



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	TRIM39 negatively regulates NF κ B signal through stabilization of Cactin
Author(s)	鈴木, 正宣
Description	配架番号 : 2155
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11673号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11673
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64946
Type	doctoral thesis
File Information	Masanobu_Suzuki.pdf



学位論文

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

2015 年 3 月

北海道大学

鈴木 正宣

学位論文

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

2015 年 3 月

北海道大学

鈴木 正宣

目 次

A) 発表論文目録および学会発表目録	1
B) 緒言	2
1 ユビキチン化による NF κ B シグナルの制御	2
2 ユビキチン化修飾系	2
3 TRIM39	3
4 Cactin (Cactus interactor)	3
5 本研究の目的	3
C) 略語表	5
D) 実験方法	8
1 実験材料	8
2 実験方法	20
<1> DNA アガロースゲル電気泳動	20
<2> エタノール沈殿・イソプロパノール沈殿	20
<3> フェノール抽出・クロロホルム抽出	20
<4> 低融点アガロースゲルからの DNA 断片の回収	21
<5> 大腸菌形質転換	21
<6> プラスミドの調製	21
<7> 塩基配列の決定	22
<8> オリゴヌクレオチドの合成	22
<9> PCR	23
<10> サブクローニング	25
<11> タンパク質のポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)	26
<12> クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色	27
<13> ウェスタンブロット解析	27
<14> 細胞の継代培養	27
<15> リン酸カルシウム法による細胞への遺伝子導入	27
<16> リポフェクション法を用いた細胞への遺伝子導入	28
<17> 細胞溶解液の調製	28
<18> 免疫沈降実験	28
<19> シクロヘキシミドを用いた細胞内タンパク質安定性実験	29
<20> デュアルルシフェラーゼアッセイ	29
<21> RNA の抽出	30
<22> 逆転写反応	30

<23> バキュロウイルス/昆虫細胞による His ₆ タグ融合タンパク質の作製と精製.....	30
<24> 酵母ツーハイブリッド法	31
E) 実験結果	33
1 TRIM39 結合タンパク質の同定	33
2 TRIM39 による Cactin の制御.....	35
3 NFκB シグナルにおける Cactin の機能の検討	38
4 TRIM39 による NFκB シグナル制御	42
F) 考察.....	48
G) 総括および結論.....	50
1 得られた新知見	50
2 新知見の意義	50
3 今後の研究展開と課題.....	50
H) 謝辞.....	51
I) 引用文献	52

A) 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Masanobu Suzuki, Masashi Watanabe, Yuji Nakamaru, Satoshi Fukuda and Shigetsugu Hatakeyama

TRIM39 negatively regulates NF κ B signal through stabilization of Cactin

本研究の一部は以下の学会に発表した。

鈴木 正宣、渡部 昌、中丸 裕爾、高木 大、畠山 鎮次、福田 諭
ベーチェット病感受性遺伝子 Tripartite motif protein 39 (TRIM39)の機能解析
日本耳鼻咽喉科学会総会、平成 26 年 5 月 16 日、福岡

鈴木 正宣、渡部 昌、中丸 裕爾、福田 諭、畠山 鎮次
Tripartite motif protein 39(TRIM39)の機能解析
第 79 回日本インターフェロンサイトカイン学会学術集会、平成 26 年 6 月 19 日、札幌

鈴木 正宣、渡部 昌、中丸 裕爾、高木 大、本間 あや、畠山 鎮次、福田 諭
ベーチェット病感受性遺伝子 Tripartite motif protein 39 (TRIM39)の機能解析
第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、平成 27 年 2 月 26 日、東京

B) 緒言

1 ユビキチン化による NFκB シグナルの制御

NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)は、細胞生存決定、免疫反応、炎症、発がん、器官形成などにおいて重要な役割を果たしている転写因子である^{1,2}。定常状態では、NFκB は、その核移行シグナルが Inhibitor of κB proteins (IκB)によってマスクされており、細胞質内にとどまっている。サイトカインなどの刺激が入ると、IKKβ や IKKγ などの IκB kinases (IKK)が、IκB をリン酸化する。リン酸化された IκB は選択的に分解され、核移行シグナルが露出した NFκB は核に移行できるようになり、数多くの標的遺伝子の転写を活性化する¹⁻³。この NFκB シグナルにおいて、ユビキチン化修飾系は重要な役割を果たしている。例えば、リン酸化された IκB の分解は、Skp1-Cul1-F-box (SCF) protein complex 型のユビキチンリガーゼがユビキチンの 48 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖を付加することによってなされる^{4,5}。また、ユビキチンの 63 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖が IKK の活性化に重要であること、さらに近年では直鎖状のユビキチン鎖も NFκB の活性化に重要であることが報告されている^{2,6,7}。このように、NFκB の活性化の多くのメカニズムをユビキチン化が関与している。

2 ユビキチン化修飾系

ユビキチン化は真核生物に存在するタンパク質翻訳後修飾の一つである。ユビキチン化は、比較的半減期の短いタンパク質の分解制御⁸やシグナル伝達、細胞周期、形態形成や DNA 修復など多岐に渡る細胞機能を制御している⁹。ユビキチン化は、ユビキチン活性化酵素 E1、ユビキチン結合酵素 E2、ユビキチンリガーゼ E3 からなる3種の酵素カスケードによって触媒される酵素反応系である¹⁰。まず、ユビキチンが ATP 依存性にユビキチン活性化酵素 E1 の活性残基であるシステインとチオエステル結合し、E1 からユビキチン結合酵素 E2 へ転移される。次に、ユビキチンリガーゼ E3 によって認識される標的タンパク質のリジン側鎖の ε -アミノ基にユビキチンのカルボキシル末端がイソペプチド結合することによって、ユビキチン化修飾が完了する¹⁰。標的タンパク質に結合したユビキチン自身も、そのリジン側鎖やアミノ末端を介してユビキチン化を受けることが可能であり、その修飾構造はポリユビキチン化と呼ばれている。

ユビキチン化修飾系の中で、ユビキチンリガーゼ E3 は標的タンパク質の認識を司る酵素サブユニットである¹⁰⁻¹²。ユビキチンリガーゼはこれまでに、ヒトゲノム中に数百以上(全ゲノムの数%以上)存在していることが知られており、その構造によって、HECT (homologous to E6-AP COOH terminus)型^{9,12}、RING (really interesting new gene)型¹³⁻¹⁵、そして U-box 型¹⁶⁻¹⁸に分類される。

3 TRIM39

ユビキチンリガーゼの中で、RING ドメインを有するタンパク質群のサブファミリーとして、TRIM タンパク質ファミリーの存在が見出されている¹⁹。TRIM タンパク質は、RINGドメイン、1つないし2つの B-boxドメイン、Coiled-Coilドメインを持つタンパク質と定義される¹⁹⁻²¹。TRIM タンパク質はさまざまな細胞機能に関わることが知られており、その変異は発達障害、神経変性疾患、ウイルス感染、発がんなどの多様な疾患と関連していることが知られている²¹⁻²⁴。

TRIM39はTRIMファミリータンパク質の一つであり、RINGドメイン、B-boxドメイン、Coiled-Coilドメインに加え、カルボキシル末端側に SPRY (Spla kinase and ryanodine receptor)ドメインを有する²⁵。TRIM39も他の TRIM タンパク質と同様 E3 活性を持ち、基質タンパク質のユビキチン化を促進する。TRIM39 によって分解が促進する基質²⁶や、逆に安定化を受ける基質²⁵の存在も報告されている。

TRIM39 の遺伝子は、ゲノム上でヒト 6 番染色体の MHC (major histocompatibility complex) Class I 領域に位置している。同領域には、免疫システムと関連する遺伝子が多数存在している他^{19,27,28}、6つの TRIM ファミリー遺伝子(*TRIM10*, *TRIM15*, *TRIM26*, *TRIM27*, *TRIM31*, *TRIM38*)も存在している²¹。TRIM タンパク質と自然免疫シグナルには深い関連があり、この MHC Class I 領域に存在する TRIM ファミリー遺伝子をはじめとして、およそ半数の TRIM タンパク質が免疫システムを制御していることが報告されている²⁹。TRIM39 も、I 型インターフェロンの制御に関与し³⁰、TRIM39 遺伝子座のエキソン内に位置する SNP が、ベーチェット病の罹患率に相関することが報告されている³¹。これらの知見から、他の多くの TRIM と同様に TRIM39 も炎症免疫シグナルに影響すると予想されるが、その機能は不明であった。

4 Cactin (Cactus interactor)

NFκB シグナルはさまざまな因子によって厳密に制御されているが、Cactin (Cactus interactor)もその制御因子の一つである。Cactin は、ショウジョウバエにおける IκBα のオルソログである Cactus に結合するタンパク質として同定された³²。Cactin はショウジョウバエやゼブラフィッシュ、線虫の発生におけるシグナル制御と関連することが報告されている³²⁻³⁵。ヒト Cactin は、IκBα ではなく IκBL (IκB-like)と結合し、NFκB を負に制御することが知られている³⁶。この IκBL 遺伝子は、TRIM39 遺伝子と同様、6 番染色体の MHC 領域に存在しており、Cactin と同様に NFκB シグナルを負に制御するが³⁶、Cactin、IκBL ともにその詳細な機能は明らかになっていない。

5 本研究の目的

ここまで述べてきたように、数多くの TRIM タンパク質が炎症免疫シグナル伝達を制御すること、TRIM39 遺伝子座内の SNP がベーチェット病の罹患率と関連すること、

TRIM39 遺伝子は MHC 領域に存在することから、*TRIM39* が炎症免疫シグナルに影響すると想定されていたが、未だ十分な解析がなされていなかった。本研究では、*TRIM39* の炎症免疫シグナルにおける機能を明らかにすることを目的とした。

C) 略語表

本文中、ならびに図中で使用した略語は以下のとおりである。

3-AT	3-amino-1, 2, 4-triazole
A20	TNFAIP3 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3)
APS	ammonium peroxodisulfate
BPB	Bromophenol blue
Cactin	Cactus interactor
CBB	coomassie brilliant blue
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CS	calf serum
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
E1	ubiquitin-activating enzyme
E2	ubiquitin-conjugating enzyme
E3	ubiquitin ligase
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
ECSIT	evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways
EID-1	EP300-interacting inhibitor of differentiation 1
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GST	Glutathione S-Transferase
GWAS	Genome-wide association study
HBS	HEPES buffered saline
HECT	homologous to the E6AP carboxyl terminus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
I κ B	inhibitor of κ B
I κ B α	inhibitor of κ B α
I κ BL	inhibitor of κ B-like
IKK γ	inhibitor of κ B γ
IKK	I κ B kinase
IL	interleukin
IPTG	isopropyl β -1-thiogalactopyranoside
IRAK4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4

ISRE	IFN-stimulated response element
LARII	luciferase assay reagent II
Luc	Luciferase
MHC	major histocompatibility complex
MOAP-1	Modulator of apoptosis 1
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NAT	NF-kappaB-activated transgene
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PLB	passive lysis buffer
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PRY	PRYdomain
PVDF	polyvinylidene Difluoride
RET	rearranged during transfection
RFP	RET Finger protein
RING	really interesting new gene
RIP	Regulated Intramembrane Proteolysis
RNAi	RNA interference
SCF	Skp1-Cul1-F-box protein complex
siRNA	small interfering RNA
SLE	Systemic lupus erythematosus
SNP	single nucleotide polymorphism
SPRY	Spla kinase and ryanodine receptor
TB	transformation buffer
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	TBS containing 0.5% Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.
TNFα	tumor necrosis factor α
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRIM	tripartite motif
UV	ultraviolet
WCL	whole cell lysate
X-GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside

Amino Acids

G	Gly	glycine
H	His	histidine
K	Lys	lysine

Nucleotides

A	adenine
C	cytosine
G	guanine
T	thymine
U	uracil

D) 実験方法

1 実験材料

以下に本研究で用いた実験材料の由来及び調剤法などを示した。各装置などの製造元の社名は社名のあとに社あるいは(株)と略記した。

<1> 大腸菌株、酵母、培養細胞

大腸菌 XL-10Gold 株 (Stratagene 社)

大腸菌 DH10Bac 株 (Invitrogen 社)

酵母 L40 株 (Invitrogen 社)

HEK293T 細胞 (ATCC)

HeLa 細胞 (ATCC)

<2> 装置

PCR 装置:

MJ Mini (バイオラッドラボラトリーズ(株))

StepOne™リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 社)

DNA シークエンサー: ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)

電気泳動槽:

スラブ電気泳動装置 (日本エイドー(株))

Mupid-2plus (Advance(株))

トランスブロットセル (バイオラッドラボラトリーズ(株))

パワーサプライ: BP-T5 (Bio craft(株))

UV トランスイルミネーター (アガロースゲル撮影装置):

AS-100BT (Bio cratt(株))

超音波破碎機: Sonifer250 (Branson 社)

スライドガラス: MICRO SLIDE GLASS (MATSUNAMI 社)

カバーガラス: MICRO COVER GLASS (MATSUNAMI 社)

濾紙: 3MM (Whatman 社)

大腸菌・酵母培養用シェーカー: Innova4330 (New Brunswick Scientific 社)

インキュベーター: TVN680DA incubator (Advantec 社)

CO₂ インキュベーター:

Forma series II water jacketed CO₂ incubator (Thermo electron 社)

ヒートブロック: Thermo Alumi bath ALB-221 (IWAKI 社)

吸光光度計: Smart Spec 3000 (バイオラッドラボラトリーズ(株))

遠心機:

