

論文の内容の要旨

論文題目 癌抑制遺伝子 **BRCA1** の転写活性化領域に結合する転写

共役因子群の解析

指導教官 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成7年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 和田 修

1) 緒言および目的

全ての乳癌のうちおよそ 5~10%は家族性発症であることが知られている。家族性乳癌・卵巣癌発症の有力な原因候補遺伝子として知られている **BRCA1** (Breast cancer susceptibility gene 1) は、家族性乳癌家系において、およそ半数で変異が見られると報告されている。**BRCA1** 変異キャリアーが有する腫瘍は、残りの野生型のアレルの **BRCA1** 遺伝子が失われているか、もしくは不活性化しているため、**BRCA1** は癌抑制遺伝子として作用しているものと考えられている。

BRCA1 は核内局在の巨大遺伝子であり、既知のアミノ酸との全体的な相同性は少ない。生物学的な役割は、ユビキチン活性、細胞周期の制御、細胞増殖抑制、転写制御、DNA 損傷修復、相同組み換えによるゲノムの安定性制御などといった広範な機能に関わっていると報告がされている。カルボキシ末端に位置する **BRCT** 領域は、**GAL4** DNA 結合領域との融合タンパクを細胞内で発現させると転写活性化能を示すが、癌家系で見られる **BRCT** 領域内での点変異では、転写活性化能が失われることが知られている。**BRCT** リピートの後半の領域を除いたマウスは胎生致死であり、細胞死が胚の広範囲におきていること、**BRCT** はコファクターと結合しながらクロマチン構造の解除を行うことから、**BRCT** 領域に存在する転写活性化能は、正常な細胞発育、増殖制御に対して非常に重要な役割を担うものであることが予想される。よってこの領域の転写活性化能、および転写活性化能の制御に関与する遺伝子の存在についての解明は急務である。

本研究では核内レセプターに結合する、クロマチン再構成に関与する複合体として知られている **TRAP** (Thyroid hormone receptor associated proteins) 複合体の中の、核内レセプターにリガンド依存的に結合する架橋因子である **TRAP220** が、野生型 **BRCT** 複合体に特異的に結合することを明らかにし、さらにその結合が細胞の正常な発育に対して影響を与えうる可能性について検討する。

2) 材料と方法

BRCT を含む複合体のアフィニティーカラム精製

アフィニティーカラムは陽イオンカラム phosphocellulose column (P11)と下記の GST 融合タンパクカラムの2種類を用いた。

BRCT 領域は、アミノ酸 1528~1863 を用いた。野生型 BRCT、点変異によるミスセンス変異体である BRCT A1708E、P1749R、M1775R の四種類の BRCT 領域をタンパク発現ベクターに組み込み、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパクとして大腸菌内でタンパク発現誘導を行い GST アフィニティーカラムとして使用した。

HeLa S3 細胞から核抽出液を調整し P11 カラムとインキュベートして、結合するタンパク複合体分画を溶出し、溶出液を GST 融合 BRCT (野生型) または GST 融合 BRCT (変異体) のいずれかとインキュベートすることにより複合体を精製した。結合分画を BRCT 結合複合体とした。

Liquid HAT、HMT assay

等しいタンパク量の複合体を、基質と、さらに ^3H 標識された acetyl CoA または S-Adenosyl-[methyl- ^3H]-methionine と混和し HAT (ヒストンアセチル化)、HMT (ヒストンメチル化) 反応を行った。反応液はフィルターにしみ込ませ、liquid scintillation counter にて放射線活性測定した。

GST pull down assay

hGCN5 および TRAP220 の全長とその分割された断片を、各々発現ベクター-pcDNA3 にサブクローンし [^{35}S] methionine 標識したタンパクを発現させた。GST 融合タンパクと標識タンパクを低温下にインキュベートし、GST 融合タンパクに結合した標識タンパクを SDS-PAGE で泳動してバンドを解析した。

免疫沈降法、ウェスタンブロットティング

293E 細胞に発現ベクター(pcDNA FLAG BRCA1, pcDNA TRAP220 Myc/His) をリポフェクション法でトランスフェクションした。細胞を回収後、細胞溶解液を anti-FLAG M2 agarose と混和し FLAG epitope に結合する免疫複合体を精製した。ビーズを洗浄した後に SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロットティングを行った。

トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性測定

293T 細胞をリポフェクション法でトランスフェクションした。ルシフェラーゼレポーター遺伝子、pM ベクター、internal control 用ベクター、発現ベクターを、トランスフェクションし、細胞を回収後 Firefly luciferase 活性を測定した。トランスフェクション効率は正のため Renilla luciferase 活性も同時に測定した。

