



SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production

Siti Nur Aisyah Jauharoh

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5447

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005447>

※ 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。



学位論文の内容要旨

SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production

自己抗原SS-A/Ro52はBcl-2の抑制を介して細胞をアポトーシスに導く

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

臨床病態・免疫学

(指導教員：錦織 千佳子 教授（客員教授・特命教授 等）)

Siti Nur Aisyah Jauharoh

SUMMARY

Backgrounds

SS-A/Ro52/TRIM21, a 52-kDa ribonucleoprotein, is targeted by autoantibodies in Sjögren's syndrome (SS) and systemic lupus erythematosus (SLE). Although the mechanism of anti-Ro52 Abs generation is not fully understood, Ro52 might be expressed within apoptotic blebs during apoptosis evoked by certain stimuli. On the other hand, we recently reported an alternative mechanism by which oxidative stress caused by UV-B and an oxidant, diamide, induces Ro52 to appear on keratinocytes without inducing apoptosis. In contrast, H₂O₂ induces Ro52 translocation from the cytoplasm to the nucleus, suggesting that Ro52 may serve as an oxidative stress-sensitive signaling molecule.

Ro52, also called the TRIM (tripartite motif) family, belongs to the RING/B-box/coiled-coil (RBCC) structure, which appears to carry out highly diverse functions within cells. In many TRIM proteins, including Ro52, the RING domain has E3 ubiquitin ligase activity that can mediate autoubiquitylation of the TRIM protein itself along with other proteins. Ro52 was recently shown to serve as a high affinity immunoglobulin (Ig) receptor. Importantly, Ro52 is reported to bind to the virus-antibody complexes which have penetrated cells, and Ro52 destroys them with its ubiquitinase activity. On the other hand, *in vitro* studies have shown that Ro52 might downregulate immune responses by targeting IFN-responsive factors such as IRF3, IRF7, and IRF8 and by interfering with the production of proinflammatory cytokines and activation of NF- κ B by ubiquitinating IKK β . Furthermore, evidence that Ro52 modulates the immune response is seen in Ro52-knockout mice, which develop SLE-like systemic autoimmunity.

Aim of study

In this study, we investigate the physiological role of endogenous Ro52 in response to various types of stimulations including oxidants, cytokines and anti-cancer agents.

Methods

To determine Ro52's role during stress, we performed knockdown of Ro52 protein utilizing transient transfection with Ro52-specific siRNA in HeLa cells stimulated with various types of apoptotic stimuli. Annexin-V analysis and TUNEL assay were carried out for apoptosis detection. We conducted western blot analysis to identify the effect of Ro52 knockdown on p53 and vice versa in Ro52-mediated apoptosis. Furthermore, the effect of Ro52 knockdown on Bcl-2 family molecules were analyzed by western blot analysis and quantitative RT-PCR.

Results

Flow cytometric analysis disclosed that there was a significant decrease in annexin V-positive cells among Ro52^{low} HeLa cells as compared to wild-type HeLa cells, whether untreated or 24 h exposed to H₂O₂, diamide, IFN- α , IFN- γ and anti-Fas Ab, etoposide, or γ -irradiation. These suggest that Ro52 acts as a proapoptotic molecule either in normal or under stress conditions. We also conducted dose-dependent experiments in both Ro52^{low} and control HeLa cells cultured in the presence of H₂O₂ or diamide for 24 h. The apoptotic level decreased in Ro52^{low} HeLa cells incubated with either low or high concentration of H₂O₂, while it decreased only with higher concentrations of diamide (400 μ M). To confirm this phenomenon, we used a TUNEL assay to analyze apoptosis-associated DNA fragmentation in the stimulated Ro52^{low} HeLa cells. Consistent with these results, Ro52^{low} HeLa cells displayed less apoptotic morphology than control cells.

Western blot analysis was conducted to determine whether Ro52 expression in HeLa cells was affected by cytokines or various apoptotic stimuli. It revealed that while Ro52 levels did not change noticeably in HeLa cells treated with H₂O₂, diamide, or γ -irradiation, they increased significantly 24 h after stimulation with IFN- α , IFN- γ and anti-Fas Ab, or etoposide. Analysis of cytoplasmic and nuclear fraction showed that Ro52 accumulated in the nucleus of HeLa cells stimulated with IFN- α , IFN- γ and anti-Fas Ab, or etoposide, but not with H₂O₂, diamide, or γ -irradiation, although these latter three stimuli

induced similar levels of apoptosis. These findings indicate that Ro52 nuclear translocation occurs in response to specific stimuli. Collectively, the Ro52-mediated apoptotic process occurs regardless to Ro52 nuclear translocation.