Centrifuge 5415R (Eppendorf 社)

MX-300 (TOMY 社)

Avanti J-E centrifuge (Beckman Coulter 社)

ルミノメーター: Glomax20/20 luminometer (プロメガ社)

顕微鏡: BX-51 (OLYMPUS 社)

CCD カメラ: DP71 (OLYMPUS 社)

pH メーター: Seven Easy (Mettler Toledo 社)

オートクレーブ装置: KS-323 (TOMY 社)

ドライオーブン: SS-K-300 (いすゞ製作所(株))

濾過滅菌用フィルター: MILLEXHV (Millipore 社)

<3> キット

DNA シークエンスキット: BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems 社)

DNA 連結キット: TaKaRa DNA ligation kit (タカラバイオ(株))

RNA 抽出キット: ISOGEN (ニッポンジーン(株))

cDNA 合成キット: ReverTra plus (TOYOBO(株))

プラスミド抽出キット:

JETSTAR2.0 (GENOMED 社)

Axyprep plasmid mini prep kit (Axygen 社)

Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社)

Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen 社)

<4> 各種酵素

DNA 合成酵素:

KOD plus (TOYOBO(株))

KOD FX (TOYOBO(株))

RNA 分解酵素: RNaseA (Novagen 社)

トリプシン(Sigma 社)

制限酵素類 (BamHI, EcoRI, EcoRV, NotI, XhoI): 全て TaKaRa(株)製の制限酵素を使用した。

<5> 各種核酸

pcDNA3 (Invitrogen 社)

pcDNA3myc: pcDNA3 (Invitrogen 社)に Myc タグを組み込んだ。

pCR3 (Invitrogen 社)

pCRFLAG: pCR3 (Invitrogen 社)に 2×FLAG タグを組み込んだ。

p3×FLAG (Invitrogen 社)

pCGN-HA、pCGN-HA-Ub:当研究室で作製された。

pFastBacHT (Invitrogen 社)

pNAT-Luc:当研究室で作製された。

pGL4.74-hRLtk (Promega 社)

NIH 3T3 cells Matchmaker cDNA library (Clontech 社)

Human Prostate Matchmaker cDNA Library (Clontech 社)

dNTP mixture (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) (タカラバイオ(株))

<6> メンブレン、フィルター

PolyVinylidene DiFluoride (PVDF)膜:

Immobilon-P Transfer membrane (MILLIPORE 社)

MILLEX-HV (0.45 μm フィルター) (MILLIPORE 社)

<7> 培養用試薬

大腸菌培養試薬

Bacto Trypton (Sigma 社)

Yeast Extract (Sigma 社)

Bacto Agar (Sigma 社)

酵母培養試薬

DOB (MP Biomedicals 社)

CSM-W (MP Biomedicals 社)

CSM-L (MP Biomedicals 社)

CSM-W-L(MP Biomedicals 社)

CSM-W-L-K-H-Uracil (MP Biomedicals 社)

3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) (MP Biomedicals 社)

細胞培養試薬

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma 社)

Fetal bovine serum (FBS) (Gibco 社)

Calf serum (CS) (Camblex 社)

Charcol treated FBS (Gibco 社)

Sf-900 II (Invitrogen 社)

<8> ビーズ類

Glutathione Sepharose Beads 4B (GE healthcare 社)

rProtein A Sepharose Fast flow (GE healthcare 社)
Protein G Sepharose 4 Fast flow (GE healthcare 社)
Probond resin (Invitrogen 社)

<9> 抗生物質等

アンピシリン (Sigma 社)
カナマイシン (Sigma 社)
シクロヘキシミド (Sigma 社)

<10> タンパク質分解酵素阻害剤

アプロチニン (Sigma 社)
ロイペプチン (Sigma 社)
フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) (Sigma 社)

<11> 抗体

マウス抗 FLAG タグモノクローナル抗体 (M2) (Sigma 社)
マウス抗 GST タグモノクローナル抗体 (B-14) (Santa Cruz Biotechnology 社)
マウス抗 HA タグモノクローナル抗体 (HA11.11/16B12) (Covance Research Products 社)
マウス抗 Myc タグモノクローナル抗体 (9E10) (Roche Molecular Biochemicals 社)
ウサギ抗 His タグポリクローナル抗体 (H-33) (Santa Cruz Biotechnology 社)
マウス抗 GAPDH モノクローナル抗体 (6C5) (Ambion 社)
ウサギ抗 TRIM39 ポリクローナル抗体 (Sigma 社)
ウサギ抗 C19orf29 ポリクローナル抗体 (Sigma 社)

<12> 細胞培養関連試薬

遺伝子導入試薬: FuGENE® HD (Roche 社)
Tumor necrosis factor α (TNF α) (UPstate 社)

<13> SDS-PAGE、ウェスタンブロット関連試薬

アクリルアミド (Sigma 社)
N,N'-メチレンビスアクリルアミド (Sigma 社)
SDS-PAGE 用タンパク質分子量マーカー: プレスティンドエクセルラダー Broad range (アプロサイエンス(株))
ECL Western Blotting Detection Reagents (GE healthcare 社)
X 線フィルム: CL-XPosure Film (Thermo Scientific 社)

CBB R-250 (Nacalai tesque 社)

<14> その他試薬

エタノール (Sigma 社)

イソプロパノール (Sigma 社)

フェノール (Sigma 社)

8-キノリノール (Sigma 社)

クロロホルム (Sigma 社)

3-メチル-1-ブタノール (Sigma 社)

1 kb plus DNA ラダーマーカー (Invitrogen 社)

アガロース (Sigma 社)

低融点アガロース (Sigma 社)

Trizma base (Sigma 社)

PIPES (同仁化学(株))

HEPES (Sigma 社)

塩化水素 (HCl) (Sigma 社)

EDTA (Sigma 社)

塩化ナトリウム (NaCl) (Nacalai tesque 社)

塩化カリウム (KCl) (Sigma 社)

塩化カルシウム (CaCl₂) (和光純薬工業社))

塩化マンガン (MnCl₂) (Sigma 社)

リン酸水素ナトリウム (Na₂HPO₄) (Sigma 社)

リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄) (和光純薬工業(株))

D-グルコース (Sigma 社)

デキストロース (関東化学(株))

水酸化ナトリウム (Sigma 社)

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (Sigma 社)

Triton X-100 (Sigma 社)

Igepal CA-630 (NP-40) (Sigma 社)

Tween 20 (Sigma 社)

デオキシコール酸ナトリウム (Sodium deoxycholate) (関東化学(株))

フッ化ナトリウム (NaF) (関東化学(株))

オルトバナジン酸ナトリウム (Na₃VO₄) (Sigma 社)

ピロリン酸ナトリウム (Nacalaites tesque 社)

ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS) (Sigma 社)

2-メルカプトエタノール (Sigma 社)

グリセロール (Sigma 社)
ブロモフェノールブルーナトリウム (BPB) (Sigma 社)
酢酸 (Sigma 社)
酢酸カリウム (Sigma 社)
グリシン (Sigma 社)
イミダゾール (Sigma 社)
Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma 社)
ホルムアミド (Sigma 社)
Isogen (ニッポンジーン社)
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma 社)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-gal) (Sigma 社)

<15> 調製試薬類

純水は MilliQ 水を使用した。試薬類は特級試薬、生化学実験用、分子生物学実験用、細胞実験用試薬を所定の濃度に溶解し、オートクレーブ滅菌または濾過滅菌した後を使用した。以下、%という表記は、液体を液体に溶解して調製した際には体積/体積パーセント濃度を表し、固体を液体に溶解して調製した際には質量/体積パーセント濃度を表すこととする。

核酸用試薬

0.5-2 M Tris/HCl 緩衝液 (pH 6.8-8.8)

Tris 溶液を塩酸で適当な pH (6.8-8.8)に合わせ、最終的に Tris 濃度が 0.5-2 M となるよう調製した。

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA 溶液を水酸化ナトリウム溶液で pH 8.0 に合わせ、最終的に EDTA 濃度が 0.5 M となるよう調製した。

TE 緩衝液 (pH 8.0)

10 mM Tris/HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

中性フェノール溶液

65℃にて融解したフェノールに 0.1% 8-キノリノールを加えた。0.1 M Tris/HCl (pH 7.6)を等量加え、十分に攪拌し水層を捨て、水層の pH が中性になるまで繰り返した。最後に水層を数 cm ほど残し、遮光瓶にて 4℃保存とした。

クロロホルム/3-メチル-1-ブタノール溶液

クロロホルムと3-メチル-1-ブタノールを49:1の割合で加え、遮光瓶にて4℃保存とした。

5 M NaCl 溶液

292.5g の NaCl を純水に溶解し、全量を 1 l とした。

50×TAE 溶液

2 M Tris

2 M 酢酸

0.05 M EDTA

使用時は 1×濃度に希釈して使用した。

エチジウムブロマイド含有アガロースゲル

アガロース、低融点アガロースは Sigma 社のものを使用した。1×TAE 溶液中にアガロースゲルが 0.7-2%となるよう調製し、さらに 200 ml あたり 20 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を 1 µl 加えたゲルを調製した。

アガロース電気泳動用色素

各制限酵素に添付されている 10×loading buffer を使用した。

制限酵素用緩衝液

各制限酵素に添付されている 10×buffer を使用した。

アルカリミニプレップ法 I 液 (Solution I)

50 mM グルコース

25 mM Tris/HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

アルカリミニプレップ法 II 液 (Solution II)

0.2 M 水酸化ナトリウム

1% SDS

アルカリミニプレップ法 III 液 (Solution III)

3 M 酢酸カリウム

2 M 酢酸

大腸菌の培地

LB プレート培地

1%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
170 mM	NaCl
1.5%	Bacto Agar
100 µg/ml	アンピシリン
25 µg/ml	カナマイシン

滅菌後約 50°Cに冷却し、抗生物質(アンピシリン、カナマイシン)は必要に応じて加えて使用した。

2×YT 培地

1.6%	BactoTrypton
1%	YeastExtract
86 mM	NaCl
100 µg/ml	アンピシリン
25 µg/ml	カナマイシン

抗生物質(アンピシリン、カナマイシン)は必要に応じて加えて使用した。

SOB 培地

2%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgSO
10 mM	MgCl ₂

Bacto Trypton、Yeast Extract、NaCl、KCl を純水に溶解しオートクレーブにより滅菌した後に、フィルター濾過滅菌した MgSO₄、MgCl₂ 混合溶液を加えて調製した。

IPTG 溶液

1 M の濃度となるように IPTG を純水で溶解して使用した。

Transformation Buffer (TB)

10 mM	PIPES
-------	-------

250 mM	KCl
15 mM	CaCl ₂
55 mM	MnCl ₂

酵母培養用

YPD 液体培地、プレート培地

2%	Bacto Trypton
1%	Yeast Extract
22.2 mM	D-グルコース
2.5%	Bacto Agar (プレート培地のみ添加)

各種 DOB 液体培地、プレート培地

2.7%	DOB
2.5%	Bacto Agar (プレート培地のみ添加)
0.074%	CSM-W (DOB-W 培地のみ添加)
0.069%	CSM-L (DOB-L 培地のみ添加)
0.064%	CSM-W-L (DOB-W-L 培地のみ添加)
0.055%	CSM-W-L-K-H-Uracil (DOB-W-L-K-H-Uracil 培地のみ添加)

DOB-W-L-K-H-Uracil 培地のみ、滅菌後約 50℃に冷却し、25 mM となるように 3-Amino-1,2,4-triazole を加えて使用した。

細胞培養用

DMEM

Sigma 社製の DMEM を使用した。血清(FBS、CS)は 56℃、30 分の非働化を行い、FBS を 10%となるよう調製した。

Sf-900II

昆虫細胞 Sf9 には、Sf900II に、FBS を 5%となるよう調製した培地を使用した。

タンパク質泳動、ウェスタンブロット用試薬

SDS-PAGE 分離ゲル緩衝液

1.5 M	Tris/HCl (pH 8.8)
0.4%	SDS

SDS-PAGE 濃縮ゲル緩衝液

0.5 M	Tris/HCl (pH 6.8)
0.4%	SDS

10×SDS-PAGE 泳動緩衝液

250 mM	Tris
1.92 M	グリシン
1%	SDS

1×SDS-PAGE 泳動緩衝液

上記 10×SDS-PAGE 泳動緩衝液を 1×に希釈して使用した。

20% APS 溶液

2 g の APS を 10 ml の純水に溶解後、-20℃に保存した。

Coomassie brilliant blue (CBB)染色液

50%	メタノール
10%	酢酸
0.1%	CBBR-250

30 分以上攪拌し、CBBR-250 を完全に溶解した。

CBB 脱色液

5%	メタノール
7.5%	酢酸

300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液

300 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl (pH 7.6)
0.5%	TritonX-100
1 mM	PMSF
10 µg/ml	アプロチニン
10 µg/ml	ロイペプチン
400 µM	Na ₃ VO ₄
400 µM	EDTA
10 mM	NaF
10 mM	ピロリン酸ナトリウム

150 mM NaCl 細胞溶解緩衝液

150 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl (pH 7.6)
0.5%	Triton-X 100
1 mM	PMSF
10 µg/ml	アプロチニン
10 µg/ml	ロイペプチン
400 µM	Na ₃ VO ₄
400 µM	EDTA
10 mM	NaF
10 mM	ピロリン酸ナトリウム

免疫沈降用洗浄緩衝液

150 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl (pH 7.6)
0.1%	Triton-X100
1 mM	PMSF
10 µg/ml	アプロチニン
10 µg/ml	ロイペプチン
400 µM	Na ₃ VO ₄
400 µM	EDTA
10 mM	NaF
10 mM	ピロリン酸ナトリウム

