能の上昇が TAp63 α の過剰発現によって抑制されるかどうかを検討した。細胞外マトリックスによってコーティングされた細胞培養プレートを用いて、*in vitro* での細胞接着アッセイを行った。TRIM29 ノックダウンによって細胞接着能は上昇したが、TAp63 α -FLAG 過剰発現によって細胞接着能の上昇は抑制されなかった (図 74)。以上の結果から、TRIM29 は TAp63 α による細胞接着能の上昇を抑制するために必要であることが示唆された。

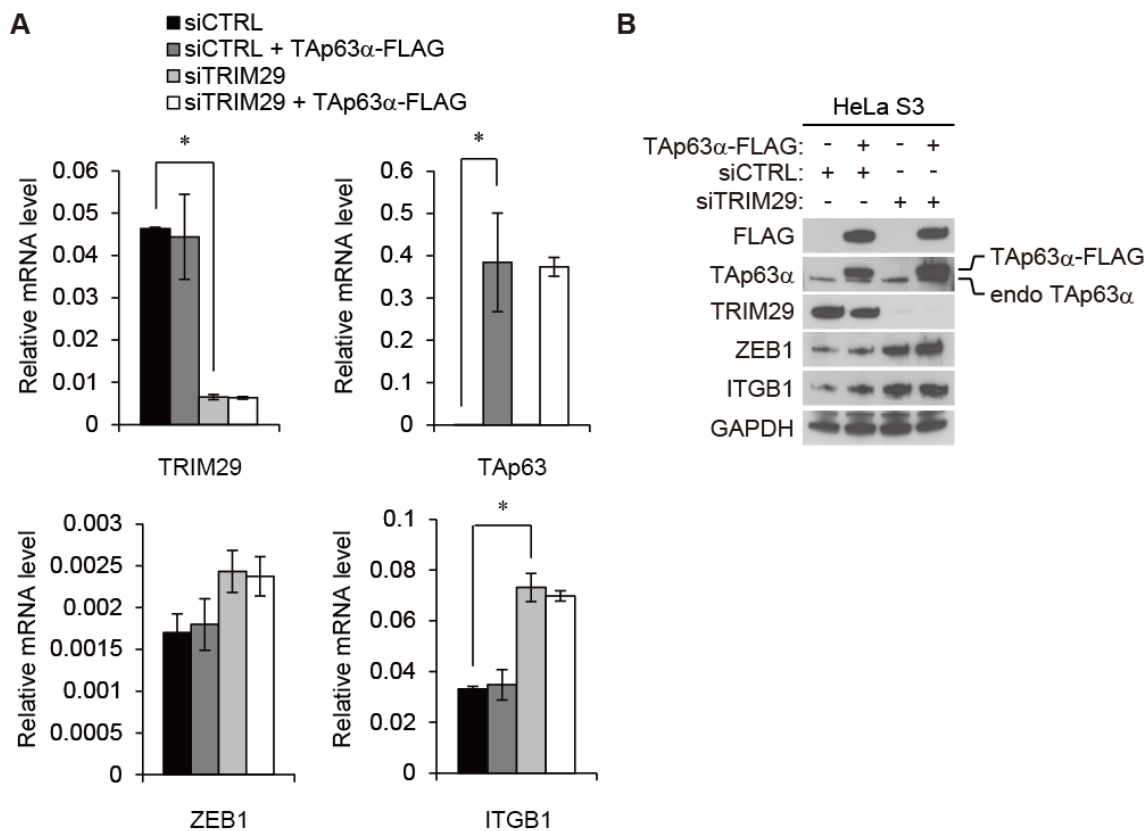


図 73. TAp63 α 過剰発現が ZEB1 および ITGB1 の発現に与える影響

- (A) HeLa S3細胞に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、データは平均値±標準偏差として表した。F検定を用いて等分散であること確かめ、Student's *t*検定によって*p*値を求めた (*, $p < 0.05$)。
- (B) FLAG-TAp63 α 安定発現 HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した。48 時間培養後、細胞を回収した。各細胞の溶解液を SDS-PAGE に展開し、ウェスタンブロッティングによって各タンパク質を解析した。ローディングコントロールとして、GAPDH を用いた。

