

【20】

氏 名	かみ むら りょう た 上 村 亮 太
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第816号
学位授与の日付	令和4年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (口腔外科学)
学位論文題目	Identification of binding proteins for TSC22D1 family proteins using mass spectrometry (質量分析を使用したTSC22D1ファミリータンパク質の結合タンパク質の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 菱 沼 昭 (副査) 教授 井 川 健 教授 白 瀧 博 通

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

近年、癌治療は手術療法、化学療法、放射線療法に加え、造血器系腫瘍では分化誘導療法も行われている。しかし、多くの固形腫瘍における分化誘導療法は確立されていない。われわれのグループは唾液腺癌培養細胞（TYS細胞）において、分化誘導剤により誘導される遺伝子としてTGF- β stimulated clone-22（TSC-22）cDNAをクローニングし、そのゲノム構造、発現調節、タンパク質の構造・機能解析を行っている。TSC-22はファミリーを形成しており、われわれがクローニングしたTSC-22はTSC22D1-2と言われている。TSC22D1ファミリータンパク質は細胞分化、増殖抑制、細胞老化への関与が知られている。これらのことから、われわれはTSC-22が分化誘導因子になりうる可能性があると考えている。しかしながら、TSC-22の分子メカニズムの報告は少なく、不明な点が多い。TSC-22は転写活性ドメインがないこと、細胞ストレスなどにより細胞質から核内移行することから、局在の変化とともに他のタンパク質と結合し、相互作用すると考えている。

【目 的】

本研究では①TSC-22の細胞内の局在の検索を行う、②TSC22D1ファミリータンパク質との結合タンパク質の同定を行うことを目的とした。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学組換えDNA実験計画書を申請し、承認済みである。(E19551)

①TSC22D1（主にTSC-22）の細胞内局在の検索

a. 緑色蛍光タンパク質タグ (Green fluorescent protein : GFP) を用いた局在検索

GFP-TSC-22 (TSC22D1-2の完全長) および、GFP-TSC-22N (TSC22D1-2の1-60アミノ酸、自然界には存在しない)、GFP-TSC22C (TSC22D1-2の58-144アミノ酸、別名TSC22 (86) あるいはTSC22D1-3) をヒト胎児腎細胞 (HEK293) にそれぞれトランスフェクションし、観察した。GFP-TSC-22はDNA障害前後の状態を観察した。

b. 内因性のTSC22D1ファミリータンパク質の局在検索

HEK293細胞の内因性のTSC22D1の観察を行った。抗TSC22D1抗体、および細胞質内での詳細な局在検索するため、ミトコンドリア内膜マーカーである抗Tim50抗体を使用し観察した。さらに核分画、ミトコンドリア分画に対し抗TSC22D1抗体を用いてWestern blotting (WB) を行い、TSC22D1ファミリータンパク質の分布を確認した。

②TSC-22の結合タンパク質の同定と確認

a. *In vitro* GST-pull down assayによるTSC-22結合タンパク質の同定

GST-TSC-22を発現する大腸菌抽出物にGlutathione beadsを加え、TYS細胞の全細胞抽出液と反応させ、pull downを行い、質量分析でタンパク質を解析した。

b. *in vivo*におけるDNA障害前後でのTSC-22結合タンパク質の同定

Flag-TSC-22、Flag-TSC22 (86) を発現したベクターを、Flp-InTM293 T-Rex細胞に発現させ、それぞれの細胞のDNA障害を与えたものと与えていないものを使用した。抗Flag抗体で免疫沈降を行い、質量分析でタンパク質を解析した。また、免疫沈降サンプルを結合タンパク質候補の抗体 (抗histone h1抗体、抗GNL3抗体) を用いてWBを行った。