His₆ 結合用緩衝液

50 mM	HEPES pH 7.9
150 mM	NaCl
10%	グリセロール

1×SDS サンプル緩衝液

50 mM	Tris/HCl (pH 6.8)
2%	SDS
6%	2-メルカプトエタノール
10%	グリセロール
0.1%	BPB

3×SDS サンプル緩衝液

150 mM	Tris/HCl (pH 6.8)
6%	SDS
18%	2-メルカプトエタノール
30%	グリセロール
0.1%	BPB

10×ウェスタンブロット転写緩衝液

0.25 M	Tris
1.92 M	グリシン

1×ウェスタンブロット転写緩衝液

最終濃度 10%となるようにメタノールを加え、10×転写緩衝液を純水にて 10 倍に希釈した。

20×TBS

0.4 M	Tris/HCl (pH 7.6)
3 M	NaCl

1×TBST

20×TBS を純水にて 20 倍に希釈し、0.05%となるように Tween20 を加えた。

10×PBS

1.37 M	NaCl
81 mM	Na ₂ HPO ₄
27 mM	KCl
15 mM	KH ₂ PO ₄

1×PBS

10×PBS を純水にて 10 倍希釈して調整した。

トリプシン/EDTA 溶液

0.05%	トリプシン
0.5 mM	EDTA 2Na

以上を 1×PBS に溶解し、1 l になるように調製した後、濾過滅菌した。

2×HEPES buffered saline (HBS)

280 mM	NaCl
1.5 mM	Na ₂ HPO ₄
10 mM	KCl
12 mM	デキストロース
50 mM	HEPES

以上を純水に溶解し、1 M NaOH にて pH 7.10 に合わせ、500 ml になるように調製した後、濾過滅菌した。

2 M CaCl₂

29.4 g	CaCl ₂
--------	-------------------

以上を純水に溶解し、100 ml になるように調製し、濾過滅菌した。

2 実験方法

以下に本研究で施行した実験方法について示した。なお、遺伝子組み換え実験は、「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に従って実施した。

<1> DNA アガロースゲル電気泳動

1×TAE 溶液中にアガロースが 0.7-2%となるよう調製し、さらに 200 ml あたり 20 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を 1 µl 加えたゲルを調製した。1×TAE 溶液中で電気泳動を行った後、UV トランスイルミネーターを用いて検出および撮影を行った。

<2> エタノール沈殿・イソプロパノール沈殿

核酸を含む溶液に 1/20 量の 5 M 塩化ナトリウムと 2.5 倍量のエタノールを加え攪拌後、4℃、16,200×g、5 分間遠心しエタノール沈殿を行った。イソプロパノール沈殿の場合は、エタノールの代わりに 0.7 倍量のイソプロパノールを加え、同様に沈殿させた。沈殿物は 70%エタノールで洗浄後乾燥させ、適当量の純水または TE 緩衝液に溶解した。

<3> フェノール抽出・クロロホルム抽出

核酸を含む溶液のタンパク質、脂質の除去、及び各種酵素の失活を目的とした。等量の中性フェノールを加え攪拌後、室温で 16,200×g、5 分間遠心し、水層を回収した。さらにこの回収した液に等量のクロロホルム/3-メチル-1-ブタノール溶液を加え、攪拌

後、室温で $16,200 \times g$ 、5 分間遠心し水層を回収した。

<4> 低融点アガロースゲルからの DNA 断片の回収

目的 DNA を含む試料を DNA ラダーマーカーと並列に低融点アガロースゲルで電気泳動後、UV トランスイルミネーター上で撮影し、目的断片をカッターナイフにて切り出した。切り出した断片を含む低融点アガロースゲルを 100°C 、1 分間にて溶解させ、フェノール抽出、クロロホルム抽出を行い、水層を回収し、エタノール沈殿またはイソプロパノール沈殿を行い、適当量の純水または TE 緩衝液に溶解した。

<5> 大腸菌形質転換

(1) コンピテント細胞の調製

各種大腸菌を LB プレートに播種、 37°C 、14 時間培養し、単一コロニーを 25 ml の SOB 培地にて 37°C 、8 時間振盪培養した。100 ml の SOB 培地を 3 つ用意し、それぞれに培養した菌液をそれぞれ 1 ml、2 ml、5 ml 加え、全てを 18°C にて一晩培養した。それぞれの A_{600} 値を測定し、 $A_{600}=0.5$ 前後の培養液のみを選び(またはその程度になるまで培養を続け)、氷上で 10 分間冷却し、 4°C 、 $2,500 \times g$ 、10 分間遠心して集菌し、菌体を氷冷した 40 ml の TB に懸濁し、さらに 10 分間氷上に静置し、再び 4°C 、 $2,500 \times g$ 、10 分間遠心して集菌し、菌体を氷冷した 10 ml の TB に再懸濁し、さらに 750 μl の DMSO を加えて穏やかに混和し、10 分間氷上静置した後、1.5 ml チューブに 100 μl ずつ分注して直ちに液体窒素中で凍結させ、 -80°C で保存した。

(2) 形質転換

凍結コンピテント細胞を氷上で融解し、ライゲーション反応後の DNA 試料またはプラスミド DNA に 100 μl のコンピテント細胞を加え、氷上で 30 分間静置した。その後 42°C で 45 秒間のヒートショックを与え、再び 2 分間氷上に静置し、4 倍量の $2 \times \text{YT}$ 培地を加えて 37°C で 30 分間培養した。その後低速遠心で菌体を集菌し、適当量の培地で再懸濁させ、適当な抗生物質を含む LB プレートに播種し 37°C で一晩培養した。

<6> プラスミドの調製

(1) アルカリ SDS 法によるプラスミドの少量調製

プラスミドを含む大腸菌のコロニーを適当な抗生物質を含む 2 ml の $2 \times \text{YT}$ 培地に植菌後、 37°C 、200rpm にて 8 時間培養し、 4°C 、 $16,200 \times g$ 、1 分間遠心して集菌した。菌体を 200 μl の Solution I に懸濁し、200 μl の Solution II を加えて転倒混和し、5 分間室温にて静置して菌体を溶解させた。その後 200 μl の Solution III を加えて転倒混和して中和した後、 4°C 、 $16,200 \times g$ 、5 分間遠心して上清を回収しイソプロパノール沈殿を行った。沈殿物は 70%エタノールで洗浄後乾燥させ、適当量の純水または TE 緩

衝液に溶解した。

(2) キットを使用したシーケンス反応用プラスミドの少量調製

プラスミド抽出キット Axyprep plasmid mini prep kit (Axygen 社)を用いた。手順は、添付のプロトコルに従った。

(3) キットを使用した細胞トランスフェクション用プラスミドの大量調製

プラスミド抽出キット JETSTAR2.0 (GENOMED 社)を用いた。手順は、添付のプロトコルに従った。

<7> 塩基配列の決定

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)を使用して決定した。BigDye Terminator Kit のプレミックス溶液 4 μ l, 5×シーケンス緩衝液 2 μ l, DNA 400 ng, プライマー1.6 pmol を混ぜ、純水にて全量を 20 μ l として PCR 反応を行った。PCR 条件は、(96°C、10 秒→50°C、5 秒→60°C、4 分)×25 サイクルで行った。PCR 反応後、反応液をエタノール沈殿し、沈殿物を 70%エタノールで洗浄後乾燥させ、25 μ l のホルムアミド (Sigma 社)に溶解させ、溶解後 95°C、2 分間の熱変性後、氷上で急冷し、これを試料として ABI PRISM 310 Genetic Analyzer にて配列を決定した。データは、付属のソフトウェアにて解析を行った。

<8> オリゴヌクレオチドの合成

Sigma 社、Invitrogen 社、MRL 社に依頼して合成した。合成したオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

ヒト TRIM39 遺伝子クローニング用

HsTRIM39-sense	5'-ATTATGGCAGAGACAAGTCTG-3'
HsTRIM39-antisense	5'-CTGTCACTCCCAATCTGTTGG-3'

ヒト TRIM39 欠失遺伝子クローニング用

HsTRIM39 Δ RING-sense	5'-AAGACATCCCGCTACCGC-3'
HsTRIM39-antisense	5'-CTGTCACTCCCAATCTGTTGG-3'

ヒト Cactin 遺伝子クローニング用

HsCactin-sense	5'-AAAGAATTCATGGGTCTGGGACACACGCT-3'
HsCactin-antisense	5'-AAACTCGAGCCGTCACCGCCGATAGCGGTA-3'

ヒト TRIM39siRNA 用

siTRIM39-1 sense	5'-CCAAGGCGUUUCACCUUCUACCCUU-3'
siTRIM39-1 anti-sense	5'-AAGGGUAGAAGGUGAAACGCCUUGG-3'
siTRIM39-2 sense	5'-GGCAACUAGGCAGUAUGGUGGAAAU-3'
siTRIM39-2 anti-sense	5'-AUUUCACCAUACUGCCUAGUUGCC-3'
non-target siRNA-1	5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3'
non-target siRNA-2	5'-AUGAACGUGAAUUGCUCAA-3'

Real-time RT-PCR 用

human TRIM39 sense	5'-AAGGTGAAGACCATGGAGGTGACT-3'
human TRIM39 antisense	5'-TAGGTTAGGATGAGCTGTCTCAGGGT-3'
human Cactin sense	5'-TACACCAACACCGACAACCC-3'
human Cactin antisense	5'-TTCAGCTCCTTCTCCTCCAG-3'
human IL-6 sense	5'-AGCCACTCACCTCTTCAGAACGAATTGACA-3'
human IL-6 antisense	5'-AGCATCCATCTTTTTCAGCCATCTTTG-3'
human IL-8 sense	5'-TCCAAACCTTTCCACCCCAAATTTATCAA-3'
human IL-8 antisense	5'-GCCCTCTTCAAAAACCTTCTCCACAACCCTC-3'
human GAPDH sense	5'-GCAAATTCCATGGCACCGT-3'
human GAPDH antisense	5'-TCGCCCCACTTGATTTTGG-3'.

<9> PCR

(1) 遺伝子クローニング用 PCR

酵素は KODFX を使用した。各酵素における PCR 反応の組成は、以下の通りである。

KOD FX を利用した PCR 反応液組成 (総液量: 50 μ l)

テンプレート DNA	100 ng
各プライマー	各 0.3 μ M
2×PCR 緩衝液	25 μ l
dNTPs	各 0.4 mM
MgSO ₄	1 mM
KOD FX DNA polymerase	1 U
滅菌水	

ヒト TRIM39 cDNA の PCR 反応条件

酵素は KOD FX を使用した。

テンプレート DNA Human Prostate cDNA Library

5'プライマー HsTRIM39-sense

3'プライマー HsTRIM39-antisense

反応条件: (98°C、10 秒→74°C、2 分)×5 サイクル→
 (98°C、10 秒→72°C、2 分)×5 サイクル→
 (98°C、10 秒→70°C、2 分)×5 サイクル→
 (98°C、10 秒→68°C、2 分)×25 サイクル

ヒト Cactin cDNA の PCR 反応条件

酵素は KOD FX を使用した。

テンプレート HEK293T cDNA

5'プライマー HsCactin-sense

3'プライマー HsCactin-antisense

反応条件: (98°C、2 分→60°C、10 秒→68°C、30 秒)×35 サイクル

TRIM39 欠失変異体作製

ヒト TRIM39 欠失変異体(HsTRIM39ΔRING)は、作製した TRIM39 コンストラクトを
鋳型に PCR を行い、各種プラスミドベクターに組み込むことで作製した。酵素は
KODFX を使用した。

テンプレート ヒト TRIM39 コンストラクト

5'プライマー HsTRIM39ΔRING-sense

3'プライマー HsTRIM39-antisense

反応条件: (98°C、2 分→60°C、10 秒→68°C、30 秒)×35 サイクル

(3) Real-time PCR

Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社)を使用し、StepOne™
リアルタイム PCR システムにて検出を行った。データは、付属のソフトウェアにて解析し
た。また、テンプレートは別項の記述に従って作製した。PCR 反応液の組成および反
応条件を下に記す。

PCR 反応液組成: (総液量 10 μl)

テンプレート cDNA	1 μl
各プライマー	各 0.2 μl
Power SYBR green master mix	5 μl
滅菌水	

PCR 反応条件

(95℃、15 秒→60℃、1 分)×40 サイクル

<10> サブクローニング

(1) Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)処理ベクターDNA の調製

ベクターDNA を各制限酵素により完全に分解し、CIAP による 5'末端の脱リン酸化を行った。

(2) インサート DNA の調製

インサート DNA は、適宜、制限酵素処理、リン酸化処理を行い、低融点アガロースゲルで分離し、目的断片を回収して使用した。

(3) ライゲーション反応

上記で調製したベクターDNA とインサート DNA を、モル比で 1:5 となるように混合し、等量の 2×Ligation solution I (TaKaRa DNA ligation kit)を加え、16℃で 30 分静置した。