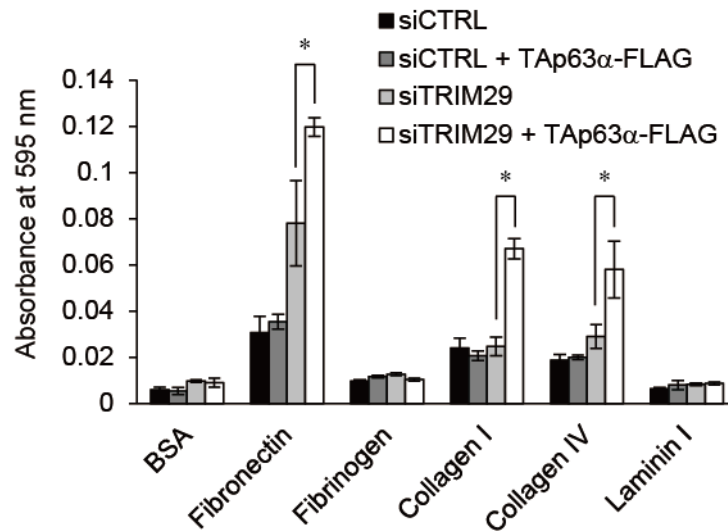


図 74. TAp63α過剰発現が ECM への接着能に与える影響

FLAG-TAp63α安定発現 HeLa S3 細胞に siCTRL または siTRIM29 を導入した. 48 時間培養後, 各細胞を種々の細胞外マトリックス (fibronectin, fibrinogen, collagen I, collagen IV および laminin I) でコーティングされた細胞培養プレート上で培養した. 培養プレートに接着した細胞を染色し, 各細胞外マトリックスに対する細胞接着能を評価した. 3 回の独立した実験を行い, データは平均値±標準偏差として表した. F 検定を用いて等分散であること確かめ, Student's *t* 検定によって *p* 値を求めた (*, $p < 0.05$).

第4節 考察

子宮頸がん細胞において、TRIM29はPol IIおよびMED12に結合し、細胞接着遺伝子およびEMT遺伝子の発現を制御していることが明らかになった(図75)。第1章にて、TRIM29がクロマチン上全体に存在し、TRIM29はクロマチンに直接結合することを示した。転写メディエーターは、Pol IIの転写活性を制御する複合体である^{103,104}。したがって、TRIM29はPol IIおよび転写メディエーターをインテグリンのプロモーター領域にリクルートすることによって、細胞接着遺伝子およびEMT遺伝子の発現制御に関わっているのではないかと考えられる。細胞接着遺伝子およびEMT遺伝子の転写制御におけるTRIM29の役割を明らかにするためには、今後TRIM29がどのようにしてPol IIおよび転写メディエーターのリクルートを制御しているかを明らかにしなければならない。

TRIM29が、TAp63 α 非依存的にZEB1の発現抑制に関わることを示した。MED12は、転写メディエーターのサブユニットの一つであり、EMT関連遺伝子の発現制御に関わっている¹⁰⁵。これらの報告を踏まえると、TRIM29はMED12との結合を介して、ZEB1の発現を抑制していると考えられる。TRIM29によるZEB1の発現抑制メカニズムを解明するためには、TRIM29がどのようにしてMED12の機能を制御しているかを明らかにする必要がある。

