

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2013

課題番号：22590359

研究課題名（和文）小胞体分子 MG23 による DNA 損傷応答と光免疫応答のクロストーク

研究課題名（英文）MG23-mediated crosstalk between genetic system and immune system.

研究代表者

山崎 哲男（YAMAZAKI TETSUO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90330208

研究成果の概要（和文）：本研究はMG23の機能発現様式を切り口にして、DNA損傷応答と光免疫応答に固有の分子基盤を整備すると共に、両者のクロストークに踏みこむことを目指したものである。MG23が紫外線曝露時に生じるDNA損傷応答に関与し、細胞保護的な役割を担う事を明らかにした。また、MG23結合タンパク質として、熱ショック蛋白質の一種 α Bクリスタリンを単離し、MG23が同タンパク質との相互作用することによって紫外線に対する細胞保護機能を発揮する事を示した。

研究成果の概要（英文）：The endoplasmic reticulum (ER) operates in adaptive responses to various stresses, dictating cell fate. Here we show that knockdown of the ER protein mitsugumin23 (MG23) enhances cell death induced by ultraviolet C (UVC), which causes DNA damage. The small heat shock protein α B-crystallin (α BC) is identified as a MG23 binding molecule and its knockdown facilitates death of UVC-exposed cells. Conversely, α BC lowered UVC sensitivity when expressed as an ER-anchored form. Taken together, the results suggest that MG23 plays a protective role against UVC by accumulating α BC in the close vicinity of the ER.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：小胞体、細胞死、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

紫外線はDNAを傷害する外的要因の一つであるが、尋常性乾癬や白斑に対する光線療法にも用いられるなど、DNA損傷ネットワークと免疫ネットワークを稼働させる共通の起点と考えられ、その特性を鑑みると、光免疫応答固有の分子機構のみならず、DNA損傷応答とのクロストークにまで踏み込んだ包括的な分子メカニズム解析が急務と言え、この目的に適うモデル分子ならびにモデル動物が

求められているのが現状である。申請者はMG23（小胞体膜貫通タンパク質）をノックアウトすると胸腺細胞の放射線感受性が低下すること、その一方で、同分子の過剰発現がDNA傷害性抗癌剤の感受性を増強することを明らかにし、DNA二重鎖切断に際して惹起される細胞応答へのMG23の関与を指摘した。また、申請者はMG23の細胞内タンパク質量が紫外線照射（DNA鎖内架橋を引き起こす）に際して増加すること、併せてマウス線維芽

細胞の紫外線感受性が MG23 欠損に伴って低下する予備の実験結果を得ており、同分子が DNA 損傷応答全般のモデル分子となる可能性を見出した。本研究はこうした実績を踏まえて、提案するものである。

2. 研究の目的

DNA 損傷応答は細胞死、老化、発癌をもたらす。一方、紫外線に対する光免疫応答は光線治療および光線過敏症の背景を成す。このように両応答は病態と不可分の関係にあるが、その分子基盤に関する情報は限定的であり、人為的制御を困難にしている。本研究は小胞体分子 MG23 の DNA 損傷応答への関与を示した研究実績ならびに同分子の紫外線応答特性に立脚して提案するものである。MG23 の機能発現様式を切り口にして、DNA 損傷応答と光免疫応答それぞれに固有の分子基盤を整備すると共に、両者のクロストークにまで踏み込むことを目指す。

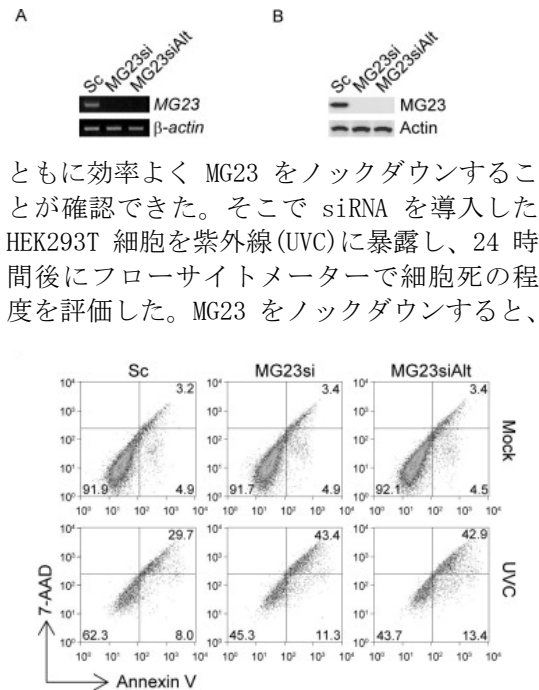
3. 研究の方法

まず MG23 が HEK293T 細胞の紫外線感受性を左右する可能性を siRNA を用いたノックダウン実験で検討する。当該実験で、マウス繊維芽細胞で得られた予備実験結果と同様に MG23 が紫外線誘導性細胞死を抑制する事が確認された場合には、HEK293T 細胞をモデル細胞株として採用し、MG23 の機能発現領域の絞り込みを行う。その後、当該領域を bait にした酵母 2 ハイブリッド法で、同分子と機能共役する可能性を持つ結合分子をスクリーニングする。ここでは複数の分子が単離されることが予想されるので、ノックアウト実験で個々の分子の紫外線誘導性細胞死への関与を検討し、影響を認めた分子を優先的に解析する。具体的には当該分子と MG23 それぞれおよびダブルノックダウンを行い、両分子が同一のシグナル伝達経路上で機能する、換言すれば両者が物理的のみならず機能的にも結合しているのかについて解答を得る。