(4) 各コンストラクトの作製

pBS-TRIM39、pBS-TRIM39ΔR

前記 PCR で得られ、低融点アガロースゲルによって精製した PCR 産物を、EcoRV 及び CIAP で処理した pBS ベクターとライゲーションした。

pBS-Cactin

前記 PCR で得られた PCR 産物を、EcoRI 及び XhoI で処理し、低融点アガロースゲルによって回収精製し、EcoRI、XhoI 及び CIAP で処理した pBS ベクターとライゲーションした。

pBGK-TRIM39

pBS-TRIM39 を EcoRI 及び NotI で処理し、低融点アガロースゲルによって回収精製し、EcoRI、NotI 及び CIAP で処理した pBGK ベクターとライゲーションした。

pCRFLAG-TRIM39、pCRFLAG-TRIM39ΔR

pBS-TRIM39、pBS-TRIM39ΔR を EcoRI 及び XhoI で処理し、低融点アガロースゲルによって回収精製し、EcoRI、XhoI 及び CIAP で処理した pCRFLAG ベクターとライゲーションした。

pCDNA3myc-Cactin

pBS-Cactin を EcoRI 及び XhoI で処理し、低融点アガロースゲルによって回収精製し、EcoRI、XhoI 及び CIAP で処理した pCRFLAG ベクターとライゲーションした。

pFastBac-TRIM39

pBS-TRIM39 を BamH 及び XhoI で処理し、低融点アガロースゲルによって回収精製し、BamH 及び XhoI で処理した pFastBac ベクターとライゲーションした。

pFastBac-Cactin

pCDNA3myc-Cactin を EcoRI 及び XhoI で処理し、低融点アガロースゲルによって回収精製し、EcoRI 及び XhoI で処理した pFastBac ベクターとライゲーションした。

<11> タンパク質のポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

下表に示す組成の分離ゲル溶液を作製し、直ちに SDS-PAGE 用ガラス板に流し込み、イソプロパノールを重層した。アクリルアミドが固化した後、イソプロパノールを水洗し、濃縮用ゲル溶液を作製して分離ゲルの上に重層し、コームを刺してゲルを固化させた。泳動は SDS-PAGE 泳動緩衝液を用いて、100V の定電圧でおよそ 160 分を行った。

分離用ゲル溶液 (%)	16	14	12	10	8
30%アクリルアミド溶液 (ml)	4.00	3.50	3.00	2.50	2.00
DDW (ml)	1.55	2.05	2.55	3.05	3.55
1.5 M Tris pH 8.8 (ml)	1.88	1.88	1.88	1.88	1.88
10% SDS (μl)	75	75	75	75	75
20% APS (μl)	28.1	28.1	28.1	28.1	28.1
TEMED (μl)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5

濃縮用ゲル溶液

30%アクリルアミド溶液	0.40 ml
DDW	2.01 ml
0.5 M Tris pH 6.8	0.63 ml
10% SDS	25 μl
20% APS	12.5 μl
TEMED	2.5 μl

<12> クマシーブリリアントブルー (CBB)染色

泳動後、ゲルを CBB 染色液に室温で 30 分間浸した。その後純水で数回洗浄し、脱色液に浸し、背景と比べてタンパク質のバンドが鮮明になるまで洗浄を続けた。

<13> ウェスタンブロット解析

ウェットタイプの転写装置を用いた。PolyVinylidene DiFluoride(PVDF)膜をあらかじめメタノールに 1~2 分間浸した後に、転写緩衝液に濾紙と共に浸した。電気泳動後ゲルを取り出し、ウェスタンブロット装置の陽極から順に、スポンジ→濾紙→PVDF 膜→ゲル→濾紙→スポンジとなるように重ね、100 V の電圧で 120 分間転写した。転写後の PVDF 膜はブロッキング溶液に浸し、室温で 30 分間以上振盪した。ブロッキング後、TBST にて 5 回洗浄し、1 次抗体を TBST で希釈した 1 次抗体希釈液に浸し、4℃で一晩抗体反応を行った。抗体反応後、TBST で 5 分間×5 回洗浄し、2 次抗体を TBST で希釈した 2 次抗体希釈液に浸し、室温で 60 分間抗体反応を行った。TBST で 5 分間×5 回洗浄した後、ECL Western Blotting Detection Reagents にて化学発光反応を行い、X 線フィルムに露光して検出した。

<14> 細胞の継代培養

HEK293T 細胞、HeLa 細胞は CO₂ インキュベーター内で、5%CO₂、37℃の条件で培養した。培地には Fetal bovine serum (FBS)を 10%添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を使用した。Sf-9 細胞は CO₂ インキュベーター内で、5%CO₂、28℃の条件で振盪培養した。培地は、FBS を 10%添加した Sf900II を使用した。

継代は、70-90%コンフルエントとなった細胞の培地を吸引除去し、培地の約 1/4 量の PBS で洗浄した。洗浄後 PBS を吸引し、培地の約 1/10 量のトリプシン/EDTA 溶液を加えて 37℃、5 分間静置し、細胞が底面から剥離したことを顕微鏡観察により確認後、培地をトリプシン/EDTA 溶液の 10 倍量を加えて中和し、この細胞懸濁液の 1/10~1/20 量を、予め培地を分注しておいたディッシュに加え均一になるよう懸濁した。

<15> リン酸カルシウム法による細胞への遺伝子導入

遺伝子導入を行う細胞をあらかじめ 10-cm ディッシュに撒いておき、一晩程度培養した。1.5 ml チューブを 2 本用意し、片方に 2×HEPES buffer saline (HBS)を 500 µl 分注しておいた。もう一方のチューブに導入する遺伝子の DNA を 1~20 µg 分注し、438 µl となるように滅菌水を加え、さらに 2 M CaCl₂を 62 µl 加えてよく混ぜ、この DNA 混合液を 2×HBS が入ったチューブにゆっくりと滴下して混ぜた後、15 分間静置した後、細胞に滴下した。5% CO₂、37℃でおおよそ 6 時間の培養後、細胞の培地を新しい培地に交換し、さらに培養を続けた。

<16> リポフェクション法を用いた細胞への遺伝子導入

Roche 社の FuGENE®HD 試薬を用いた。遺伝子導入を行う細胞をあらかじめ 10-cm ディッシュまたは 24 穴プレートに撒いておき、一晚培養した。導入する遺伝子の DNA をそれぞれ 10 µg または 0.5 µg 分注し、さらに DMEM を 500 µl または 25 µl となるように添加した。この DNA 混合液に FuGENE®HD を 15 µl または 0.75 µl 添加し、15 分間静置した後、細胞に滴下した。5% CO₂、37℃で 6 時間の培養後、細胞の培地を新しい培地に交換し、さらに培養を続けた。

<17> 細胞溶解液の調製

細胞をディッシュよりトリプシン/EDTA 溶液またはセルスクレイパーにて剥離し、15 ml チューブに回収して 4℃、1,500×g、5 分間遠心し沈殿した細胞を 1 ml の PBS で懸濁し、1.5 ml チューブに移して 4℃、1,500×g、5 分間遠心し上清を除去した。直ちに細胞を溶解しない場合は、この状態で -80℃保存とした。溶解する場合、300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液または 150 mM NaCl 細胞溶解緩衝液を用い、細胞内タンパク質をなるべく網羅したい場合は、直接 1×SDS サンプル緩衝液を添加して細胞を氷上で溶解した。各緩衝液を加えて懸濁した後、超音波破碎機にて凝集塊が見えなくなるまで数秒間破碎後、15 分間氷上で静置した。1×SDS サンプル緩衝液を用いた場合はそのままヒートブロックにて 100℃、5 分間加熱し、使用時まで -20℃で保存した。それ以外の緩衝液を用いた場合は 4℃、16,200×g、15 分間遠心し上清を回収し、SDS-PAGE 用の試料を調製する場合は 1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100℃、5 分間加熱し、使用時まで -20℃で保存した。

<18> 免疫沈降実験

前項のような方法で得られた細胞溶解液について、全体の 1/20 量を全細胞溶解液 (Whole cell lysate; WCL) として別の 1.5 ml チューブに移し、その 1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100℃、5 分間加熱し、使用時まで -20℃で保存した。残りの溶解液に対し、1 µg の抗体を加え、4℃にて 1 時間、転倒混和した。この溶液に 20 µl の 50(v/v)% protein G sepharose 4 fast flow を加え、さらに 4℃にて 2 時間、転倒混和した。その後 4℃、16,200×g、30 秒間の遠心、上清除去と 1 ml の免疫沈降用洗浄緩衝液での懸濁を 5 回繰り返した後、30 µl の 1×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100℃、5 分間加熱し、使用時まで -20℃で保存した。免疫沈降の抗体に抗 FLAG 抗体、抗 Myc 抗体を用いた場合は、それぞれ 20 µl の 1×FLAG ペプチドまたは 1×Myc ペプチドを 250 µg/ml となるよう溶かした免疫沈降用洗浄緩衝液を加え、2 分毎に混和させながら氷上で 15 分間溶出させ、溶出液を回収し、さらにもう一度この操作を繰り返し、40 µl の溶出液を得た。この溶出液に対し、1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100℃、5 分間加熱し、使用時まで

-20℃で保存した。

<19> シクロヘキシミドを用いた細胞内タンパク質安定性実験

シクロヘキシミドは真核細胞のタンパク質翻訳阻害剤であり、転写翻訳の影響を排した状態での目的タンパク質の半減期を調べることができる。本研究では、シクロヘキシミド処理をした細胞を経時的に回収しそれぞれ細胞溶解液を調製し、目的のタンパク質に対してウェスタンブロット解析を行った。この際、半減期が観察する期間内よりも十分に長いタンパク質(本研究では GAPDH を用いた)を内部標準として同時にウェスタンブロット解析を行った。

(1) TRIM39WT、TRIM39 Δ RING 過剰発現での Cactin の分解実験

10-cm ディッシュ 3 枚に 30 %コンフルエント程度になるように前日に撒いておいた HEK293T 細胞に、pCRFLAG-TRIM39、pCRFLAG-TRIM39 Δ RING、pCRFLAG をそれぞれリン酸カルシウム法によってトランスフェクトした。6 時間後に培地を新しいものに交換し、48 時間後に回収し、50 μ g/mL となるようにシクロヘキシミドを加えた培地で懸濁し、4 つに分けて 35 mm ディッシュに分注した。分注後 0, 3, 6, 9 時間後に細胞を回収し細胞溶解液を調製して、抗 FLAG 抗体、抗 Cactin 抗体、抗 GAPDH 抗体によってウェスタンブロットを行った。

(2) TRIM39 のノックダウン状態での Cactin の分解実験

10-cm ディッシュ 3 枚に 30% コンフルエント程度になるように前日に撒いておいた HEK293T 細胞に、siTRIM39、もしくは non-targeting siRNA を lipofectamine RNAiMAX を用いてトランスフェクトした。6 時間後に培地を新しいものに交換し、48 時間後に回収し、50 μ g/mL となるようにシクロヘキシミドを加えた培地で懸濁し、4 つに分けて 35 mm ディッシュに分注した。分注後 0, 3, 6, 9 時間後に細胞を回収し細胞溶解液を調製して、抗 FLAG 抗体、抗 Cactin 抗体、抗 GAPDH 抗体によってウェスタンブロットを行った。

<20> デュアルルシフェラーゼアッセイ

Promega 社のデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステムを用いた。FBS を 10%となるよう添加した DMEM 中に HEK293T 細胞もしくは HeLa 細胞を懸濁し、24 穴プレートに 2×10^4 ずつ撒いた。翌日、p3 $\times$ PPRE-Luc および pGL4.74-hRLtk と共に、Cactin コンストラクト、もしくは siTRIM39 を 3 ウェルずつリポフェクション法によりトランスフェクトした。トランスフェクションの 6 時間後に培地を交換し、さらに 48 時間培養を継続した後、TNF α (最終濃度 20 ng/ml) もしくは Poly I:C (最終濃度 1 μ g/ml)を培地に追加して、それぞれ 6 時間、12 時間培養した。培地を除去し、Passive Lysis Buffer

(PLB)を 100 μ l 加え、室温で 15 分間振盪した。ルミノメーター用チューブを用意し、25 μ l の Luciferase Assay Reagent II (LARII)をあらかじめ分注しておき、ここに PLB にて溶解した細胞溶解液を 5 μ l 加え測定 (ルシフェラーゼシグナル)を行った。さらに、このチューブに 25 μ l の Stop & Glo Reagent を加え、2 回目の測定 (レニーラシグナル)を行い、以後、それぞれの細胞溶解試料に対し、同様の操作を行って測定した。(ルシフェラーゼシグナル) / (レニーラシグナル)をそれぞれの試料の値とし、さらに Cactin コンストラクトや siRNA が導入されておらず、TNF α もしくは Poly I:C 刺激が入っている試料を 1 として比を取り、相対化したデータを棒グラフに描いた。

<21> RNA の抽出

Isogen を用いて totalRNA を抽出した。細胞約 5×10^6 あたり、Isogen を 1 ml 加えホモジナイズし、室温で 5 分静置した。0.2 ml のクロロホルムを加え 15 秒間激しく撹拌しさらに 2 分間室温で静置した後、4 $^{\circ}$ C、12,000 $\times$ g、15 分間遠心し、水層を別の 1.5 ml チューブに移した。ここに 0.5 ml イソプロパノールを加え撹拌し、5 分間室温で静置した後、4 $^{\circ}$ C、12,000 $\times$ g、10 分間遠心し上清を廃棄した。沈殿に対し 70%エタノールを 1 ml 加え、4 $^{\circ}$ C、7,500 $\times$ g、5 分間遠心し上清を廃棄し、RNase フリーの滅菌水で溶かし、1 mg/ml もしくは 0.5 mg/ml に濃度を調製した。

<22> 逆転写反応

TOYOBO 社の ReverTra plus kit を用いて mRNA を鋳型に逆転写反応を行い、cDNA を合成した。まず下記のように反応溶液を作製し、65 $^{\circ}$ C、5 分間 RNA を熱変性させた後、氷上で急冷した。