TRIM29をノックダウンまたは過剰発現した子宮頸がん細胞では、ITGB1とITGB4の発現パターンおよびECMへの接着能が変化した。TRIM29は、TAp63 α による細胞接着能の上昇を抑制するために必要であった。p63はインテグリンなどの細胞接着因子の発現を調整することによって、細胞のECMへの接着を制御している⁷⁵。ITGB1は、上皮細胞の細胞外マトリックスへの結合において重要な役割果たしている¹⁰⁶。ITGB4の発現レベルの上昇は、細胞接着能の低下および細胞接着能の上昇と密接な関係がある¹⁰⁷。しかしながら、TRIM29ノックダウンはHPV-18陽性細胞(HeLa S3およびHeLa細胞)およびHPV-16陽性細胞(SiHa細胞)のインテグリンの発現パターンに対して異なる影響を与えた。子宮頸がん細胞において、HPVゲノムが宿主細胞のゲノムに組み込まれることによって染色体の組換えを引き起こし、いくつかの遺伝子が欠損することが報告されている^{83,109}。HPV-18およびHPV-16ゲノムは、それぞれ8番染色体と13番染色体に組み込まれることが明らかになっている^{83,109}。以上の知見から、HPVゲノムの組み込まれる位置の違いが、インテグリンの発現パターンに影響を与えているかもしれない。

TRIM29が、子宮頸がん細胞の浸潤能を制御することを示した。TRIM29は乳がん細胞の浸潤能を阻害する一方で、すい臓および肺がん細胞の浸潤能を上

昇させることがわかっている⁹⁵⁻⁹⁷。また、HPV感染はいくつかのMMPの発現レベルを上昇させることが報告されている⁹¹。したがって、子宮頸がん細胞の基底膜への浸潤は、TRIM29とHPV感染の相互作用に制御されているかもしれない。どのようにしてTRIM29が子宮頸がん細胞の浸潤能を制御しているかを明らかにするためには、今後 *in vivo* での機能解析が必要である。

TRIM29 ノックダウンは TAp63 α の mRNA レベルを低下させたが、TAp63 α のタンパク質レベルは低下しなかった。TAp63 α は、E3 ユビキチンリガーゼ Itch 依存的に分解される一方で、E3 ユビキチンリガーゼ β TrCP1 依存的に安定化される^{101,102}。したがって、子宮頸がん細胞において TAp63 α のタンパク質レベルは、ユビキチン化依存的なメカニズムによって常に一定に維持されているかもしれない。

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。EMT やがん細胞の機能制御における TRIM29 の役割を解明することは、がんの治療において新たな可能性を示すことが予想される。

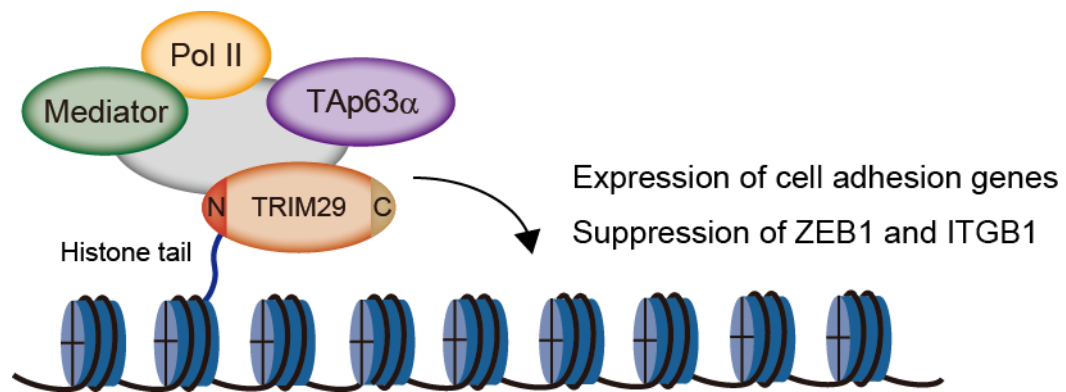


図 75. TRIM29 による細胞接着遺伝子および EMT 関連遺伝子の発現制御

TRIM29は、TAp63α、RNA polymerase IIおよびMediator複合体と結合している。TRIM29は、これらのタンパク質を介して細胞接着遺伝子およびEMT関連遺伝子の発現制御を行っている。

第5節 要約

1. TRIM29は、子宮頸がん細胞の細胞浸潤能および細胞接着能を制御するタンパク質である.
2. TRIM29は、TAp63 α , Pol IIおよび転写メディエーターと結合する.
3. TRIM29は、ZEB1およびインテグリンの発現を抑制している.
4. TRIM29は、TAp63 α による細胞接着能の上昇を抑制している.