4. 研究成果

MG23 が紫外線が惹起する細胞死を抑制する点を明らかにした。

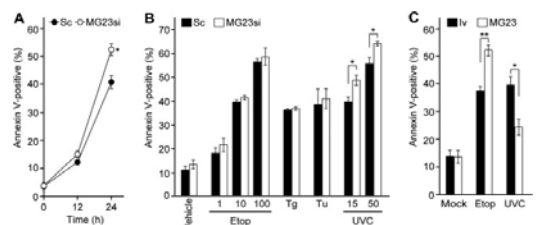
MG23 に対する 2 種類の siRNA (MG23si ならびに MG23A1t) もしくはコントロール siRNA (Sc) を HEK293T 細胞に導入した後、ノックダウン効果を RT-PCR (A) ならびに免疫プロット (B) で評価した。MG23 に対する 2 種類の siRNA は



ともに効率よく MG23 をノックダウンすることが確認できた。そこで siRNA を導入した HEK293T 細胞を紫外線 (UVC) に暴露し、24 時間後にフローサイトメーターで細胞死の程度を評価した。MG23 をノックダウンすると、

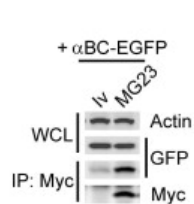
アネキシン V 陽性細胞の割合が上昇 (〜20%) し、同タンパク質が紫外線誘導性細胞死に抑制的に働くことが示唆された。

MG23 の紫外線感受性調節機能の詳細を検討するために、フローサイトメーターを使用して、アネキシン陽性率を経時的に追跡 (A) した。DNA 傷害性抗がん剤エトポシド (Etop) お



よび小胞体ストレス誘導剤 (Tg, Tu) で処理された細胞のアネキシン陽性率は MG23 のノックダウンによる影響を受けない (B) ことから、同タンパク質減少時にみられた紫外線感受性の亢進の特異性が支持された。また、MG23 を過剰発現すると、ノックダウン時とは逆に紫外線感受性の低下 (C) がもたらされ、MG23 が紫外線から細胞を保護する機能を備えていることが強く示唆された。

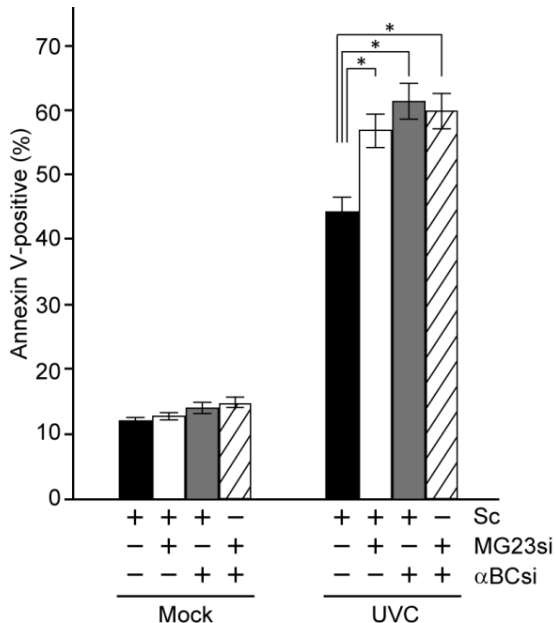
続けて、MG23 が紫外線曝露細胞の死を抑制する分子メカニズムを追究するために、同タンパク質と機能共役するタンパク質を探索した。酵母 2-ハイブリッド法により、物理的に結合するタンパク質をスクリーニングしたところ、熱ショックタンパク質クリスタリン α B (α BC) が単離された。そこで、MG23



(EGFP との融合) と α BC(Myc との融合) を共発現させたところ、両者の共沈降が確認できた (左図)。MG23/ α BC 相互作用が紫外線感受性制御の分子的背景として