10 μ l	RNase フリー滅菌水
1 μ l	Random Primer (25 pmol/ μ l)
1 μ l	Total RNA (1 mg/ml)

さらに下記のように各試薬を熱変性済み RNA に加え、下記の反応条件で逆転写反応を行った。

12 μ l	熱変性済み RNA
4 μ l	5 $\times$ 緩衝液
2 μ l	10 mM dNTPs
1 μ l	RNase inhibitor
1 μ l	ReverTra Ace

反応条件: 30 $^{\circ}$ C、10 分 $\rightarrow$ 42 $^{\circ}$ C、60 分 $\rightarrow$ 85 $^{\circ}$ C、5 分 $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C

<23> バキュロウイルス/昆虫細胞による His₆ タグ融合タンパク質の作製と精製

Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen 社)を用いて His₆ タグ融合タ

ンパク質を作製した。

(1) pFastBacHTa-TRIM39 もしくは、pFastBacHTa-Cactin で大腸菌 DH10Bac を形質転換し、*in vivo* 組換え反応を行った。青／白選択で白色コロニーを拾い、組換えバクミド DNA を調製した。

(2) バクミド DNA を 6-well プレートに 1×10^6 個撒いた Sf9 細胞へ FuGENE®HD を用いてトランスフェクトし、組換えウイルスの作製を行った。3 日後、組換えウイルスを含む培養上清を新たに T-25 フラスコに 1×10^6 個撒いた Sf9 細胞の上清と入れ替えて、ウイルスの増幅を行った。以後、3 日ごとに下記のようにスケールを上げながらウイルスの増幅を行った。 2×10^6 個の Sf9 細胞を撒いた 10-cm ディッシュからスケールを上げる際に、上清回収後に残った Sf9 細胞を別途回収し、細胞溶解液を調製後、抗 His タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行い、リコンビナント His₆ 融合 TRIM39 タンパク質もしくは His₆ 融合 Cactin タンパク質の発現を評価した。発現確認後、15-cm ディッシュ 10 枚までスケールアップし、Sf9 細胞を回収した。

培養スケール：

1×10^6 /6-well プレート → 1×10^6 /T-25 フラスコ → 2×10^6 /10-cm ディッシュ
→ 2×10^7 /15-cm ディッシュ → 2×10^7 /15-cm ディッシュ × 10

(3) 回収した Sf9 細胞を、4℃、 $5,000 \times g$ 、20 分間遠心し、沈殿物に対し、300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液 10 ml で溶解し、超音波破碎機で破碎し、超遠心機を用いて 4℃、 $40,000 \times g$ 、30 分間遠心し、上清を回収した。50%(v/v)の Probond resin を 2 ml ずつ加え 2 時間転倒混和した後、His₆ 結合用緩衝液 10 ml で 3 回洗浄し、さらに 50 mM イミダゾール含有 His₆ 結合用緩衝液 10 ml で 3 回洗浄した。その後、350 mM イミダゾール含有 His₆ 結合用緩衝液 1 ml で 3 回溶出した。溶出した試料で SDS-PAGE、CBB 染色を行い、His₆ 融合 TRIM39 タンパク質もしくは His₆ 融合 Cactin タンパク質の作製を評価した。

<24> 酵母ツーハイブリッド法

酵母ツーハイブリッド法は、レポーター遺伝子の転写活性を指標に 2 つのタンパク質間の相互作用を酵母内で検出するシステムである。ある遺伝子(bait)を DNA 結合蛋白(DNA-BD)と融合したものと、その遺伝子と相互作用すると考えられる遺伝子(pre)を転写活性化遺伝子(DNA-AD)と融合させたものの双方を酵母内で発現させ、酵母細胞内で bait と prey が相互作用をした場合のみ、酵母の染色体中に組み込んである bait の DNA 結合配列制御下にある栄養性機能遺伝子や lacZ 遺伝子の転写が活性化し発現することを利用している。本研究で用いた酵母株 L40 は、ヒスチジン栄養性機能遺伝子(HIS3)、ロイシン栄養性機能遺伝子(LEU2)、トリプトファン栄養性機能遺

伝子(TRP1)を欠損し、LexA オペロン下にヒスチジン栄養性機能遺伝子(HIS3)、リジン栄養性機能遺伝子(LYS2)、ウラシル栄養性機能遺伝子(URA3)、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)の各遺伝子が組み込まれている。また、bait ベクターである pBGK には TRP1 遺伝子が、cDNA ライブラリーに利用されている prey ベクター pACT2 には、LEU2 遺伝子がコードされ、それぞれの栄養要求性で形質転換体を選択することができる。本研究ではまず、ヒト TRIM39 遺伝子が大腸菌由来 DNA 結合タンパク質 LexA の DNA 結合ドメインと融合する配列で pBGK ベクターに組み込み酢酸リチウム法により L40 を形質転換させ、この形質転換体が prey ベクターの発現なしにレポーター遺伝子 LacZ の発現が誘導されていないことを β -ガラクトシダーゼアッセイによって確認した後、NIH3T3 細胞由来 cDNA ライブラリーでさらに形質転換させ、レポーター遺伝子が活性化したときのみ生育可能な選択培地にて撒いた。 β -ガラクトシダーゼアッセイにて LacZ の発現を誘導しているコロニーのみを選び、prey ベクターを抽出した。あらためてこの prey ベクターで L40 を形質転換させ、 β -ガラクトシダーゼアッセイにて prey ベクター単独で LacZ の発現が誘導されていないことを確認した上で、prey ベクターにコードされている cDNA の配列を DNA シークエンサーにて解読し、TRIM39 相互作用遺伝子を同定した。

E) 実験結果

1 TRIM39 結合タンパク質の同定

数多くの TRIM タンパク質が、NFκB などの免疫炎症シグナル伝達に関与していることが知られている²⁹。例えば、TRIM40 は IKKγ の Nedd8 化を促進し、NFκB を負に制御することが報告されている³⁷。また、TRIM59 は、ECSIT (evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways) と結合し、NFκB を負に制御する³⁸。前述のとおり、TRIM39 も免疫炎症シグナルへの関与が示唆されていたが、その機序については未だ不明であった。多くのタンパク質は他の分子との相互作用を介してその機能を発揮することが知られているので、本研究ではまず酵母2ハイブリッド法による TRIM39 に相互作用するタンパク質の探索を行った。

1-1 酵母2ハイブリッド法による TRIM39 結合タンパク質の検索

ヒト B 細胞 cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。形質転換効率は 2.3×10^5 クローンで、3つの陽性クローン(*Cactin*、*Vimentin*、*Influenza virus NS1A binding protein*)を得た。このうち *Cactin* は炎症免疫シグナルへの関与が報告されている遺伝子であったため³⁶、この遺伝子に注目して解析を進めることとした。

1-2 免疫沈降法による細胞内 TRIM39 と *Cactin* の相互作用解析

酵母2ハイブリッド法は偽陽性も多いことが知られているため、哺乳類細胞内における TRIM39 と *Cactin* の相互作用を確認する目的で、免疫沈降法による結合実験を行った。HEK293T 細胞に pCRFLAG-TRIM39 と pcDNA3Myc-*Cactin* をそれぞれ単独あるいは両方同時にトランスフェクトし、細胞溶解液を調製し、抗 Myc タグ抗体を用いて免疫沈降実験を行った(図1-1)。その結果、FLAG-TRIM39 と Myc-*Cactin* が細胞内で相互作用することを確認した。

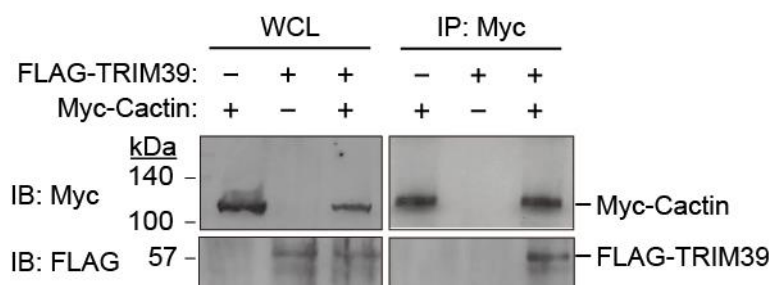


図1-1 *in vivo* での TRIM39 と *Cactin* の結合実験。HEK293T 細胞に pCRFLAG-TRIM39 と pcDNA3Myc-*Cactin* をそれぞれ単独あるいは両方同時にトラン

スフェクトし、抗 Myc タグ抗体を用いて免疫沈降実験を行った。

1-3 リコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降法による *in vitro* での TRIM39 と Cactin の相互作用解析

次に、TRIM39とCactinの直接相互作用の可能性を明らかにするために、*in vitro* での結合実験を行った。

まず、バキュロウイルス/昆虫細胞系を用いて FLAG-TRIM39 と GST-Cactin のリコンビナントタンパク質を作製した。緩衝液に FLAG-TRIM39 と GST-Cactin のリコンビナントタンパク質をそれぞれ単独あるいは両方同時に混合し、抗 FLAG タグ抗体を用いて免疫沈降実験を行った(図1-2)。その結果、FLAG-TRIM39とGST-Cactinが直接相互作用することが確認できた。

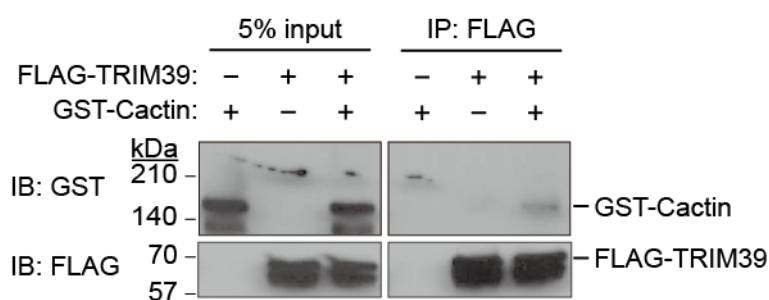


図1-2 *in vitro* での TRIM39 と Cactin の結合実験。緩衝液に FLAG-TRIM39 と GST-Cactin のリコンビナントタンパク質をそれぞれ単独あるいは両方同時に混合し、抗 FLAG タグ抗体を用いて免疫沈降実験を行った。

2 TRIM39 による Cactin の制御

ユビキチンの 48 番目のリジン残基(K48)を介したポリユビキチン化はプロテアソームへの輸送シグナルであることがわかっている。K48 ポリユビキチン化を受けたタンパク質はプロテアソームにより、選択的に分解される。TRIM39 はユビキチンリガーゼ活性を有することが報告されており²⁶、TRIM39 による Cactin タンパク質の半減期への影響及びユビキチン化修飾に関して検討した。

2-1 Cactin の半減期における TRIM39 の影響の検討

TRIM39 は Cactin の分解を促進し、半減期に影響すると仮説を立て、シクロヘキシミドを用いた細胞内タンパク質安定性実験を行った。まず、pCRFLAG-TRIM39、pCRFLAG-TRIM39 Δ R、pCRFLAG をそれぞれ HEK293T 細胞にトランスフェクトし、48 時間後に回収し、シクロヘキシミド存在下で、さらに 0, 3, 6, 9 時間培養した。細胞を回収し、抗 FLAG 抗体、抗 Cactin 抗体及び抗 GAPDH 抗体によってウェスタンブロット解析を行った。その結果、観察期間内では Cactin の半減期に変動はなく、安定であった(図2-1)。

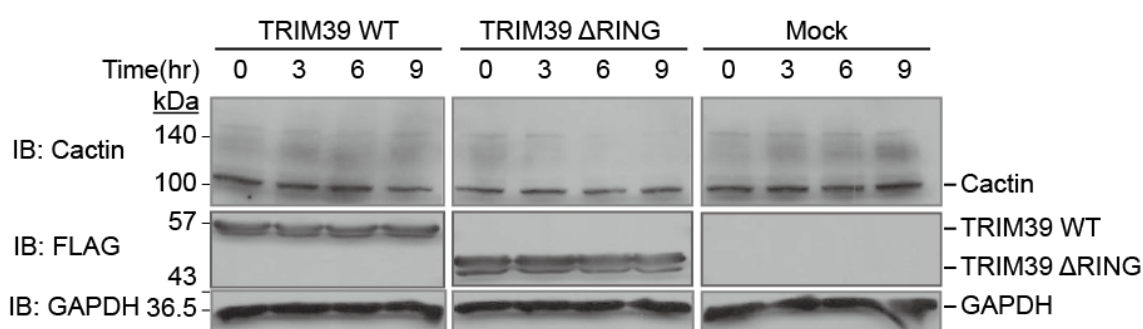


図2-1 シクロヘキシミドを用いた細胞内タンパク質安定性実験。HEK293T に TRIM39、TRIM39 Δ R を過剰発現させ、Cactin の半減期の変化をウェスタンブロット解析で確認した。コントロールとして、抗 GAPDH 抗体を使用した。

次に TRIM39 をノックダウンした細胞で、シクロヘキシミドを用いた細胞内タンパク質安定性実験を行った。siTRIM39、non-target siRNA をそれぞれ HEK293T 細胞にトランスフェクトし、48 時間後に回収し、一部を取り分けた上で、それぞれ4つに分割し、シクロヘキシミド存在下でさらに 0, 3, 6, 9 時間培養した。細胞を回収し、抗 TRIM39 抗体、抗 Cactin 抗体、抗 GAPDH 抗体によってウェスタンブロット解析を行った。その結果、コントロールに比べ、siTRIM39 群では、内因性の Cactin が経時的に減少することが確認された(図2-2、3)。このことから、TRIM39 は Cactin タンパク質を安定化する