3) 実験結果

BRCT 複合体の構成成分、ヒストン修飾能について

BRCT を含む複合体のアフィニティーカラム精製により、GST-BRCT 野生型、変異体複合体を各々精製した。複合体の構成成分を同定するため MALDI-TOF/MS を行ったが、転写活性化因子は得られなかった。精製分画が HAT 活性および HMT 活性を持つかどうかを検討したが、BRCT 野生型、変異体どちらの複合体も強い HAT、HMT 活性を示すことが判明した。転写活性化能の有無に関わらず HAT 活性は存在するため、転写活性化のためには HAT 活性以外のものが必須であることが示された。転写活性化因子を同定する目的でウェスタンブロッティングを行い、hTAFp250、TRAP220 が BRCT の野生型に特異的に結合することが判明した。hGCN5 は GST pull down 法にて野生型、変異体のどちらにも結合することが判明した。

TRAP220 は細胞内において BRCA1 と結合する

BRCA1 がヒト細胞内で TRAP220 と相互作用するか否かを 293E 細胞に発現させることで検討したが TRAP220 と BRCA1 は特異的に共沈降するので 293E 細胞内において TRAP220 と BRCA1 は結合していることが判明した。

BRCT と TRAP220 の結合領域の同定

TRAP220 の BRCT との結合領域の同定のため、TRAP220 の全長を 5 断片に分けた。5 断片を各々 *in vitro* 翻訳し、^[35S] methionine 標識されたタンパクを GST-BRCT と共にインキュベートし、SDS-PAGE にて泳動後イメージアナライザーにて解析した。その結果 TRAP220 のアミノ酸末端が BRCT との結合領域であることが判明した。

In vitro における TRAP220 と BRCT の結合 TRAP220 の BRCT に対する転写活性増強効果

野生型 BRCT、変異体 BRCT A1708E、P1749R、M1775R と TRAP220 との結合の差を検討するため GST pull down assay を行ったが、野生型 BRCT のみが TRAP220 と特異的に結合することが判明した。

TRAP220 が BRCT の転写活性化能に正または負の影響を与えるかを検討してみた。TRAP220 を GAL-BRCT と同時に 293T 細胞に発現させたところ、ルシフェラーゼ活性はおよそ 2 倍の増強作用を示した。この転写活性の増強は GAL-BRCT に特異的なものであった。TRAP220 のアンチセンスの発現ベクターをトランスフェクションすると、この転写活性増強効果は抑制された。

4) 考察

BRCT の野生型に特異的に結合するタンパク群が、BRCT の転写活性化能に対して重要な役割を担うものと推測された。また HAT、HMT 活性測定より、転写活性化のためにはヒストン修飾能以外のものが必須で

あることが予想された。

現在、提唱されている転写のモデルは two step model と呼ばれ、ヒストンのアミノ酸末端のリジン残基がアセチル化酵素によりアセチル化される (first step) ことで標的遺伝子のヌクレオソーム構造が変化し、クロマチン構造修飾因子による効果でクロマチンの構造が変化し(second step) DNA に転写因子が結合しやすくなることにより転写がより効果的に増強するという考えである。ヒストンアセチル化は転写にとって重要なステップではあるが、それだけでは転写が十分に進むわけではない。TRAP 複合体はクロマチン構造修飾を行う mediator complex であることが知られている。またコアクチベーターとして基本転写因子群に作用するが、TRAP には HAT 活性を持つタンパクが含まれていない。野生型 BRCT と変異体 BRCT の複合体は共に HAT 活性を持つが、HAT 活性だけでは転写を進ませるには不十分である可能性があり、基本転写因子に含まれる BRCA1 には TRAP 複合体のような mediator complex が結合する、そして TRAP220 は BRCA1 と TRAP の複合体形成に架橋的役割を担うという可能性が考えられた。

免疫沈降法により、BRCA1 と TRAP220 はヒトの細胞である 293E 細胞において複合体をなしていたため、この複合体形成は内在性のものであることが示された。

トランスフェクションにより BRCT の転写活性を TRAP220 は増強することが判明した。よって BRCA1 と TRAP220 とのクロストークには、ルシフェラーゼ活性測定で用いられたプロモーターの下流に存在する遺伝子の発現において機能するものと考えられ、生物学的な重要性があるものと考えられた。BRCT の点変異で転写活性増強の効果がなくなることも考えると、BRCT と TRAP220 との結合が癌関連の変異により失われることは、BRCA1 の下流の遺伝子（細胞周期関連）の発現、正常な細胞発育、増殖調節にとって極めて重要であるものと考えられた。

変異体 BRCA1 の発癌性については、TRAP 複合体が何らかの形でクロマチン再構成機能の面から関与している可能性が以上より考えられたが、そのような報告は現在までのところない。今後 BRCA1 の持つ生物学的役割に、TRAP220 がどのように関与してくるかについても含め検討する必要があるものと思われる。