To examine whether p53 is involved as an upstream molecule inducing Ro52-mediated apoptosis or not, we analyzed Ro52 expression in HeLa cells transfected with either p53-specific or control siRNA. Ro52 levels did not differ between p53^{low} or control HeLa cells. Ro52 was upregulated in both p53^{low} and control cells treated with IFN- α , etoposide, or IFN- γ and anti-Fas Ab. The same experiments performed in the p53-null SKOV-3 and p53-germline MCF-7 cells also showed the Ro52 upregulation in the presence of IFN- α , IFN- γ and anti-Fas Ab, or etoposide. Thus, Ro52-mediated apoptosis is not regulated by p53. To investigate the possibility that Ro52 might regulate p53 expression and exert a proapoptotic effect through a p53-mediated pathway, we conducted western blot analysis for p53 expression in Ro52^{low} HeLa cells. It showed that there was no difference in p53 expression between Ro52^{low} and control HeLa cells, as confirmed by the H₂O₂ dose-dependent experiments. Therefore, Ro52 did not influence to p53 expression. Taken together, the Ro52's proapoptotic effect is independent of p53.

As Bcl-2 family molecules are important in regulating apoptosis, we examined the effect of knocking down Ro52 on the expression of Bcl-2 family molecules in HeLa cells. Western blot analysis revealed that Bcl-2 was upregulated by Ro52 knockdown in the presence of apoptotic stimuli, but Bax, Bcl2-A1 (Bfl-1), and Bcl-x_L were not. Notably, Bcl-2 levels in Ro52^{low} cells were higher than in control cells even in the absence of apoptotic stimulation, which parallels the finding of lower apoptosis in non-treated Ro52^{low} HeLa cells. These results suggest that Ro52's apoptotic effect may be a fundamental mechanism for maintaining cellular homeostasis. In addition, QT-PCR confirmed the upregulation of Bcl-2 mRNA after apoptotic stimulations in Ro52^{low} HeLa cells, which indicates that Ro52 regulates the Bcl-2 protein at the transcriptional level. These results demonstrated that Ro52 selectively downregulates Bcl-2 mRNA transcription, and suggested that Ro52 may exert its proapoptotic effect by downregulating Bcl-2 expression.

We showed that in response to various types of apoptotic stimuli, Ro52 cause apoptosis in HeLa cells by stimulating the intrinsic pathway of apoptosis via suppression of Bcl-2 transcription. In viral infection, which induces high IFN- α production to host cells, Ro52 which is induced by IFN- α may cause apoptosis to host cells by negatively regulating the Bcl-2-mediated anti-apoptotic system. Thus, Ro52 might act as an effector molecule to kill host cells from the inside. Ro52 is an autoantigen in SS and SLE. It is plausible that the proapoptotic and ubiquitinase activities of Ro52 might be attenuated by the existence of intra-cellular anti-SS-A antibody in those diseases. Our study also showed that apoptosis occurred in HeLa cells stimulated with H₂O₂, diamide, or γ -irradiation even when Ro52 nuclear accumulation was not detected, while Ro52 was accumulated in the nucleus in response to apoptotic stimuli including IFN- α , etoposide or IFN- γ and anti-Fas Ab. These results suggest that Ro52 nuclear accumulation may not be directly linked to apoptosis. Interestingly, we showed that the apoptosis triggered by etoposide was attenuated by downregulation of Ro52, and the Ro52-related apoptosis is independent of p53. Since etoposide is known to cause apoptosis in a p53-dependent pathway, our results suggest that etoposide may cause apoptosis in both p53-dependent and -independent pathways. In this study, we added a new role of Ro52 as a proapoptotic molecule in addition to that of ubiquitinase activity. However, the role of nuclear translocation of Ro52 upon various stimuli is still unknown. Therefore, further investigation is required to reveal the unknown roles of Ro52 in apoptotic pathways and intracellular immunity.

In summary, Ro52 function is connected to various environmental stimuli and is important in inducing apoptosis by repressing Bcl-2 production. Since Ro52's proapoptotic effect is independent of p53, Ro52 may be another critical gatekeeper of cell damage. These findings shed light on a novel function of Ro52 that is important to intracellular immunity.