活性を有すると考えられた。

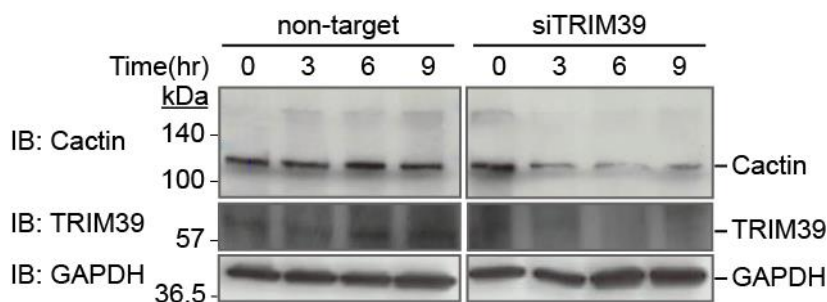


図2-2 TRIM39 をノックダウンした細胞での細胞内タンパク質安定性実験。TRIM39 をノックダウンした HEK293T で、Cactin の半減期の変化をウェスタンブロット解析で確認した。コントロールとして、抗 GAPDH 抗体を使用した。

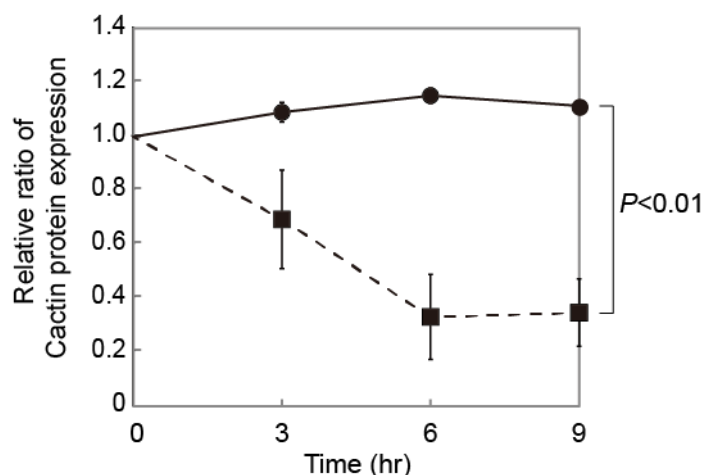


図2-3 TRIM39 をノックダウンした細胞での細胞内タンパク質安定性実験。独立の実験を3回行い、それぞれのバンドを GAPDH で標準化し、0 hr の値に対する相対値としてグラフ化した。破線は TRIM39 をノックダウンした細胞を、実線はコントロール細胞を表す。

2-2 TRIM39 による Cactin のユビキチン化修飾の検討

TRIM39 は Cactin を安定化させる結果より、TRIM39 による Cactin の 48 番目のリジン残基を介したポリユビキチン化修飾は促進されていないことが推測された。そこで、63 番目のリジン残基を介したポリユビキチン化や直鎖状ユビキチン鎖など、タンパク質分解以外のシグナルとして働くユビキチン化修飾が関与する可能性を検討するため、TRIM39 による Cactin のユビキチン化に関する生化学的解析を行った。ATP 存在下に

において、リコンビナントユビキチン、リコンビナント E1、E2 と、リコンビナント TRIM39、リコンビナント Cactin を混合し、37℃で 30 分間静置し、抗ユビキチン抗体、抗 Cactin 抗体、抗 FLAG タグ抗体によるウェスタンブロット解析を行った(図2-4)。その結果、TRIM39 の自己ユビキチン化は確認されたが、Cactin のユビキチン化シグナルの促進は確認されず、TRIM39 は Cactin のユビキチン化に影響を与えないことが示唆された。

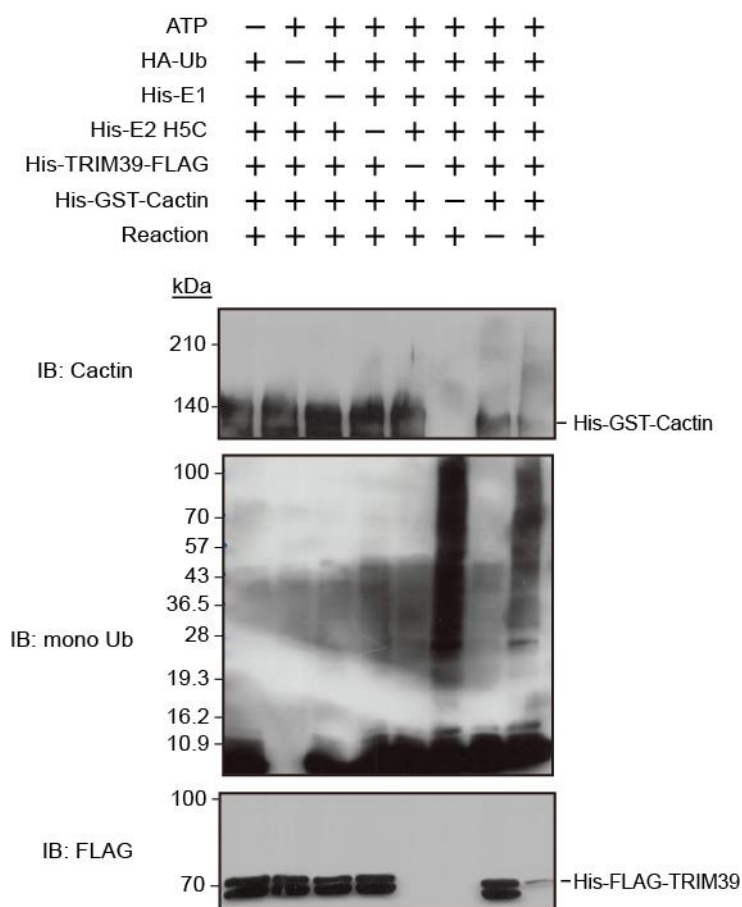


図2-4 *in vitro* ユビキチン化アッセイ。ユビキチン化反応を構成する因子である、ATP、ユビキチン、E1、E2、E3 (TRIM39)、基質タンパク質(Cactin)を混合し、37℃で 30 分静置した。ユビキチン化反応を構成する因子を 1 つずつ欠いたサンプルを比較対象とした。

3 NFκB シグナルにおける Cactin の機能の検討

前述のとおり、Cactin は NFκB の制御因子の一つとして報告されている³⁶。上記の実験結果から、TRIM39 は Cactin を介して NFκB シグナルの制御に関連するという仮説を立てた。この仮説の検証のため、まず、NFκB シグナルにおける Cactin の機能を評価した。

3-1 Cactin は NFκB シグナルを負に制御する

Cactin が実際に NFκB シグナルを制御しているかを確認するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイによる評価を行った。NFκB 応答配列の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミド(NAT-Luc)を用いて、Cactin を導入した HEK293T 細胞にてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、Cactin を過剰発現させた細胞で、TNFα 刺激による NFκB 活性化が抑制された(図3-1)。

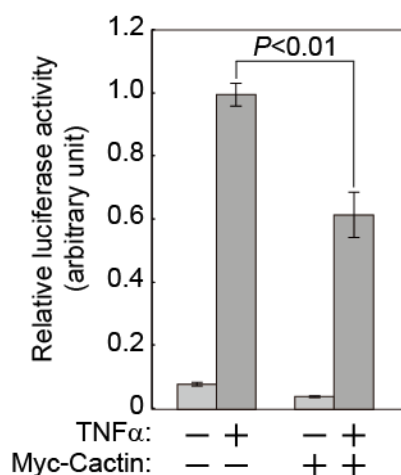


図3-1 Cactin の過剰発現は TNFα 刺激による NFκB 活性を抑制する。Cactin を過剰発現させた HEK293T 細胞を TNFα で刺激し、NFκB レポータープラスミド(NAT-Luc)を用いたルシフェラーゼアッセイで NFκB 活性を評価した。

3-2 TNFα 刺激は Cactin 遺伝子の転写を誘導する

NFκB シグナル伝達経路には、いくつかのネガティブフィードバックが存在することが知られているが、その一つに IκBα を介したネガティブフィードバックがある。すなわち、IκBα は NFκB の核移行シグナルをマスクし NFκB を負に制御するが、NFκB の標的遺伝子として発現が誘導される。新たに発現した IκBα は、活性化した NFκB の核外移行を促進し不活性化する³⁹。このように IκBα はネガティブフィードバックを形成する

ことで、炎症反応の収束に関与すると考えられている。Cactin も NF κ B シグナルの抑制因子であることから、Cactin および Cactin と相互作用する TRIM39 も NF κ B 活性化により発現が誘導されるのではないかという仮説を立てた。HEK293T 細胞を TNF α で刺激し、細胞を回収し、リアルタイム PCR 法にて TRIM39 と Cactin の mRNA をコントロール (TNF α 刺激なし) の細胞と比較したところ、Cactin の mRNA が TNF α 刺激によって増加することが確認された (図3-2)。

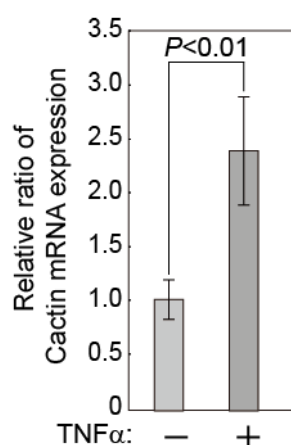


図3-2 TNF α 刺激による Cactin mRNA の発現変動。HEK293T 細胞を TNF α で刺激し、リアルタイム PCR 法で Cactin mRNA を検出した。

一方、TRIM39 の mRNA の発現に関して有意な変化が見られなかった (図3-3)。

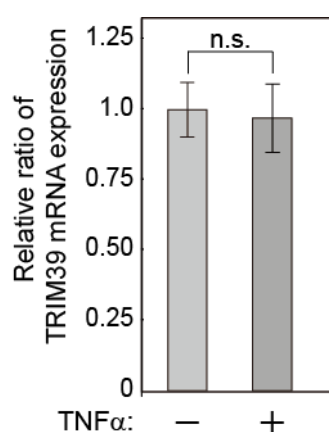


図3-3 TNF α 刺激による TRIM39 mRNA の変動。HEK293T 細胞を TNF α で刺激し、リアルタイム PCR 法で TRIM39 mRNA を検出した。

次に、タンパク質レベルでの Cactin の変動を検討するために、同様の条件で刺激

した細胞をウェスタンブロット法にて評価したところ、TNF α 刺激によって Cactin タンパク質の発現量の増加することが確認された(図3-4、5)。

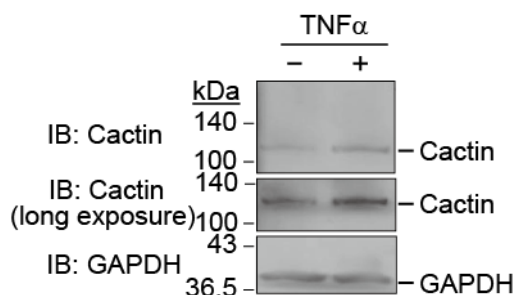


図3-4 TNF α 刺激による Cactin タンパク質の変動。HEK293T 細胞を TNF α で刺激し、Western blot 法で Cactin タンパク質量の変動を評価した。

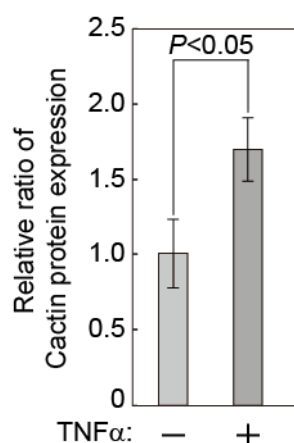


図3-5 TNF α 刺激による Cactin タンパク質の変動。独立の実験を3回行い、それぞれのバンドを GAPDH で標準化し、TNF α 刺激なしの Cactin の値に対する相対値としてグラフ化した。TNF α 刺激によってタンパク質レベルでも Cactin は増加していた。

Cactin は TNF α 刺激による NF κ B 活性化を抑制する一方で、TNF α 刺激により発現が誘導された。これらの結果をまとめると、Cactin を介したネガティブフィードバックが存在すると考えられた(図3-6)。

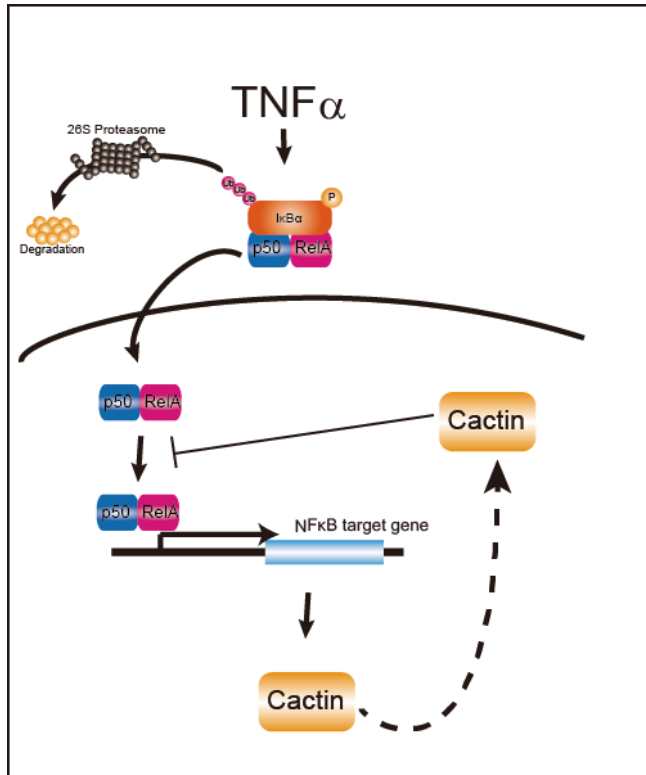


図3-6 Cactinを介したNFκBシグナルのネガティブフィードバックシステム。TNFα 刺激により発現誘導される Cactin は、NFκB 活性を負に制御する。

