



Is SS-A/Ro52 a Hydrogen Peroxide-Sensitive Signaling Molecule?

信原, 由実子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4060

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004060>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	信原 由実子
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1862 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 19 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Is SS-A/Ro52 a Hydrogen Peroxide-Sensitive Signaling Molecule? (シェーグレン症候群特異的自己抗原 SS-A/Ro52 は過酸化水素感受性シグナル分子である?)

審 査 委 員

主 査	教 授	林 祥剛
	教 授	錦織 千佳子
	教 授	根木 昭

<緒言>

感染症、寒冷、紫外線などは自己免疫疾患の発症あるいは増悪に関わる環境因子として臨床的に知られている。これらはいずれも生体に対して酸化ストレスとして細胞レベルで作用し、細胞の生死や自己抗原の修飾などを通じて免疫系のホメオスターシス機構の障害を誘導し、自己免疫応答を惹起するものと考えられている。

SS-A/Ro52 はシェーグレン症候群や全身性エリテマトーデスにおける自己抗体の標的蛋白であるが、生理機能は不明である。ケラチノサイトにおいて UV-B 照射により Ro52 が細胞表面に表出することが知られ、亜急性ループスなどの原因となることが知られていた。我々は近年 UV-B のみならず酸化剤であるダイアミドがアポトーシスを介することなく、Ro52 をヒトケラチノサイト表面に発現させることを発見した。興味深いことに、この現象は同じ酸化剤である過酸化水素の刺激では起こらなかった。このことから酸化ストレスが Ro52 に対する抗体産生の一因となりうること、過酸化水素は UV-B やダイアミドとは、Ro52 に対して異なった作用をもつことが示唆された。一方、過酸化水素はその細胞毒性のほか、近年になり細胞内シグナル伝達や増殖のセカンドメッセンジャーとして作用することが分かってきたし、Ro52 もその構造上、RING-B-box/coiled coil family に属していることから、細胞内で蛋白-蛋白間の相互作用を介した多岐にわたる機能を持つことが予想される。このような背景から、我々は酸化ストレスによる Ro52 の細胞内動態への影響に興味を持った。

<目的>

酸化ストレスがどのような機序により Ro52 の細胞内動態に影響を与えるかを解明するため、Ro52 遺伝子をトランスフェクトしたケラチノサイト細胞株を樹立し、これを用いて酸化ストレス下の Ro52 の細胞内動態を検討した。

<方法および結果>

我々は Ro52-EGFP キメラ蛋白を恒常的に発現する細胞株を HaCaT 細胞（ヒト・ケラチノサイト細胞株）で樹立し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して、過酸化水素と UV-B、ダイアミド刺激下での細胞内動態を検討した。

Ro52-EGFP は主に細胞質内に局在していたが、過酸化水素の負荷後には、Ro52-EGFP は核内に著明に集積した。しかしながら UV-B やダイアミドの刺激では Ro52-EGFP の核内への集積は見られなかった。この結果をウェスタンにも検討した。HaCaT 細胞の野生株とヒトケラチノサイトに過酸化水素と UV-B を負荷したところ、過酸化水素の負荷後は核内の Ro52 の増加がみられたが、UV-B 負荷後は変化がなかった。さらに Ro52 の核内への集積は、抗酸化剤

NAC により用量依存性に減弱された。

MAPKinase cascade が過酸化水素により活性化されるという報告があることから、我々は MAPKinase の活動性が、過酸化水素による Ro52 の核内への移行に関与しているかどうかを検討した。Ro52-EGFP を恒常的に発現する HaCaT 細胞株に、MAPKinase 阻害剤である PD98059 (ERK)、SB203580 (p38)、SP600125 (JNK) を投与した上で過酸化水素を負荷したところ、いずれの阻害剤でも Ro52-EGFP の核移行は減少したが特に ERK の系の阻害剤で著減した。この Ro52 の核への移行に蛋白合成が必要であるかどうかを調べるために、サイクロヘキサマイド (CHX) を前投与の上、過酸化水素を負荷したところ、CHX の容量依存性に一部、Ro52 の核への移行は阻害された。このことから Ro52 の新たな産生と、またあるいは、Ro52 関連蛋白の産生が、Ro52 の核移行には必要である可能性が示唆された。

以上のことから、Ro52 が過酸化水素に選択的な、酸化ストレス応答シグナル分子である可能性が示唆された。

<考察>

過酸化水素は JNK や p38 よりも ERK1/2 の系をより刺激し、この過酸化水素-ERK1/2 経路が redox 応答転写因子である NF κ B や AP1 の活性化に関わるとする報告がある。我々の結果では Ro52 の核への移行が ERK の阻害剤で特に強い阻害を受けており、過酸化水素-ERK1/2 経路の下流で Ro52 が核に移行して酸化ストレスシグナルを伝達あるいはそれ自身転写因子として機能する可能性がある。一方の UV 照射では ROS 産生の oxygen dependent な ERK の活性化につながる signal cascade の他に、ribosome dependent な JNK の活性化につながる cascade があり、後者により強く働くという報告がある。UV と H₂O₂ の MAP Kinase への活性化の違いが、両者の違いを説明する理由の一つかもしれない。

