

学位論文題名

TRIMタンパク質による細胞機能制御

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

TRIM ファミリータンパク質は RING ドメインを有するユビキチンリガーゼであり、転写制御や細胞死、細胞増殖といった広範囲に渡る細胞機能に関わり、その変異は、発達障害、神経変性疾患、ウイルス感染、癌などの多様な疾患と関連している。TRIM タンパク質のうち、Promyelocytic leukaemia (PML/TRIM19) 遺伝子座は、Retinoic acid receptor- α (RAR α) との転座により、PML-RAR α 融合タンパク質を産生し、急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia/APL) を引き起こす。ある種の骨髄異形成症候群においては、TRIM24 と fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) との転座が認められる。また、TRIM19、TRIM24、TRIM25、TRIM68 は、RAR α を始めとした核内受容体の活性を制御し、白血病や乳癌および前立腺癌の進行を制御している。さらに、TRIM13、TRIM19、TRIM24、TRIM28、TRIM29 は、最も重要な癌抑制遺伝子の 1 つである p53 の安定性や転写活性を制御している。

このように TRIM タンパク質はさまざまな細胞機能や疾患原因に関わっていることが報告されているが、未だ十分な解析がなされていない。本研究では TRIM タンパク質のさまざまな生理学的機能を解明していくことを目的とした。

まず、癌の制御に関わる可能性のある TRIM タンパク質として TRIM31 に注目し、分子レベル、細胞レベルにおける機能を解析した。次に、核内受容体の 1 つである Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) のシグナルを制御する TRIM タンパク質を検索し、リガンド依存性 PPAR γ シグナル活性化因子として TRIM23 を同定し、脂肪細胞分化時における機能を解析した。

【材料と方法】

<1> 酵母ツーハイブリッド法による TRIM31 相互作用分子の検索

TRIM31 cDNA を bait ベクターに組み込み、NIH3T3 細胞由来 cDNA ライブラリーと共に酵母株 L40 を形質転換させ、相互作用分子を検索した。

<2> 軟寒天培地でのコロニー形成アッセイ

活性型 c-Src(Y527F)、TRIM31 共安定発現 NIH3T3 細胞を樹立し、軟寒天培地中で 2 週間培養した後に、直径 0.1 mm 以上となった細胞塊の数を計測した。

足場非依存性細胞増殖能を、ことにより評価した

<3> デュアルルシフェラーゼアッセイによる PPAR γ シグナル制御 TRIM タンパク質の検索
HeLa 細胞に PPAR γ コンストラクト、PPAR γ シグナルのレポーター、内部標準レポーターと共に

に TRIM コンストラクトを導入し、24 時間後 Troglitazone または DMSO を添加し、さらに 24 時間培養した後ルシフェラーゼアッセイを行い、PPAR γ シグナルを制御する TRIM タンパク質を検索した。

<4> 3T3-L1 細胞の分化誘導

TRIM23 を安定発現する 3T3-L1 細胞、またはノックダウンした 3T3-L1 細胞を樹立し、IBMX、Dexamethasone、Insulin により成熟分化を誘導し、Oil Red O 染色、トリグリセリドの定量、リアルタイム PCR 法による脂肪分化関連遺伝子の定量を行い、TRIM23 発現の変動による分化への影響を評価した。

【結果】

足場非依存性増殖を制御する TRIM31 の細胞機能解析

抗 TRIM31 抗体を作製しウエスタンブロット解析および蛍光免疫組織染色を行った結果、TRIM31 は消化管、特に小腸上皮細胞に高発現していた。また、酵母ツーハイブリッド法により複数の TRIM31 相互作用分子を同定した。特に TRIM31 は哺乳類細胞内でも c-Src を含めた細胞増殖シグナルを制御する分子、p52^{Shc} と結合していた。活性型 c-Src、TRIM31 共安定発現 NIH3T3 細胞は通常の増殖速度に変化はなかったが、軟寒天培地でのコロニー形成能が抑制されていた。

PPAR γ シグナルを制御する TRIM23 の細胞機能解析

ルシフェラーゼアッセイによって PPAR γ の活性を制御する TRIM タンパク質として TRIM23 を同定した。TRIM23 はリガンド依存性に PPAR γ シグナルを増強し、哺乳類細胞内で PPAR γ と結合していた。TRIM23 過剰発現 3T3-L1 細胞は分化が促進し、TRIM23 ノックダウン 3T3-L1 細胞は分化が抑制された。

【考察】

足場非依存性増殖を制御する TRIM31 の細胞機能解析

本研究によって、TRIM31 は、活性型 c-Src(Y527)によって誘導された足場非依存性増殖を抑制する機能を持つことが明らかとなった。足場に依存して増殖している状態から足場を必要とせず増殖可能な状態への遷移は、正常細胞が癌細胞へとその形質を転換する際の顕著な特徴として知られている。TRIM31 が小腸上皮細胞を中心とした腸管内で高発現していることは、少なくとも Src シグナルの活性化が関与した癌化を抑制するセーフティネットの 1 つとして働いていると考えられる。また、消化管由来の癌の中で小腸癌は他と比較して発生率が低い理由の一端に、TRIM31 の高発現があるのかもしれない。