TRIM29は、TAp63 α , Pol IIや転写メディエーターと結合し、子宮頸がん細胞の機能を制御することが明らかとなった. TRIM29をノックダウンした細胞では、ZEB1およびITGB1の発現レベルが上昇した. TRIM29によるZEB1およびITGB1の発現上昇は、TAp63 α の過剰発現によって抑制されなかった. TRIM29は、TAp63 α 非依存的にZEB1およびITGB1の発現を制御していることが示唆された. 転写メディエーターの一つであるMED12は、EMT関連遺伝子の発現制御に関わることが報告されている. 第1章において、TRIM29がクロマチンに直接結合すること示した. TRIM29は、MED12のクロマチンへのリクルートを制御し、ZEB1およびITGB1の発現を調整している可能性がある.

TRIM29 ノックダウンは、HPV 型依存的に子宮頸がん細胞の機能を変化させた. 子宮頸がん細胞の機能は、TRIM29 および HPV 型の両方に依存していると考えられる. 子宮頸がん細胞の機能制御における TRIM29 の役割を決定するためには、*in vivo*での機能解析が必要とされる. EMT 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かもしれない.

総括および結論

1. TRIM29 は, DNA 修復タンパク質をクロマチン上に集積させることによって, DNA 修復開始シグナルの誘導を制御している.
2. TRIM29 は, RNA ポリメラーゼ IIなどを介して細胞接着因子の発現レベルを調整し, がん細胞の接着能を制御している.
3. TRIM29 は, クロマチン上で DNA 修復および転写を制御するタンパク質である.

第 1 章にて, TRIM29 が DNA 修復の制御に関わるのかどうかを検討した. TRIM29 は, MSH2 および H3K36me3 と直接結合し, クロマチン上で ATM 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. TRIM29 をノックダウンした細胞では, DNA 修復開始シグナルである γ H2AX の低下が観察された. また, TRIM29 のクロマチンへの結合は, DNA 損傷に応答した γ H2AX の誘導および放射線耐性に必要であった.

第 2 章にて, 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検討した. TRIM29 は, RNA ポリメラーゼ II およびメディエーター複合体に結合し, p63 および EMT 関連遺伝子の発現制御に関わることが明らかになった. 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, 細胞外マトリックスへの接着能が変化した.

TRIM29 は, ヒストン結合タンパク質であり, DNA 損傷応答や遺伝子発現制御に関わることが明らかになった. どのようにして TRIM29 が DNA 損傷応答を活性化しているのかを明らかにするためには, TRIM29 と ATM の機能的な関係を検討する必要がある. さらに, TRIM29 がクロマチンに結合することから, TRIM29 は転写制御因子のプロモーターへのリクルートを制御する可能性があることが考えられた.

謝辞

本論文の作成にあたり多大なるご指導，ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科 畠山 鎮次教授に厚く御礼申し上げます．北海道大学大学院医学研究科 高橋 秀尚講師には実験手法を始めとして様々なご指導，ご助言をいただき，深く感謝しております．質量分析を行っていただいた Stowers 研究所の Joan W. Conaway博士と Ronald C. Conaway 博士らに深く感謝いたします．最後になりましたが，本研究を遂行するにあたり多大なるご支援，ご協力をいただきました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の皆様心より感謝申し上げます．