4 TRIM39 による NFκB シグナル制御

4-1 TRIM39 による NFκB シグナル制御

次に、TRIM39 が NFκB シグナルの活性化に与える影響を、ルシフェラーゼアッセイにて評価した。まず、RNAi によって TRIM39 をノックダウンした HeLa 細胞にて(図4-1)、前述の NFκB レポータープラスミド(NAT-Luc)を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TRIM39 をノックダウンさせた細胞では、TNFα 刺激による NFκB 活性の亢進が認められた(図4-2)。

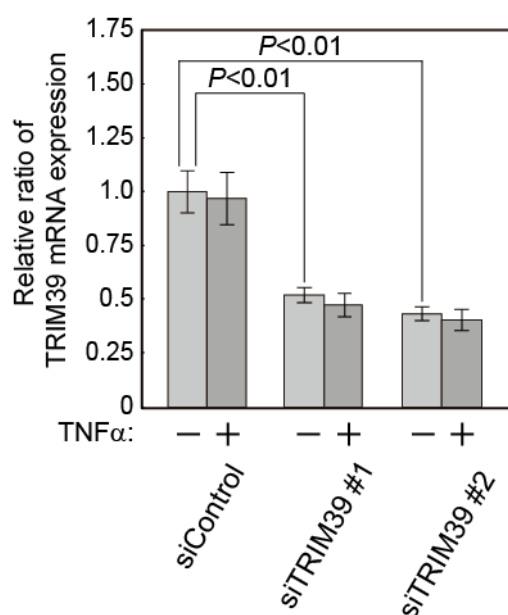


図4-1 RNAi 法による TRIM39 のノックダウン。TRIM39 をノックダウンした HeLa 細胞を回収し、リアルタイム PCR 法で、TRIM39 の mRNA を評価した。TNFα 刺激の有無にかかわらず、2 種類の siRNA で TRIM39 がノックダウンされていることを確認した。

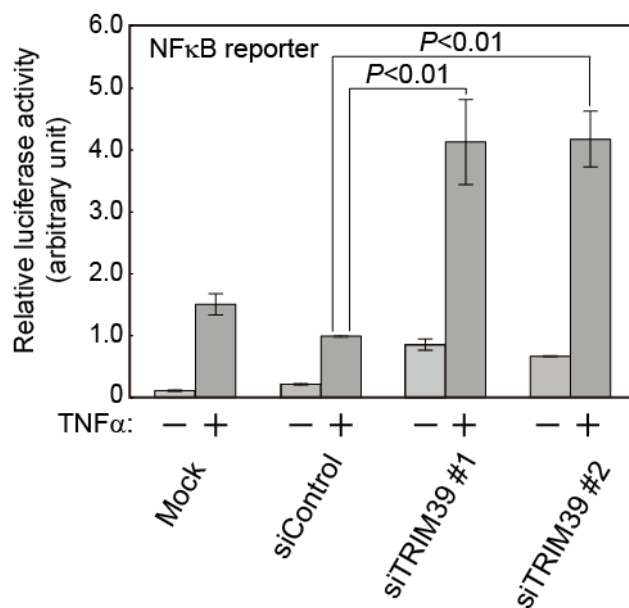


図4-2 TRIM39 のノックダウンは、TNF α 刺激による NF κ B 活性を亢進させる。NF κ B レポータープラスミド(NAT-Luc)を用いて、TNF α 刺激による NF κ B 活性をルシフェラーゼアッセイで評価した。

また、同様の NF κ B 活性の亢進が、Poly I:C 刺激によっても確認された(図4-3)。

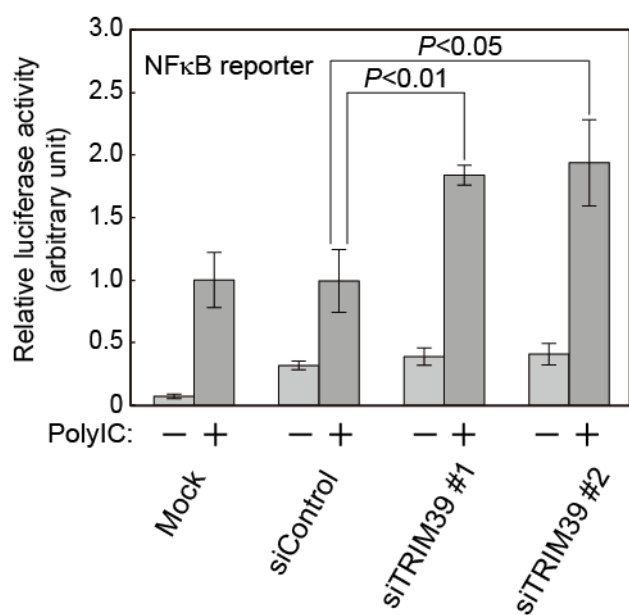


図4-3 TRIM39 のノックダウンは、Poly I:C 刺激による NF κ B 活性を亢進する。

NFκB レポータープラスミドを用いて、Poly I:C 刺激による NFκB 活性をルシフェラーゼアッセイで評価した。

さらに、他の自然免疫シグナルへの TRIM39 の影響を確認するために、ISRE 配列の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミド(ISRE-Luc)を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。TRIM39 をノックダウンすると、Poly I:C 刺激による自然免疫シグナルが亢進することが確認された(図4-4)。

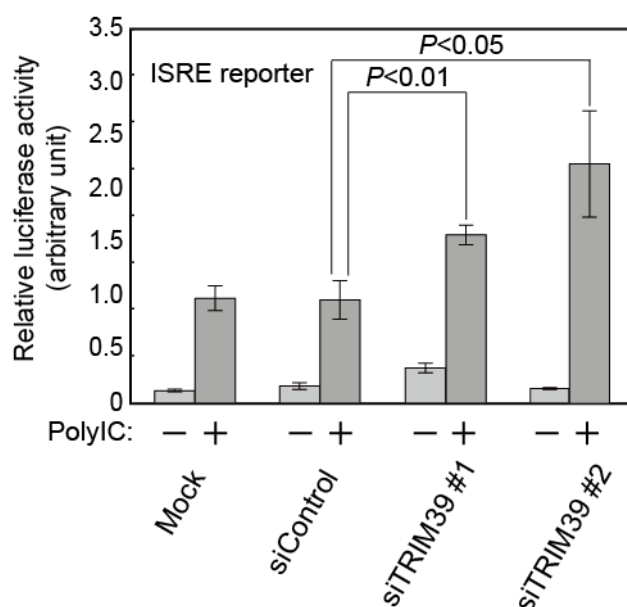


図4-4 TRIM39 のノックダウンは、Poly I:C 刺激による自然免疫シグナルを亢進させる。ISRE レポータープラスミドを用いて、Poly I:C 刺激による自然免疫シグナルをルシフェラーゼアッセイで評価した。

次に、TRIM39 が NFκB シグナルの下流遺伝子に与える影響を確認するために、NFκB の代表的な下流遺伝子である IL-6 と IL-8 の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法にて確認した。TRIM39 をノックダウンすると、TNFα 刺激による IL-6 と IL-8 の mRNA の転写が促進されることが明らかとなった(図4-5, 6)。これらの結果からは、TRIM39 は NFκB を負に制御していると考えられた。

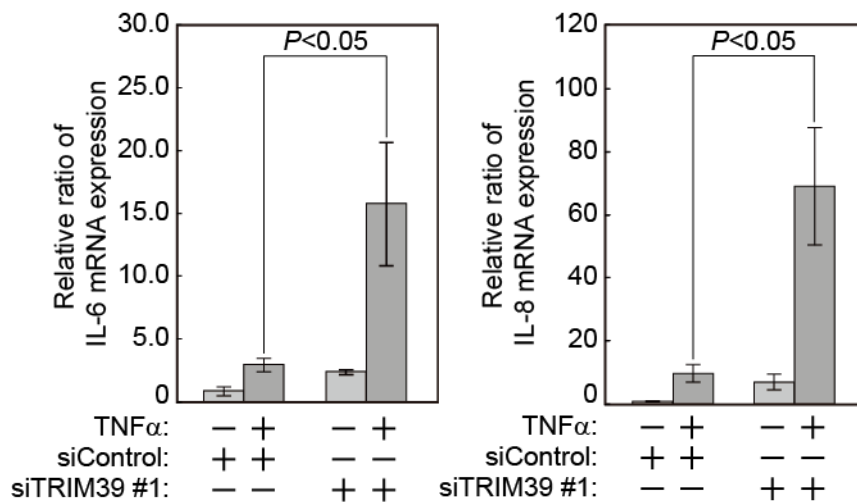


図4-5, 6 TRIM39 をノックダウンすると、TNF α 刺激による IL-6 と IL-8 の mRNA の転写が促進する。TRIM39 をノックダウンした HeLa 細胞に TNF α 刺激を与え、リアルタイム PCR 法で IL-6 と IL-8 の mRNA の発現量を測定した。

4-2 TRIM39 は Cactin を介して NF κ B を負に制御する。

前述のとおり、TRIM39 は Cactin と相互作用し安定化させる。また、TRIM39 と Cactin はともに NF κ B を負に制御する。これらの結果から、TRIM39 は、Cactin タンパク質の安定化を介して NF κ B を負に制御するという仮説を立てた。もしこの仮説が正しいければ、TRIM39 のノックダウンによって亢進した NF κ B 活性は、TRIM39 ノックダウンによって不安定化した Cactin タンパク質の補充によって抑制されることが想定される。そこで TRIM39 をノックダウンした HEK293T 細胞に、さらに Cactin を過剰発現させ、TNF α 刺激による NF κ B 活性をルシフェラーゼアッセイで評価した。Cactin を過剰発現させた細胞では、TRIM39 がノックダウンされているにもかかわらず、NF κ B 活性は抑制された(図4-7)。これらのことから、NF κ B シグナルにおいて Cactin は TRIM39 の下流で機能し、かつ TRIM39 の NF κ B 制御は Cactin の安定化に起因するものと考えられた。

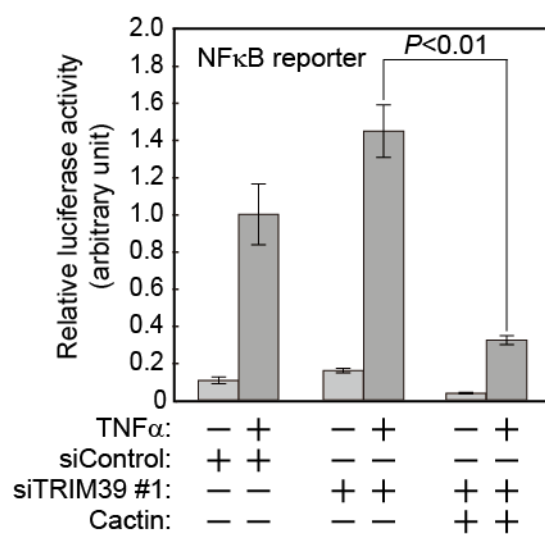


図4-7 TRIM39のノックダウンによって亢進したNFκB活性は、Cactinの過剰発現によって抑制される。TRIM39をノックダウンさせた細胞に、Cactinを過剰発現させ、TNFα刺激によるNFκB活性をルシフェラーゼアッセイで行った。

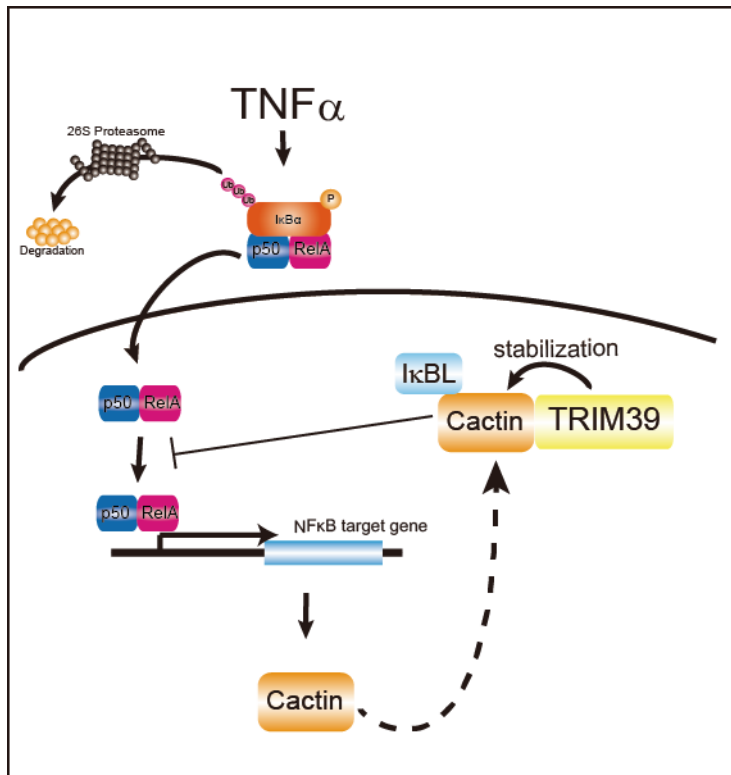


図4-8 TRIM39 は Cactin の安定化を介し NF κ B シグナルを負に制御している。

F) 考察

本研究において、TRIM39と相互作用するタンパク質としてCactinを同定した。またTRIM39はCactinの安定化に関与すること、さらにはTRIM39はCactinを介してNFκB活性を負に制御していることが明らかになった。