浮上したのを受けて、実際に α BC 自身が実際に紫外線暴露に際して誘導される細胞応答に関与するののかについて検討を加えた。

α BC に対する siRNA(α BCsi)を用いて、紫外線感受性への影響をフローサイトメトリーで評価したところ、 α BC の単独ノックダウン

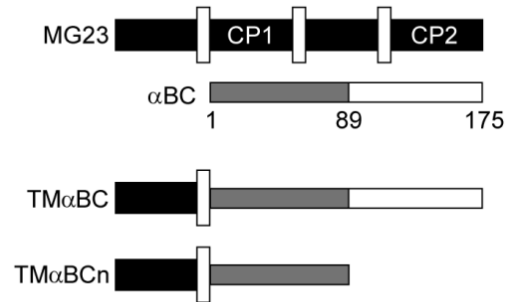


はアネキシン陽性率の上昇をもたらし、同タンパク質も紫外線誘導性細胞死を抑制することが示唆された。一方、MG23 とダブルノックダウンした場合には、紫外線照射時の細胞死は増強されるものの、その程度は α BC 単独ノックダウン時とほぼ同程度であり、有意義な差が認められなかった (上図)。両者が物理的に相互作用する点を鑑みると、 α BC との相互作用が、MG23 の呈する紫外線感受性制御機能の分子背景として浮上した。

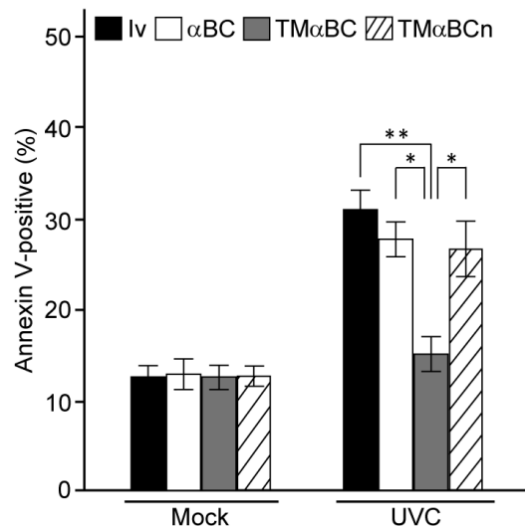
意外なことに、 α BC を過剰発現させただけでは HEK293T 細胞の紫外線感受性が低下しないことが判明した (次図 B)。 α BC が MG23 に近接すること、つまり相互作用が生理的な状況下では何らかの理由で困難である可能性が考えられた。そこで、 α BC を小胞体近傍に強制的に配置し、その影響を検討した。この目的のために、 α BC を MG23 のアミノ末端に融合させた小胞体膜貫通型キメラ分子 (TM α BC、次図 A) を発現させた。TM α BC

は予想通り、紫外線に対して細胞保護的に働いた。 α BC のカルボキシル基側半分を欠くと、この細胞保護機能が消失することも併せて確認した (TM α BCn、次図 A)。

A



B



以上から、MG23 が紫外線暴露時に誘導される細胞死を抑制することを見出すとともに、この細胞保護機能が、熱ショックタンパク質クリスタリン α B との結合を介したものであり、小胞体膜上でのシグナル分子複合体の形成が DNA 損傷応答時の細胞の運命を左右する新機構を提唱するところとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yamashita Arisa, Taniwaki Tatsuya, Kaikou Yuka, Yamazaki Tetsuo, Protective role of the endoplasmic reticulum protein mitsugumin23 against ultraviolet C-induced cell death., FEBS Lett., 査読あり、Vol.587, 2013, pp.1299-1303, doi: 10.1016/j.febslet.2013.03.024.

- ② Troutman Ty Dale, Hu Wei, Fulenchek Stephanie, Yamazaki Tetsuo, Kurosaki Tomohiro, Bazan J Fernando, Pasare Chandrashekhar, Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt., Proc Natl Acad Sci USA., 査読あり、Vol.109, 2012, pp.273-278, doi: 10.1073/pnas.1118579109.
- ③ Song Sungwon, Chew Claude, Dale M. Benjamin, Traum Daniel, Peacock James, Yamazaki Tetsuo, Clynes Raphael, Kurosaki Tomohiro, Greenberg Steven, A Requirement for the p85 PI3K Adapter Protein BCAP in the Protection of Macrophages from Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress., J Immunol., 査読あり、Vol.187, 2011, pp.619-625, doi: 10.4049/jimmunol.0903425.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 南川典昭、ケミカルツールを用いた siRNA-タンパク質間の相互作用様式解明、第133年会日本薬学会、2013年03月28日～2013年03月30日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② 山崎哲男、ミトコンドリア由来のROSシグナルは骨芽細胞の分化を誘導する、第51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会・中国四国支部学術大会、2012年11月10日～2012年11月11日、島根県民会館・サンラポーむらくも (松江市)
- ③ 山崎哲男、小胞体タンパク質EPIGは紫外線照射による細胞死を抑制する、第51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会・中国四国支部学術大会、2012年11月10日～2012年11月11日、島根県民会館・サンラポーむらくも (松江市)
- ④ 山崎哲男、小胞体タンパク質EPIGの紫外線応答における役割、第50回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会・中国四国支部学術大会、2011年11月12日～2011年11月13日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場 (高松市)
- ⑤ 山崎哲男、小胞体タンパク質 mitsugumin23によるDNA損傷性細胞死の促進、第117回日本薬理学会近畿部会、2010年7月8日、徳島県郷土文化会館 (徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 哲男 (YAMAZAKI TETSUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：90330208

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：