参考文献

- 1 Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angstrom resolution. *Nature* **389**, 251-260 (1997).
- 2 Tessarz, P. & Kouzarides, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 703-708 (2014).
- 3 Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705 (2007).
- 4 Yun, M., Wu, J., Workman, J. L. & Li, B. Readers of histone modifications. *Cell Res.* **21** (2011).
- 5 Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D. & Patel, D. J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (2007).
- 6 Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45 (2000).
- 7 Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078 (2009).
- 8 Ciccia, A. & Elledge, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* **40** (2010).
- 9 Dobbs, T. A., Tainer, J. A. & Lees-Miller, S. P. A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. *DNA repair* **9**, 1307-1314 (2010).
- 10 Williams, G. J., Lees-Miller, S. P. & Tainer, J. A. Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA repair* **9** (2010).
- 11 van Attikum, H. & Gasser, S. M. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.* **19**, 207-217 (2009).
- 12 Lieber, M. R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* **283**, 1-5 (2008).
- 13 San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229-257 (2008).
- 14 Price, B. D. & D'Andrea, A. D. Chromatin remodeling at DNA

- double-strand breaks. *Cell* **152**, 1344-1354, (2013).
- 15 Murr, R. *et al.* Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **8**, 91-99 (2006).
 - 16 Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K. & Richmond, T. J. Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.* **327**, 85-96 (2003).
 - 17 Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. & Price, B. D. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 13182-13187 (2005).
 - 18 Bauerschmidt, C. *et al.* Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin. *Nucleic Acids Res.* **38**, 477-487 (2010).
 - 19 Martin, L. M. *et al.* DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 518-527 (2010).
 - 20 Shahi, A. *et al.* Mismatch-repair protein MSH6 is associated with Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2130-2143 (2011).
 - 21 Watrin, E. & Peters, J. M. The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells. *The EMBO J.* **28**, 2625-2635 (2009).
 - 22 Brown, K. D. *et al.* The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nat. Genet.* **33**, 80-84 (2003).
 - 23 Wang, Y. *et al.* BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* **14**, 927-939 (2000).
 - 24 Sardiù, M. E. *et al.* Probabilistic assembly of human protein interaction networks from label-free quantitative proteomics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 1454-1459 (2008).
 - 25 Lukas, J., Lukas, C. & Bartek, J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1161-1169 (2011).
 - 26 Smeenk, G. & van Attikum, H. The chromatin response to DNA breaks: leaving a mark on genome integrity. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 55-80 (2013).

- 27 Aymard, F. *et al.* Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 366-374 (2014).
- 28 Li, F. *et al.* The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSalpha. *Cell* **153**, 590-600 (2013).
- 29 Pfister, S. X. *et al.* SETD2-Dependent Histone H3K36 Trimethylation Is Required for Homologous Recombination Repair and Genome Stability. *Cell Rep.* **7**, 2006-2018 (2014).
- 30 Fnu, S. *et al.* Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 540-545 (2011).
- 31 Edmunds, J. W., Mahadevan, L. C. & Clayton, A. L. Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J.* **27**, 406-420 (2008).
- 32 Fradet-Turcotte, A. *et al.* 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* **499**, 50-54 (2013).
- 33 Tang, J. *et al.* Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 317-325 (2013).
- 34 Botuyan, M. V. *et al.* Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* **127**, 1361-1373 (2006).
- 35 Hatakeyama, S. TRIM proteins and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 792-804 (2011).
- 36 Short, K. M. & Cox, T. C. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J. Biol. Chem.* **281**, 8970-8980 (2006).
- 37 Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399-434 (2009).
- 38 Kapp, L. N. *et al.* Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 45-54 (1992).
- 39 Savitsky, K. *et al.* A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**, 1749-1753 (1995).
- 40 Wang, L. *et al.* ATDC/TRIM29 phosphorylation by ATM/MAPKAP