CactinはNFκBの制御因子の一つであることが報告されている³⁶。ショウジョウバエにおいて、CactinはヒトIκBαのオルソログであるCactusと結合するが、ヒトCactinは、IκBαとは結合せずIκBLと結合する³⁶。IκBL遺伝子は、TRIM39遺伝子と同様、6番染色体のMHC領域に位置する³⁶。Cactinは、他にもMHC領域の遺伝子にコードされるタンパク質、LST1やNELF-Eと相互作用する⁴⁰。TRIM39はCactinと共に他のタンパク質と結合し、より大きな複合体として機能している可能性も考えられる。

一方で、本研究ではTRIM39によるCactinのユビキチン化修飾については確認できなかった。TRIMタンパク質はそのユビキチンリガーゼ活性から、K48型ポリユビキチン鎖生成を介してタンパク質分解に関与しているが、いくつかのTRIMタンパク質では結合タンパク質の安定化作用を持つことがわかっている。実際、TRIM39は、MOAP-1が他のE3によってユビキチン化されることを競合的に阻害することで、その安定化に寄与するという報告がある²⁵。また、RET Finger Protein (RFP)としても知られるTRIM27は、EID-1(Retinoblastoma proteinの制御因子)を安定化することが知られている⁴¹。TRIM39はCactinに対しても、ユビキチン化以外の機序によって安定化しているものと考えられた。

NFκBはさまざまな標的遺伝子の転写を促進するが、その中にはIκBα、A20やMyD88sなどのようにNFκB活性化を負に制御し、ネガティブフィードバックを形成する因子が存在する。脱ユビキチン化酵素であるA20は、NFκBシグナルにおいて、TRAF6やRIP1を脱ユビキチン化することでNFκBシグナルの抑制因子として働いている^{42,43}。また、Myd88sは、Myd88と競合的にIRAK4と結合することで、NFκBシグナルを抑制している。このように、複数のネガティブフィードバック経路が協調して、NFκB活性化を厳密に制御し、炎症の終息に関与する。CactinはTNFα刺激によるNFκB活性化を抑制する一方で、TNFα刺激により発現が誘導されることから、CactinもまたNFκBシグナルにおけるネガティブフィードバック経路の一翼を担うものと考えられた。ただし、CactinやIκBLによるNFκB制御の詳細な機序は未だ不明であり、さらなる分子レベルの検討が必要である。

TRIM39遺伝子のエキソン内に存在するSNPがベーチェット病の発症に関連していることがGWAS解析で明らかになっている³¹。ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症疾患で、特定の内的遺伝素因のもとに何らかの外的環境要因が働いて発症する多因子疾患と考えられている⁴⁴。ベーチェッ

ト病では免疫応答の亢進が報告されていること⁴⁵、本研究において TRIM39 のノックダウンで少なくとも一部の免疫シグナルが亢進していたことを踏まえると、TRIM39 遺伝子内の SNP は TRIM39 遺伝子の発現減少を介して発症の一因となっている可能性が示唆された。また、I κ BL は関節リウマチ、高安病、潰瘍性大腸炎、SLE、シェーグレン症候群、I 型糖尿病、多発性硬化症などの自己免疫炎症性疾患⁴⁶⁻⁵¹との関連が知られている。TRIM39、Cactin、I κ BL の機能不全は、これらの炎症性疾患の発症に関連している可能性があり、これらの分子の生化学的解析を進めることで、炎症性疾患の病態の解明、新規治療法の開発に結びつく可能性がある。

G) 総括および結論

1 得られた新知見

- TRIM39 の相互作用タンパク質として Cactin を同定した。
- TRIM39 が Cactin の安定化に寄与していた。
- Cactin は TNF α 刺激によって発現が亢進する。
- Cactin は NF κ B シグナルにおいてネガティブフィードバック経路を形成する。
- TRIM39 は NF κ B シグナルを負に制御する。

2 新知見の意義

ベーチェット病では免疫応答の亢進が報告されていることや、本研究において TRIM39 のノックダウンで少なくとも一部の免疫シグナルが亢進していたことを踏まえ、TRIM39 遺伝子内の SNP は TRIM39 遺伝子の発現減少を介してベーチェット病発症の一因となっている可能性が示唆される。ベーチェット病では、診断の決め手となる検査は未だ存在せず、臨床所見と生化学検査、病理組織検査などを総合的に判断することで診断しているが、TRIM39 による客観的な診断を確立する必要がある。また、ベーチェット病の他にも、IkBL は関節リウマチ、高安病、潰瘍性大腸炎、SLE、シェーグレン症候群、I 型糖尿病、多発性硬化症などの自己免疫炎症性疾患⁴⁶⁻⁵¹との関連が知られており、TRIM39、Cactin や IkBL は、これらの疾患の診断や治療標的となる可能性がある。

3 今後の研究展開と課題

TRIM39 による Cactin 安定化の詳細な機序は不明である。また、Cactin、IkBL による NF κ B シグナルの活性化制御メカニズムも未知のままであり、今後の解明が必要である。また、TRIM39 の個体における役割を検討することも重要であるので、今後 TRIM39 ノックアウトマウスにおける個体レベルでの炎症症状などの解析が必要となる。

H) 謝辞

このような機会を与えてくださった北海道大学医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科分野福田諭教授、医化学分野畠山鎮次教授に厚く御礼を申し上げます。学ばせていただいたさまざまなことを、今後活かしていきたいと思います。

また、医化学分野の方々にも大変お世話になりました。特に、渡部昌助教、高橋秀尚助教、築山忠雄助教には、実験に関するさまざまなことを丁寧にご指導いただき、感謝申し上げます。秘書の惣伊田ゆり氏、内海美穂氏、技術補助員の八重樫麻衣氏、松尾みすみ氏や大学院生の先生方にはさまざまなことにおいて支えて頂き感謝申し上げます。

さらに、耳鼻咽喉科・頭頸部外科の医局員からも多大なるサポートを頂きました。実験結果に関しての議論、国内国外での発表の場を与えて頂いたことを感謝しております。

最後になりましたが、忙しい日々の中、勉学の機会を与えてくれ、生活を支えてくれた家族に感謝し、筆を置きたいと思います。

2014 年 11 月
鈴木 正宣

D) 引用文献

- 1 Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes. Dev.* **18**, 2195-2224(2004).
- 2 Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362(2008).
- 3 Chen, Z. J., Parent, L. & Maniatis, T. Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* **84**, 853-862(1996).
- 4 Hatakeyama, S. *et al.* Ubiquitin-dependent degradation of IkappaBalpha is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul 1/F-box protein FWD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3859-3863(1999).
- 5 Li, Y., Gazdaru, S., Pan, Z. Q. & Fuchs, S. Y. Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate. *J. Biol. Chem.* **279**, 11074-11080(2004).
- 6 Kanayama, A. *et al.* TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol. Cell* **15**, 535-548(2004).
- 7 Rahighi, S. *et al.* Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* **136**, 1098-1109(2009).
- 8 Peters, J. M. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell. Biol* **10**, 759-768(1998).
- 9 Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem* **67**, 425-479(1998).
- 10 Scheffner, M., Nuber, U. & Huibregtse, J. M. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**, 81-83(1995).
- 11 Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem* **258**, 8206-8214(1983).
- 12 Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S. & Howley, P. M. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2563-2567(1995).
- 13 Freemont, P. S. RING for destruction? *Curr. Biol* **10**, R84-87(2000).
- 14 Joazeiro, C. A. & Weissman, A. M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-552(2000).
- 15 Lorick, K. L. *et al.* RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11364-11369(1999).

- 16 Aravind, L. & Koonin, E. V. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr. Biol* **10**, R132-134(2000).
- 17 Cyr, D. M., Hohfeld, J. & Patterson, C. Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends. Biochem. Sci* **27**, 368-375(2002).
- 18 Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. & Nakayama, K. I. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem* **276**, 33111-33120(2001).
- 19 Reymond, A. *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo. j* **20**, 2140-2151(2001).
- 20 Meroni, G. & Diez-Roux, G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* **27**, 1147-1157(2005).
- 21 Nisole, S., Stoye, J. P. & Saib, A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol* **3**, 799-808(2005).
- 22 Kano, S., Miyajima, N., Fukuda, S. & Hatakeyama, S. Tripartite motif protein 32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2. *Cancer. Res* **68**, 5572-5580(2008).
- 23 Avela, K. *et al.* Gene encoding a new RING-B-box-Coiled-coil protein is mutated in mulibrey nanism. *Nat. Genet* **25**, 298-301(2000).
- 24 Hatakeyama, S. TRIM proteins and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 792-804(2011).
- 25 Lee, S. S. *et al.* TRIM39 is a MOAP-1-binding protein that stabilizes MOAP-1 through inhibition of its poly-ubiquitination process. *Exp. Cell. Res* **315**, 1313-1325(2009).
- 26 Zhang, L., Huang, N. J., Chen, C., Tang, W. & Kornbluth, S. Ubiquitylation of p53 by the APC/C inhibitor Trim39. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **109**, 20931-20936(2012).
- 27 Orimo, A. *et al.* Molecular cloning of testis-abundant finger Protein/Ring finger protein 23 (RNF23), a novel RING-B box-coiled coil-B30.2 protein on the class I region of the human MHC. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **276**, 45-51(2000).
- 28 Horton, R. *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet* **5**, 889-899(2004).
- 29 Versteeg, G. A. *et al.* The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity* **38**, 384-398(2013).
- 30 Kurata, R., Tajima, A., Yonezawa, T. & Inoko, H. TRIM39R, but not TRIM39B, regulates type I interferon response. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **436**, 90-95(2013).
- 31 Kurata, R. *et al.* TRIM39 and RNF39 are associated with Behcet's disease

- independently of HLA-B *51 and -A *26. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **401**, 533-537(2010).
- 32 Lin, P., Huang, L. H. & Steward, R. Cactin, a conserved protein that interacts with the Drosophila IkappaB protein cactus and modulates its function. *Mech. Dev* **94**, 57-65(2000).
- 33 Atzei, P., Yang, F., Collery, R., Kennedy, B. N. & Moynagh, P. N. Characterisation of expression patterns and functional role of Cactin in early zebrafish development. *Gene. Expr. Patterns* **10**, 199-206(2010).
- 34 Tannoury, H. *et al.* CACN-1/Cactin interacts genetically with MIG-2 GTPase signaling to control distal tip cell migration in *C. elegans*. *Dev. Biol* **341**, 176-185(2010).
- 35 LaBonty, M. *et al.* CACN-1/Cactin Plays a Role in Wnt Signaling in *C. elegans*. *PLoS. One* **9**, e101945(2014).
- 36 Atzei, P., Gargan, S., Curran, N. & Moynagh, P. N. Cactin targets the MHC class III protein IkappaB-like (IkappaBL) and inhibits NF-kappaB and interferon-regulatory factor signaling pathways. *J. Biol. Chem* **285**, 36804-36817(2010).
- 37 Noguchi, K. *et al.* TRIM40 promotes neddylation of IKKgamma and is downregulated in gastrointestinal cancers. *Carcinogenesis* **32**, 995-1004(2011).
- 38 Kondo, T., Watanabe, M. & Hatakeyama, S. TRIM59 interacts with ECSIT and negatively regulates NF-kappaB and IRF-3/7-mediated signal pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **422**, 501-507(2012).
- 39 Arenzana-Seisdedos, F. *et al.* Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol* **15**, 2689-2696(1995).
- 40 Lehner, B. *et al.* Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region. *Genomics* **83**, 153-167(2004).
- 41 Krutzfeldt, M. *et al.* Selective ablation of retinoblastoma protein function by the RET finger protein. *Mol. Cell* **18**, 213-224(2005).
- 42 Boone, D. L. *et al.* The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat. Immunol* **5**, 1052-1060(2004).
- 43 Wertz, I. E. *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**, 694-699(2004).
- 44 Sakane, T., Takeno, M., Suzuki, N. & Inaba, G. Behcet's disease. *N. Engl. J. Med* **341**, 1284-1291(1999).
- 45 Kirino, Y. *et al.* Targeted resequencing implicates the familial Mediterranean fever

- gene MEFV and the toll-like receptor 4 gene TLR4 in Behcet disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 8134-8139(2013).
- 46 Okamoto, K. *et al.* Identification of I kappa BL as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet* **72**, 303-312(2003).
- 47 Shibata, H. *et al.* Direct determination of single nucleotide polymorphism haplotype of NFKBIL1 promoter polymorphism by DNA conformation analysis and its application to association study of chronic inflammatory diseases. *Hum. Immunol* **67**, 363-373(2006).
- 48 de la Concha, E. G. *et al.* Susceptibility to severe ulcerative colitis is associated with polymorphism in the central MHC gene IKBL. *Gastroenterology* **119**, 1491-1495 (2000).
- 49 Castiblanco, J. & Anaya, J. M. The IkappaBL gene polymorphism influences risk of acquiring systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Hum. Immunol* **69**, 45-51(2008).
- 50 Yamashita, T. *et al.* IKBL promoter polymorphism is strongly associated with resistance to type 1 diabetes in Japanese. *Tissue. Antigens* **63**, 223-230(2014).
- 51 Mitterski, B. *et al.* Inhibitors in the NFkappaB cascade comprise prime candidate genes predisposing to multiple sclerosis, especially in selected combinations. *Genes. Immun* **3**, 211-219(2002).