自己抗原 SS-A/Ro52 は Bcl-2 の抑制を介して細胞をアポトーシスに導く

52-kDa)のリガ核蛋白であるタンパク質 SS-A/Ro52 (TRIM21) (以下 Ro52)はシェーグレン症候群(以下 SS)や全身性エリテマトーデス (以下 SLE) における自己抗原である。Ro52 蛋白は細胞内で多彩な機能を持つとされる TRIM ファミリーに属する。Ro52 を含む多くの TRIM ファミリー分子のリングフィンガー領域は、それ自身やほかの蛋白質のユビキチン化する E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つ。TRIM ファミリー分子は、インターフェロン (IFN)や病原体認識受容体の下流において機能し、IFN-regulatory factor 3 (以下 IRF3) や NF- κ Bなどを活性化し、細菌やウイルス感染に対する自然免疫作用を調節する。また、Ro52 は最近高親和性の免疫グロブリン受容体としての生理作用を持つことが明らかにされた。HeLa 細胞内において、Ro52 はウイルスと抗体の複合体と直ちに結合し複合体を速やかにプロテアソームへと導き分解させる。これは、獲得免疫反応としての細胞内病原体破壊機構が存在し、Ro52 がそれに関与することを示している。他方、Ro52 は IRF 系を抑制したり、IKK α をユビキチン化することにより炎症性サイトカインの産生や NF- κ B の活性化を抑制する。以上のことから、自己抗原 Ro52 は、免疫系の調節に深く関与すると推定され、実際に Ro52 欠損マウスは SLE 様の全身性自己免疫疾患を発症する。以上のように、Ro52 は E3 ユビキチンリガーゼ、IgG 受容体、そして自己免疫疾患における自己抗原として機能する。Ro52 は ultraviolet-B (以下 UV-B)、ウイルス感染、TNF- α などの刺激によりアポトーシス細胞の細胞表面のプレプに発現されると報告されているが、我々はこれまでに、皮膚角化細胞にて UV-B や酸化剤 diamide の酸化ストレスにより、アポトーシスを伴わずに Ro52 がケラチノサイトの表面に表出する抗原提示に紫外線などの酸化ストレスが関与している可能性があること、またヒト唾液腺腺癌由来細胞株 HSG にて UV-B や diamide と異なり過酸化水素が Ro52 の核への移行を誘導することから Ro52 が酸化ストレス感受性のシグナル分子である可能性を報告している。

本研究では、我々は Ro52 の機能をさらに詳しく明らかにすることを目的として、HeLa 細胞を RNAi の手法を用いて Ro52 をノックダウンし、酸化ストレスや各種アポトシス誘導刺激をおこない解析した。その結果、AnnexinV や TUNEL アッセイにより、Ro52^{low}

の HeLa 細胞は野生型 HeLa 細胞よりも、過酸化水素や Diamide により誘発されるストレス、IFN- α 刺激、IFN- γ と抗 Fas 抗体による共刺激、抗がん剤エトポシド刺激、 γ 線照射により誘発されるアポトーシスに対して、有意に抵抗性であることが明らかになった。また、興味深いことに、アポトーシス誘導刺激がなくとも、Ro52^{low} の HeLa 細胞はアポトーシスを起こしにくいことがわかった。種々のアポトーシス誘導刺激で Ro52 の核内移行をみたところ、IFN- α 刺激、IFN- γ ならびに抗 Fas 抗体による共刺激、抗がん剤エトポシド刺激にて Ro52 の核内移行が見られたが、過酸化水素、Diamide、 γ 線照射では核内移行が起こらなかった。どちらの群にもアポトーシスは惹起されているため、Ro52 の核内移行はアポトーシス誘導において必ずしも必須ではないことが明らかになった。さらに、HeLa 細胞において種々の刺激において、Ro52 の蛋白発現量は p53 蛋白のレベルに依存しないこと、逆に Ro52 の発現量は p53 の蛋白発現量依存しなかった。次に Ro52 の発現を SiRo52 によるノックダウンにて抑えると Bcl-2 蛋白の発現誘導がおこることがウェスタン解析により明らかになった。しかも、Bcl-2 ファミリー分子のウェスタン解析の結果から、この発現誘導は Bcl-2 ファミリー分子の中で Bcl-2 に特異的であった。定量的 RT-PCR 法により、この Bcl-2 分子の発現誘導は mRNA レベルで制御されていることが確認された。以上の実験結果は、Ro52 が普遍的なアポトーシス誘導蛋白であり、p53 に依存せず、抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現抑制がそのアポトーシス誘導の機序であることを示した。Ro52 発現を制御している細胞内経路の解明、Ro52 の核内移行の役割の解明、抗 Ro52 抗体陽性患者の Ro52 動態（ウイルス感染への影響、自己抗原・自己抗体複合体への影響など）の解明などは、今後のさらなる研究課題である。