- kinase 2 mediates radioresistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **74**, 1778-1788 (2014).
- 41 Yuan, Z. *et al.* The ATDC (TRIM29) protein binds p53 and antagonizes p53-mediated functions. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3004-3015 (2010).
- 42 Sho, T. *et al.* TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1245-1253 (2011).
- 43 Brzoska, P. M. *et al.* The product of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC, interacts with a protein kinase C substrate and inhibitor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 7824-7828 (1995).
- 44 Wang, L. *et al.* Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and beta-catenin stabilization. *Cancer cell* **15**, 207-219 (2009).
- 45 Aygun, O., Svejstrup, J. & Liu, Y. A RECQ5-RNA polymerase II association identified by targeted proteomic analysis of human chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 8580-8584 (2008).
- 46 Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-1489 (1983).
- 47 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 48 Takahashi, H. *et al.* Proteomics reveals a physical and functional link between hepatocyte nuclear factor 4alpha and transcription factor IID. *J. Biol. Chem.* **284**, 32405-32412 (2009).
- 49 Reymond, A. *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* **20**, 2140-2151 (2001).
- 50 Strausberg, R. L. *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 16899-16903 (2002).
- 51 Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R., 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242-247 (2001).
- 52 Takahashi, H. *et al.* Human mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors. *Cell* **146**, 92-104 (2011).
- 53 Warren, J. J. *et al.* Structure of the human MutSalpα DNA lesion

- recognition complex. *Mol. Cell* **26**, 579-592 (2007).
- 54 Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951 (1982).
 - 55 Ramakrishnan, C., Dani, V. S. & Ramasarma, T. A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein Eng.* **15**, 783-798 (2002).
 - 56 Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434 (1990).
 - 57 Bochman, M. L. & Schwacha, A. The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity. *Mol. Cell* **31**, 287-293 (2008).
 - 58 Reynisdottir, I., Lorimer, H. E., Friedman, P. N., Wang, E. H. & Prives, C. Phosphorylation and active ATP hydrolysis are not required for SV40 T antigen hexamer formation. *J. Biol. Chem.* **268**, 24647-24654 (1993).
 - 59 Hayes, A. P., Sevi, L. A., Feldt, M. C., Rose, M. D. & Gammie, A. E. Reciprocal regulation of nuclear import of the yeast MutSalpha DNA mismatch repair proteins Msh2 and Msh6. *DNA repair* **8**, 739-751 (2009).
 - 60 Bartholomew, B. Regulating the chromatin landscape: structural and mechanistic perspectives. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 671-696 (2014).
 - 61 Patel, D. J. & Wang, Z. Readout of epigenetic modifications. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 81-118 (2013).
 - 62 Caudy, A. A. *et al.* A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* **425**, 411-414 (2003).
 - 63 Leonhardt, E. A., Kapp, L. N., Young, B. R. & Murnane, J. P. Nucleotide sequence analysis of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D (ATDC). *Genomics* **19**, 130-136 (1994).
 - 64 Franchitto, A. *et al.* The mammalian mismatch repair protein MSH2 is required for correct MRE11 and RAD51 relocalization and for efficient cell cycle arrest induced by ionizing radiation in G2 phase. *Oncogene* **22**, 2110-2120 (2003).
 - 65 Bekker-Jensen, S. *et al.* Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J.*

- Cell Biol.* **173**, 195-206 (2006).
- 66 Polo, S. E. *et al.* Regulation of DNA-end resection by hnRNPU-like proteins promotes DNA double-strand break signaling and repair. *Mol. Cell* **45**, 505-516 (2012).
- 67 Kim, J. S. *et al.* Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **170**, 341-347 (2005).
- 68 Altmeyer, M. *et al.* The chromatin scaffold protein SAFB1 renders chromatin permissive for DNA damage signaling. *Mol. Cell* **52**, 206-220 (2013).
- 69 Beli, P. *et al.* Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response. *Mol. Cell* **46**, 212-225 (2012).
- 70 Lu, R. & Wang, G. G. Tudor: a versatile family of histone methylation 'readers'. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 546-555 (2013).
- 71 Brien, G. L. *et al.* Polycomb PHF19 binds H3K36me3 and recruits PRC2 and demethylase NO66 to embryonic stem cell genes during differentiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1273-1281 (2012).
- 72 Ballare, C. *et al.* Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1257-1265 (2012).
- 73 Musselman, C. A. *et al.* Molecular basis for H3K36me3 recognition by the Tudor domain of PHF1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1266-1272 (2012).
- 74 Musselman, C. A. *et al.* Binding of PHF1 Tudor to H3K36me3 enhances nucleosome accessibility. *Nat. Commun.* **4**, 2969 (2013).
- 75 Su, X., Chakravarti, D. & Flores, E. R. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 136-143 (2013).
- 76 Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178-196 (2014).
- 77 Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687 (2002).
- 78 Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52-67 (2010).

