

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07346

研究課題名(和文)炎症反応制御因子mTOC(セラストラマイシン結合タンパク質)の生理機能解析

研究課題名(英文)Biochemical characterization of an inflammation related protein, mTOC (Celastramycin binding protein)

研究代表者

富田 毅 (Tomita, Takeshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：20302242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：mTOC(セラストラマイシン結合タンパク質)は亜鉛フィンガーを含む約2000アミノ酸で構成されるタンパク質であり、哺乳動物細胞に広く発現している。培養細胞を用いた実験から、低分子化合物セラストラマイシンの抗炎症作用は、セラストラマイシンのmTOCへの結合によって引き起こされると考えられている。そこで本研究では、mTOCの生理機能を解析することを目指し、mTOCおよびその関連因子について生化学的に調べた。研究結果から、mTOCの結合因子であるMTR4およびC1Dに関する知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、セラストラマイシン結合タンパク質とその関連タンパク質であるMTR4やC1Dの細胞内における機能に関する新たな知見を得ることができた。これらの基礎的知見は、炎症における細胞内のタンパク質-タンパク質相互作用の変化を解析を行う上で有用な情報となる。将来的な細胞内の炎症ネットワーク解析に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：mTOC (Celastramycin binding protein) is a zinc finger protein composed of ~2000 amino acids. It is widely expressed mammalian cells, but its biological functions remained unknown. Our previous experiments revealed that anti-inflammatory effects driven by Celastramycin were due to its binding to mTOC. In this study, to elucidate molecular mechanisms of mTOC, mTOC and its associating factors including MTR4 and C1D were investigated to find out new information regarding with them.

研究分野：生物化学

キーワード：C1D MTR4 亜鉛フィンガータンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

セラストラマイシンは、東北大学・薬学部・倉田祥一郎教授の研究グループによって見出された低分子有機化合物である。この化合物はショウジョウバエ幼虫個体培養系を用いたスクリーニングから得られている。ショウジョウバエには自然免疫系が存在し、菌体成分による刺激を受けた場合、抗菌ペプチドを産生する。セラストラマイシンは細胞毒性を示さない濃度でこの抗菌ペプチド産生を抑制する。分子レベルで見た場合、ショウジョウバエに存在する免疫機構は、哺乳動物のものと同様類似した機構を持っていることから、ヒトにもセラストラマイシンが免疫反応を制御するシステムが存在することが予想された。このことはすなわち、セラストラマイシンが何らかの医薬の出発材料となる可能性があると考えられる。そこでセラストラマイシンが結合するタンパク質がヒトにも存在するかどうかを、プロテインアレイを用いたスクリーニングにより調べた。スクリーニングの結果、亜鉛フィンガータンパク質 ZFC3H1 がセラストラマイシン結合タンパク質であることが判明した。研究開始当初 ZFC3H1 はその遺伝子名がデータベース上に登録されているだけであり、本格的な解析はなされていなかった。培養細胞と siRNA を用いた解析から、ZFC3H1 は TNF 刺激による炎症性サイトカイン IL8 の発現調節に関わっていることが明らかとなった。すなわち、ZFC3H1 を siRNA でノックダウンした細胞では、TNF 刺激による IL8 の発現上昇が抑制されていた。一方 2016 年に発表された論文によると、ZFC3H1 は核エクソソーム結合タンパク質である MTR4 と結合し、細胞内の RNA 分解において重要な役割を果たしていることが報告されている。さらに非ヒストンクロマチンタンパク質である C1D とも相互作用があることが見出されている。実際、HeLa 細胞抽出液から mTOC 抗体を用いて mTOC の免疫沈降を行ったところ、その産物中に C1D の存在が認められた。またマウス肺転移系モデルでの研究からその生理的重要性が見出されたタンパク質 SAA3 は TNF などの炎症性刺激により顕著に発現が上昇する。マウス肺上皮細胞における SAA3 の発現上昇のパターンは IL6 などの炎症性サイトカインのそれと類似しており、培養細胞を用いて行った予備検討では、mTOC のノックダウンが SAA3 の発現を抑制した。したがって、mTOC は SAA3 の発現制御にも関わっていると考えられる。そこで、mTOC および関連タンパク質の構造と機能を生化学的に解析する研究を計画するに至った。