本研究は、Bcl2-2 抑制によるアポトーシス誘導という Ro52 分子の新しい作用機序を明らかにしたものであり、Ro52 の生理的役割を考える上で価値ある研究と考える。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2242号	氏 名	Siti Nur Aisyah Jauharoh
論文題目 Title of Dissertation	SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production (自己抗原 SS-A/Ro52 は Bcl-2 の抑制を介して細胞を アポトーシスに導く)		
審査委員 Examiner	主 査 片岡 徹 Chief Examiner 副 査 平田 健一 Vice-examiner 副 査 西 慎一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

リボ核蛋白質 SS-A/Ro52 (TRIM21) (以下 Ro52) はシェーグレン症候群や全身性エリテマトーデス (以下 SLE) における自己抗原である。Ro52 を含む多くの TRIM ファミリー分子のリングフィンガー領域は、それ自身やほかの蛋白質をユビキチン化する E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つ。TRIM ファミリー分子は、インターフェロン (IFN) や病原体認識受容体の下流において機能し、IRF3 や NF- κ B など活性化し、細菌やウイルス感染に対する自然免疫作用を調節する。また、最近、Ro52 は高親和性の免疫グロブリン受容体として機能し、ウイルス-抗体複合体と結合してプロテアソームへと導き分解させるという細胞内病原体破壊機序に関与することが示された。他方、Ro52 は IRF 系を抑制したり、IKK α をユビキチン化することにより向炎症性サイトカインの産生や NF- κ B の活性化を抑制する。以上のことから、Ro52 は、免疫系の調節に深く関与すると推定され、実際に Ro52 欠損マウスは SLE 様の全身性自己免疫疾患を発症する。Ro52 は ultraviolet-B (以下 UV-B)、ウイルス感染、TNF- α などの刺激によりアポトーシス細胞の細胞表面のプレブに発現されると報告されているが、本研究者の所属する研究室は、これまでに、皮膚角化細胞にて UV-B や酸化剤 diamide の酸化ストレスにより、アポトーシスを伴わずに Ro52 がケラチノサイトの表面に表出され抗原提示に関与する可能性があること、また、ヒト唾液腺腫瘍由来細胞株 HSG にて UV-B や diamide と異なり過酸化水素が Ro52 の核移行を誘導することから Ro52 が酸化ストレス感受性のシグナル分子である可能性があることを報告してきた。

本研究者は、Ro52 の機能をさらに解明することを目的として、HeLa 細胞において RNAi の手法を用いて Ro52 をノックダウンし、酸化ストレスや各種刺激依存性のアポトーシス誘導に対する影響を解析した。その結果、Annexin V および TUNEL アッセイにより、Ro52 ノックダウン HeLa 細胞は野生型 HeLa 細胞よりも、過酸化水素や diamide、IFN- α 刺激、IFN- γ と抗 Fas 抗体による共刺激、抗がん剤エトポシド、 γ 線照射により誘発されるアポトーシスに対して、抵抗性をもつことが明らかになった。また、アポトーシス誘導刺激がなくとも、Ro52 ノックダウン HeLa 細胞はアポトー

シスを起こしにくいことがわかった。種々のアポトーシス誘導刺激で Ro52 の核内移行を調べたところ、IFN- α 刺激、IFN- γ ならびに抗 Fas 抗体による共刺激、抗がん剤エトポシドにて Ro52 の核内移行が見られたが、過酸化水素、diamide、 γ 線照射では核内移行が起こらなかった。どちらの群でもアポトーシスは惹起されているため、Ro52 の核内移行はアポトーシス誘導において必ずしも必要ではないことが明らかになった。さらに、HeLa 細胞での種々の刺激において、Ro52 の発現量は p53 蛋白質のレベルに依存せず、p53 の発現量は Ro52 のレベルに依存しなかった。次に Ro52 の発現を siRNA により抑制すると Bcl-2 蛋白質の発現誘導が観察された。この発現誘導は Bcl-2 ファミリー分子の中で Bcl-2 に特異的であった。定量的 RT-PCR 法により、この Bcl-2 分子の発現誘導は mRNA レベルで制御されていることが確認された。以上の実験結果は、Ro52 が普遍的なアポトーシス誘導蛋白質であり、そのアポトーシス誘導機序は p53 に依存せず、抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現抑制によることを示唆した。Ro52 発現を制御する細胞内経路の解明、Ro52 の核内移行の役割の解明、抗 Ro52 抗体陽性患者の Ro52 動態（ウイルス感染への影響、自己抗原・自己抗体複合体への影響など）の解明などが、今後の研究課題として挙げられる。

本研究は、自己抗原分子 Ro52 について、そのアポトーシス誘導における機能を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった Bcl-2 抑制によるアポトーシス誘導という作用機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。