- 79 Mills, A. A. *et al.* p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708-713 (1999).
- 80 Rinne, T., Brunner, H. G. & van Bokhoven, H. p63-associated disorders. *Cell cycle* **6**, 262-268 (2007).
- 81 Yang, A. *et al.* p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* **2**, 305-316 (1998).
- 82 Carroll, D. K. *et al.* p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 551-561 (2006).
- 83 McDade, S. S. *et al.* Genome-wide analysis of p63 binding sites identifies AP-2 factors as co-regulators of epidermal differentiation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7190-7206 (2012).
- 84 Tran, M. N. *et al.* The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. *J. Biol. Chem.* **288**, 3275-3288 (2013).
- 85 Tucci, P. *et al.* Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 15312-15317 (2012).
- 86 Serber, Z. *et al.* A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8601-8611 (2002).
- 87 Forouzanfar, M. H. *et al.* Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* **378**, 1461-1484 (2011).
- 88 Walboomers, J. M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**, 12-19 (1999).
- 89 Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Munoz, N. & Franceschi, S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* **88**, 63-73 (2003).
- 90 Munoz, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 518-527 (2003).
- 91 Kaewprag, J., Umnajvjit, W., Ngamkham, J. & Ponglikitmongkol, M. HPV16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteinases. *PloS one* **8**, e71611 (2013).

- 92 Lee, M. Y., Chou, C. Y., Tang, M. J. & Shen, M. R. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4743-4750 (2008).
- 93 Maity, G. *et al.* Fibronectin-integrin mediated signaling in human cervical cancer cells (SiHa). *Mol. Cell. Biol.* **336**, 65-74 (2010).
- 94 Kanno, Y. *et al.* TRIM29 as a novel prostate basal cell marker for diagnosis of prostate cancer. *Acta Histochem.* (2014).
- 95 Ai, L. *et al.* TRIM29 Suppresses TWIST1 and Invasive Breast Cancer Behavior. *Cancer Res.* **74**, 4875-48879 (2014).
- 96 Tang, Z. P., Cui, Q. Z., Dong, Q. Z., Xu, K. & Wang, E. H. Ataxia-telangiectasia group D complementing gene (ATDC) upregulates matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) to promote lung cancer cell invasion by activating ERK and JNK pathways. *Tumour Biol.* **34**, 2835-2842 (2013).
- 97 Wang, L. *et al.* ATDC induces an invasive switch in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Genes Dev.* **29**, 171-183 (2015).
- 98 Chen, H. Z., Tsai, S. Y. & Leone, G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 785-797 (2009).
- 99 Shah, N. & Sukumar, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 361-371 (2010).
- 100 Huttenlocher, A. & Horwitz, A. R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005074 (2011).
- 101 Gallegos, J. R. *et al.* SCF TrCP1 activates and ubiquitylates TAp63gamma. *J. Biol. Chem.* **283**, 66-75 (2008).
- 102 Rossi, M. *et al.* The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 12753-12758 (2006).
- 103 Conaway, R. C. & Conaway, J. W. The Mediator complex and transcription elongation. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 69-75 (2013).
- 104 Taatjes, D. J. The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 315-322 (2010).
- 105 Huang, S. *et al.* MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF-beta receptor signaling. *Cell* **151**, 937-950 (2012).
- 106 Taddei, I. *et al.* Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat. Cell Biol.* **10**,

- 716-722 (2008).
- 107 Guo, W. *et al.* Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote
mammary tumorigenesis. *Cell* **126**, 489-502 (2006).
- 108 Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins:
pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 550-560 (2010).
- 109 Adey, A. *et al.* The haplotype-resolved genome and epigenome of the
aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature* **500**, 207-211 (2013).