## 2. 研究の目的

上述のとおり、本研究の目的は mTOC および関連タンパク質の構造と機能を明らかにすることである。mTOC は約 2000 アミノ酸からなる巨大タンパク質である。ポリペプチド鎖中には、コイルドコイルドメイン、亜鉛フィンガードメイン、TPR ドメインなど変化の富んだドメインが局在しているほか、14 か所の部位でリン酸化が起こりうることがプロテオミクス研究により明らかにされている。これらの各ドメインについての生化学的な機能は全く不明である。また既知の mTOC と結合タンパク質のうち、もっともよく解析がなされているのは MTR4 である。そこで、mTOC と MTR4 の結合を支配する要因および、その生理的意義について調べる。さらに MTR4 結合タンパク質である C1D とも mTOC は相互作用する可能性がある。私たちの先行研究により、mTOC をノックダウンした HeLa 細胞では IL8 の発現が顕著に抑制されていた。C1D が UV 照射後にクロマチン画分から核マトリックス中へ出てくることが分かっており、そこで mTOC との何らかの相互作用が期待される。そのため UV 照射による C1D のふるまいについても研究対象とした。SAA3 については遺伝子レベルでの知見は充実しており、むしろタンパク質レベルでの挙動について不明な点が多い。そのため、SAA3 についてタンパク質の溶液中での構造情報を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

mTOC および関連タンパク質のリコンビナントタンパク質およびアミノ酸部位特異的変異体を作成し、タンパク質-タンパク質間相互作用を解析した。さらにこれらの発現プラスミドや siRNA や shRNA を培養細胞にトランスフェクションし、細胞の機能に影響を及ぼすかどうかを調べた。

### 4. 研究成果

#### (1). mTOC と MTR4 の相互作用 1 - MTR4 部分体作成実験

MTR4 の全長および部分体を動物細胞における過剰発現系を用いて調製し、これと同じく動物細胞の過剰発現系を用いて調製した mTOC との結合について、MTR4 に付加したタグを用いたプルダウンアッセイにより評価した。まず全長 MTR4 を用いた場合、mTOC によって MTR4 がプルダウンされることが確認できた。一方 MTR4 全長 (1042 アミノ酸) の部分体 (D1 : 1 - 308、D2 : 308 - 556、D3 : 556 - 878、D4 : 878 - 1042) の 4 つを作成し、mTOC との共免疫沈降により相互作用の有無を判定したが、いずれの部分体も mTOC によってプルダウンされなかった。さらに D1 + D2 および D2 + D3、D3 + D4 でも同様の実験を行ったがやはりこれらの部分体は mTOC によってプルダウンされなかった。D1 + D2 + D3 でも D2 + D3 + D4 でも同様に mTOC によるプルダウン実験を行い、これらの部分体が mTOC によりプルダウンされなかった。したがって MTR4 と mTOC との相互作用には、MTR4 が全体構造を保持していなければならないと考えられる。

#### (2). C1D の機能解析

C1D は MTR4 の N 端領域に結合することが構造生物学的に明らかとなっている。したがって、HeLa 細胞抽出液から mTOC を免疫沈降させるとその産物中に C1D を確認することができるが、これは MTR4 を介した相互作用である可能性がある。C1D は非ヒストンクロマチンタンパク質であるが、コリプレッサーとしての機能のほか、DNA - PK や XPB など DNA 修復に関わるタンパク質と相互作用することが報告されており、多彩な機能を持つタンパク質である。ヒトの培養細胞 (LU99、HeLa、786-0、HT1080) に siRNA をトランスフェクションし C1D をノックダウンさせた状態で UV 照射を行い、1 週間-2 週間後に増殖してきた細胞の数を比較すると、LU99 と 786-0 では C1D のノックダウンによる効果が見られたが、HeLa と HT1080 では見られなかった。当初これは C1D が XPB との相互作用により DNA 修復系に影響を及ぼしているからと考えられた。しかし、その後に行った免疫染色像解析や過酸化水素存在下での MTT アッセイの結果、C1D のノックダウンにより、細胞が酸化ストレスによるダメージをより受けやすくなっているためであると解釈された。さらに遺伝子発現を調べると、C1D のノックダウンにより LU99 細胞では C1D はストレス応答因子である DDIT3 の発現上昇に関与していること、および 786-0 細胞では C1D は DNA 修復タンパク質である APEX1 の発現上昇に機能していることが明らかとなった。これらの研究から、C1D の機能は細胞種によって大きく異なっていることが判明した。