過酸化水素で Ro52 が核移行する理由として、過酸化水素が蛋白のシステイン残基を標的として働く oxidant であることが挙げられる。一方のダイアミドはチオール基を標的としている。Ro52 の N 末端には、十数個のシステイン残基があり、このことから Ro52 が過酸化水素とダイアミドの刺激では、異なる三次元構造をとって、違う働きをする可能性が考えられる。またこの N 末端でシステイン残基は Cys-X-X-Cys モチーフを 4 個形成しているが、この構造は oxidants への感受性が強いことが知られており、過酸化水素が Ro52 のこの部位に作用し Redox 状態を変化させることにより、言い換えれば過酸化水素がセカンドメッセンジャーとして直接 Ro52 の未知の機能に作用しているのかもしれない。

<結び>

我々の結果から、Ro52 が過酸化水素 による酸化ストレスに応答して核に移行することが、初めて示された。過酸化水素は Ro52 の生理的機能を検索する有用なツールであり、Ro52 はおそらくストレス応答蛋白で、核のシグナル分子として機能している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 1864 号	氏 名	信原 由実子
論 文 題 目 Title of Dissertation	Is SS-A/Ro52 a Hydrogen Peroxide-Sensitive Signaling Molecule ? シェーグレン症候群特異的自己抗原 SS-A/Ro52 は過酸化水素感受性シグナル分子である？		
審 査 委 員 Examiner	主 査 林 祥 剛 Chief Examiner 副 査 錦織 45子 Vice-examiner 副 査 根 本 昭 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 19 年 6 月 20 日		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

要旨

感染症、寒冷、紫外線などは、自己免疫疾患の発症あるいは増悪に関わる環境因子として知られている。これらはいずれも生体に対して酸化ストレスとして細胞レベルで作用し、細胞の生死や自己抗原の修飾などを通じて、免疫系のホメオスタシス機構の障害を誘導し、自己免疫応答を惹起するものと考えられている。

SS-A/Ro52蛋白はシェーグレン症候群や全身性エリテマトーデスにおける自己抗体の標的抗原であるが、その生理機能は不明である。ケラチノサイトにおいてUV-B照射によりRo52が細胞表面に表出することが知られ、亜急性ループスなどの原因となることが知られているが、我々はUV-Bのみならず酸化剤であるダイアミドがRo52をヒトケラチノサイト表面に発現させることを発見した。興味深いことに、この現象は同じ酸化剤である過酸化水素の刺激では起こらなかった。このことから、酸化ストレスがRo52に対する抗体産生の一因となりうること、過酸化水素はRo52に対してUV-Bやダイアミドとは異なった作用をもつことが示唆された。一方、過酸化水素はその細胞毒性のほか、近年になり、細胞内シグナル伝達や増殖のセカンドメッセンジャーとして作用することが明らかになってきた。Ro52もその構造上、RING-B-box/coiled coil familyに属していることから、細胞内で蛋白-蛋白間の相互作用を介した多岐にわたる機能を持つことが予想される。

以上の知見に基づき、本研究では、酸化ストレスがどのような機序によりRo52の細胞内動態に影響を与えるかを解明するため、Ro52-EGFPキメラ蛋白を恒常的に発現するケラチノサイト細胞株を樹立し、これを用いて酸化ストレス下のRo52の細胞内動態を検討した。

Ro52-EGFP恒常発現株では、Ro52-EGFPは主に細胞質内に局在していたが、過酸化水素の負荷後には、Ro52-EGFPは核内に著明に集積した。一方UV-Bやダイアミドの刺激ではRo52-EGFPの核内への集積は見られなかった。この結果をウェスタンブロットにても検討したところ、野生株とヒトケラチノサイトにおいても過酸化水素による核内集積を認めた。さらにRo52の核内への集積は、抗酸化剤NACにより用量依存性に減弱された。

次に、MAPKinase cascadeが過酸化水素により活性化されるという報告があることより、我々はMAPKinaseが、過酸化水素によるRo52の核内への移行に関与しているかどうかを検討した。Ro52-EGFPを恒常的に発現するHaCaT細胞株に、MAPKinase阻害剤を投与した上で過酸化水素を負荷したところ、いずれの阻害剤でもRo52-EGFPの核移行は減少したが特にERK阻害剤で著減した。このRo52の核への移行に蛋白合成が必要であるかどうかを調

べるために、サイクロヘキサマイド (CHX) を前投与の上、過酸化水素を負荷したところ、CHXの容量依存性に一部、Ro52の核への移行は阻害された。このことからRo52の新たな産生と、またあるいはRo52関連蛋白の産生が、Ro52の核移行には必要である可能性が示唆された。

我々の結果から、Ro52 が過酸化水素 による酸化ストレスに応答して核に移行することが、初めて示された。本研究によって、過酸化水素が Ro52 の生理的機能を探索する有用な刺激系であり、また Ro52 はストレス応答性の核シグナル分子として機能している可能性が示唆された。

本研究は、酸化ストレスの自己抗原 SS-A/Ro52 に与える影響について従来の研究を大きく進展させ、これまで不明であった Ro52 の生理的機能—ストレス応答性の核シグナル分子の可能性—の解明において、重要な知見を得たものとして、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。