【結 果】

①TSC22D1の細胞内局在の検索

TSC-22 (TSC22D1-2) は定常時は細胞質に局在し、DNA障害後に核内移行した。TSC-22Nは細胞質に局在していた。TSC-22C (TSC22D1-3) は細胞質および核内に局在していた。抗TSC22D1抗体により細胞質にドット上に見られる蛍光と、核内に見られる蛍光が観察できた。Tim50の局在とTSC22D1ファミリータンパク質の局在をmergeすると、細胞質の内在性TSC22D1ファミリータンパク質の大部分はミトコンドリアに局在していた。HEK293細胞のミトコンドリア分画、核分画を用いた抗TSC22D1抗体でのWestern blottingでは内在性TSC-22 (TSC22D1-2) はミトコンドリアと核、内在性TSC22D1-1は主に核に局在していた。

②TSC-22結合タンパク質の分類

in vitro pull downおよび*in vivo*で免疫沈降によりいくつかの結合タンパク質バンドが確認できた。また、*in vitro*の系において、DNA障害後では核内に多くの結合タンパク質が確認できた。質量分析でタンパク質を同定し、その中で*in vitro*の系で同定されたhistone H1とGNL3に着目した。これらの抗体を用いてWBを行うと、TSC-22とhistone H1の結合が確認できた。GNL3は*in vitro*の系では結合が確認できなかったが*in vivo*の系では結合を確認できた。

【考 察】

TSC-22 (TSC22D1-2) はNuclear Export Signal (NES) 構造を持ち、定常時は細胞質に局在し、細胞障害などのストレスにより核移行することを示した。N末側にあるNESを除去したTSC-22C (TSC22 (86)、(TSC22D1-3) は細胞質にも核にも局在していた。抗TSC22D1抗体を用いた蛍光抗体法およびWBにて、TSC22D1-1はほとんどが核内に局在し、TSC-22 (TSC22D1-2) はミトコンドリアと核に局在していた。*in vitro*あるいは*in vivo*の系において、いくつかのTSC-22結合タンパク質の候補を同定した。DNA障害後に多くの結合タンパク質が見られることより、核移行とそれに伴い結合したタンパク質との相互作用でTSC-22 (TSC22D1-2) が機能する可能性が考えられた。今回は histone H1とGNL3に着目した。TSC-22 (TSC22D1-2) がHistone H1に結合することで、細胞増殖制御、細胞分化制御、アポトーシス誘導、細胞老化に関与している可能性が考えられた。GNL3はp53やMDM2と結合し、細胞周期を調整し、細胞分化に影響を及ぼし、腫瘍抑制因子として働く可能性が報告されている。TSC-22 (TSC22D1-2) の作用との関連が示唆された。今後はこれらのタンパク質が内在性のTSC-22 (TSC22D1-2) と生理的状态で結合しうるかを検証する必要がある。また、これらの結合タンパク質が情報伝達経路における役割を解明することで、TSC-22 (TSC22D1-2) の機能を明らかにできるものと考えている。

【結 論】

TSC-22 (TSC22D1-2) の細胞局在やDNA障害による核移行を明らかにした。TSC-22はDNA障害後に核内で多くのタンパク質 (Histone H1やGNL3など) と結合し、転写活性調節や細胞内情報伝達を行なっていると思われた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

TGF- β stimulated clone-22 (TSC-22) は、細胞分化、細胞増殖抑制、アポトーシスを誘導することが報告されている。TSC-22は、4つの異なる遺伝子から多くのタンパク質が産生されるファミリーのメンバーである。TSC-22 (現在はTSC22D1-2と呼ばれている) は、TSC22D1遺伝子の短いバリエーションから翻訳された144個のアミノ酸で構成されている。TSC-22の機能に関する報告は散見されるが、その作用メカニズムは不明な点が多い。TSC-22はその構造としてNuclear export signal (NES) やTSC-box、Leucine zipper構造を持つが、TSC-22自身は転写活性ドメインを持っていない。本研究では、TSC22D1ファミリータンパク質 (TSC22D1-1、TSC-22、およびTSC22 (86) (TSC22D1-3)) の細胞内局在を観察し、TSC22D1の結合タンパク質を質量分析にて同定した。細胞内局在の検索では、TSC22D1-1は主に核に局在しており、TSC-22は細胞質、主にミトコンドリアに局在していた。また、TSC-22はDNA損傷後に細胞質から核移行した。TSC22 (86) は細胞質と核の両方に局在していた。結合タンパク質の同定は、*in vitro*および*in vivo*の系で、複数の結合タンパク質候補を質量分析によるスクリーニングで同定した。その中でも、遺伝子発現や細胞増殖・細胞分化に関与が高いと考えられ、かつ質量分析によるmasspecスコア、ペプチドスコアが高いHistone H1、GNL3に着目し、免