### (3) . mTOC と MTR4 の相互作用 2 - mTOC 部分体作成実験

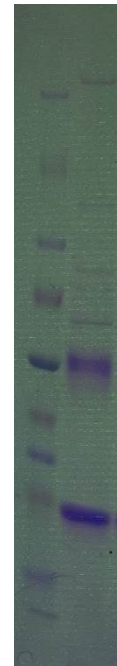
mTOC の部分体を大腸菌の発現系を用いて精製し、全長 MTR4 によりプルダウンされるかどうかを調べた。実験の詳細については、学術論文を作成中であるためここで記述することは控えるが、この実験結果から mTOC のどの部分が MTR4 と相互作用しているかについて明らかにすることができた。この実験で使用した一連の mTOC 発現コンストラクトをヒト培養細胞にトランスフェクトし、mTOC で免疫沈降を行った。結果の一例を図 1 に示す。一番上の mTOC (230kDa)、IgG(55kDa, 25kDa)以外にも複数のバンドが観測された。

### (4) .SAA3 の溶液構造

マウス SAA3 は GST との融合タンパク質として大腸菌での発現系からグルタチオンビーズを用いて精製した。グルタチオンビーズで精製した GST - SAA3 は電気泳動上単一のバンドを与える程度の純度であった。(多量に泳動すれば、夾雑物と思われるバンドが観測される)この標品を Prescission protease で処理し、GST と SAA3 を分離した。蛍光相関分光

(FCS)解析のために SAA3 に蛍光ラベルを導入する必要があり、いくつかの方法が試された。具体的には、SAA3 の N 端に CCPGCC の 6 アミノ酸を組み込んだ形でタンパク質試料を調製し、FlAsH-EDT2 を導入する、SAA3 の N 端にシステインを組み込んだ形でタンパク質試料を調製し、Alexa 488 C5 Maleimide によるラベル化を行う、精製 SAA3 を直接 FITC-I でラベル化する、精製 SAA3 を直接 Alexa 488 NHS Ester でラベル化する、の 4 つを試みた。(GST - SAA3 タンパク質試料の調製とラベル化の予備実験は東京女子医科大学にて行われたが、FCS 測定のための試料作成や FCS 測定の実際は、共同研究先の東北大学多元物質科学研究所・高橋聡研究室の協力によって行われたことを明記しておく。)ラベル化の効率、ラベル化の量比(1 分子につき 1 個の蛍光色素の導入)やラベル化後の遊離色素の除去、が測定に影響を与える重要な要素である。これらの要素を指標として、上記の方法を検討したところ、の方法が最も良い結果を与えることが判明した。の方法でラベル化した試料をゲルろ過で解析したところ、その分子量は 4 量体に相当するものであることが分かった。この試料を用いて FCS 測定を行ったが、測定中にデータが変化していくため安定した結果が得られなかった。これは SAA3 の 4 量体同士が測定中に会合しており、その割合が変化しているためと考えられている。

図 1 . mTOC を 293T 細胞で過剰発現させたものをタグ抗体でプルダウンし、SDS-PAGE で分析したものの。左のレーンはマーカー



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomita T, Ieguchi K, Takita M, Tsukahara F, Yamada M, Egly JM, Maru Y.	4. 巻 164
2. 論文標題 C1D is not directly involved in the repair of UV-damaged DNA but protects cells from oxidative stress by regulating gene expressions in human cell lines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 415-426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井崎 安紗美、小井川 浩之、富田 毅、高橋 聡
2. 発表標題 タンパク質間相互作用の観測を目指した蛍光相関分光装置の開発
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----