PPAR γ シグナルを制御する TRIM23 の細胞機能解析

脂肪組織は長らく過剰なエネルギーを貯蔵する場所として考えられてきた。しかし近年の知見により、エネルギー代謝に関連するホルモンやサイトカインを分泌する内分泌組織として位置づけられるようになってきた。白色脂肪細胞の分化異常や機能異常はインスリン抵抗性上昇によるメタボリック症候群へと発展する可能性があるため、脂肪細胞分化を制御する遺伝子の同定は重要である。TRIM23 はこれら疾患の治療標的となる可能性がある。

【結論】

本研究は、癌細胞の性質を制御する TRIM タンパク質、PPAR γ シグナル活性化を増強し、白色脂肪前駆細胞の分化を促進する新たな TRIM タンパク質という、TRIM タンパク質の新たな 2 つの機能を明らかとした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	西村孝司
副査	教授	岩永敏彦
副査	教授	畠山鎮次
副査	教授	高田賢藏

学位論文題名

TRIMタンパク質による細胞機能制御

TRIMファミリータンパク質はRINGドメインを有するユビキチンリガーゼであり、転写制御、細胞死および細胞増殖といった広範囲に渡る細胞機能に関わり、その変異は、発達障害、神経変性疾患、ウイルス感染、癌などの多様な疾患と関連している。TRIMタンパク質のうち、TRIM19、TRIM24、TRIM25 および TRIM68 は、RAR α を始めとした核内受容体の活性を制御し、白血病や乳癌および前立腺癌の進行を制御している。さらに、TRIM13、TRIM19、TRIM24、TRIM28 および TRIM29 は、最も重要な癌抑制遺伝子の1つである p53 の安定性や転写活性を制御している。これまでに、TRIM31 は癌の制御に関わることが推測されていたが、未だ十分な解析がなされていなかった。今回の研究により、TRIM31 は消化管、特に小腸上皮細胞に高発現し、活性型 c-Src によって誘導された足場非依存性増殖能を TRIM31 が抑制することが明らかとなった。この機能の分子メカニズムとして、酵母ツーハイブリッド法により TRIM31 相互作用分子の同定を試み、c-Src の活性化分子 p52^{Shc} が同定された。このため、TRIM31 は p52^{Shc} を介して c-Src の活性を抑制していることが示唆された。また、核内受容体の1つである Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) はユビキチン・プロテアソーム系による制御を受けることが知られていたが、その分子メカニズムは解明されていない。今回の研究では、PPAR γ のシグナルを制御する TRIM タンパク質の検索を行い、リガンド依存性 PPAR γ シグナル活性化因子として TRIM23 が同定された。PPAR γ は白色脂肪細胞分化におけるマスター遺伝子であるため、分化における TRIM23 の役割を検討したところ、TRIM23 は白色脂肪細胞の適切な分化に必要な分化促進因子であることが明らかとなった。

審査会において、副査の高田教授より、脂肪細胞分化における PPAR γ の役割と TRIM23 の関わりに関して質問を受け、PPAR γ は白色脂肪細胞の分化時におけるマスター遺伝子であり、TRIM23 は PPAR γ の活性化促進因子ある旨を述べた。また、内在性の TRIM31 と p52^{Shc} の結合実験の信頼性について質問を受け、バンドが薄いながらも陰性対照と比較して明確に共沈降を観

察できると述べた。さらにユビキチン化のタンパク質分解以外の機能について質問を受け、分解に関与しないユビキチン化の機能について、近年の知見を述べた。主査の西村教授より、TRIM31の足場非依存性増殖抑制能は一般的なものであるかについて質問を受け、活性型 Src 以外にも、活性型 Ras や Rac1 などを用いて検証する必要性を述べた。また、TRIM31 が特に小腸で発現が高いことの意義について質問を受け、癌の発生率が胃や大腸などと比べ小腸において低いことに TRIM31 が寄与している可能性を述べた。さらに代謝異常に起因する疾患などの臨床データと TRIM23 の相関について質問を受け、現状では未報告であるが、今後の詳細な解析の重要性を述べた。副査の岩永教授より小腸上皮の先端と陰窩における TRIM31 免疫反応の差について質問を受け、差は特に認められなかったと述べた。また TRIM23 の発現が脂肪組織特異的であるかについて質問を受け、脂肪組織にて発現を認めるが組織特異的ではなく、他の組織においても発現を認めることを述べた。副査の畠山教授より、今回の研究を受け、今後の展開について質問を受け、ノックアウトマウスなどを用いた個体レベルでの検証と臨床への応用の重要性を述べた。

この論文は、癌細胞の性質を制御する TRIM31、及び PPAR γ シグナル活性化を増強し白色脂肪前駆細胞の分化を促進する TRIM23 の機能を明らかにしており、今後はこの研究をもとに臨床的な応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を取得するのに十分な資格を有するものと判定した。