疫沈降-ウエスタンブロットティングあるいは*in vitro* pull downのサンプルに対するウエスタンブロットティングにてTSC22D1ファミリータンパク質との結合を確認した。

【研究方法の妥当性】

本研究は本学における組換えDNA実験計画書を申請し、承認され実施されている。局在検索では、蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein：GFP）とTSC-22ファミリータンパク質を融合させた強制発現系、および内在性TSC-22D1ファミリータンパク質に対する蛍光抗体法にて実験が行われている。結合タンパク質の同定は、*in vitro* pull down、細胞内でFlag融合TSC-22ファミリータンパク質の免疫沈降を行い、それぞれ質量分析にてタンパク質を同定し、ウエスタンブロットティングにて結果の裏付けを行っている。モデル化した人工的な系、細胞内での生理的な系で検証を行っており、いずれの手段も妥当な評価方法である。

【研究結果の新奇性・独創性】

TSC-22は定常時に細胞質局在し、DNA障害により核移行することは既に報告されているが、細胞質内で局在しているオルガネラの同定は報告されておらず、TSC22D1ファミリータンパク質の詳細な細胞内局在に言及した報告はない。また、結合タンパク質の同定の報告はなく、本研究は質量分析を用いてタンパク質を同定した初めての報告であり、新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

局在検索ではGFP融合TSC-22ファミリータンパク質の強制発現および内在性TSC22D1ファミリータンパク質に対して蛍光抗体法にて観察が適切になされ、結果の信憑性が得られている。結合タンパク質の同定実験では、*in vitro* pull down、細胞内でのFlag融合タンパク質の強制発現系で免疫沈降にてそれぞれタンパク質を分離し、質量分析により同定している。さらに、同定したタンパク質候補の抗体を、ウエスタンブロットティングにて結合の確認も行なっている。実験によって得られた結果を適切に解釈しており、過去に明らかにされた知見・報告をふまえ結論づけられている。

【当該分野における位置付け】

唾液腺癌分化誘導療法の標的分子の同定を試みているのは世界で申請者らの研究グループだけである。その候補であるTSC-22の機能に関する報告は数多くあるが、その分子メカニズムにまで言及した報告はなく、この点に着目した試みも世界初である。本研究でTSC22D1ファミリータンパク質の細胞内局在およびTSC-22の核移行を証明し、核内での結合タンパク質候補を同定した。TSC-22と結合タンパク質候補の相互作用機序を明らかにすることで、TSC-22の細胞分化、細胞増殖性のメカニズムが解明できる可能性があり、TSC-22による口腔がん分化誘導療法の確立への可能性など非常に応用性のある研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、TSC-22に関する文献を参考に知識を得たうえで、「TSC-22はDNA障害により核移行し、核内で結合するタンパク質と相互作用し機能活性を得る」という仮説を立て、的確な研究計画を立案した。立案した研究を適切に遂行し、貴重な知見を得ている。この結果は、国際誌（International Journal of Molecular Sciences）へ掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。さらに

申請者は今後の研究計画も立案しており、継続性という点でも評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

International Journal of Molecular Sciences

(22 : 10913, 2021)