

審査の結果の要旨

氏 名 和 田 修

本研究は、家族性乳癌の原因候補遺伝子である BRCA1 の持つ転写活性化能が細胞の正常な発育に必須である点に着目し、転写活性化に重要な役割を演じていると考えられる、転写活性化因子（群）を取得することを目標とし、タンパク複合体精製を行ったものであり下記の結果を得ている。

1. 陽イオンカラム、GST アフィニティーカラムを用いた二段階のカラム精製により、BRCT 野生型、変異体（BRCT A1708E、P1749R、M1775R）と相互作用するタンパク複合体を精製した。その複合体成分がヒストン修飾能を持つかどうかについて、ヒストンアセチル化反応、ヒストンメチル化反応を行ったが、BRCT 野生型、変異体のどちらの複合体にもヒストン修飾能があることが判明した。変異体には転写活性化能がないが、転写活性化能の有無に関わらず、ヒストンアセチル化活性は存在するため、転写活性化のためにはヒストンアセチル化活性以外のものが必須であることが示された。

2. BRCT 複合体を形成する因子群を同定するためにウェスタンブロッティングを行ったところ、BRCT 複合体中に、hTAFp250、hGCN5、p300、TRAP220 などが含まれることが判明した。GST pull down 法で hGCN5 と BRCT との結合パターンを検討してみたところ、hGCN5 は野生型、変異体 BRCT のいずれにも直接結合することが分かった。野生型 BRCT 複合体に特異的に含まれているのは hTAFp250 と TRAP220 の二つであった。

3. BRCA1 がヒト細胞内で TRAP220 と相互作用するか否かを、各々の発現ベクターを 293E 細胞に発現させることで検討したが、TRAP220 と BRCA1 は特異的に免疫共沈降するので 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。

4. 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* translation し、GST pull down assay を行った。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。

5. 野生型 BRCT、点変異体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。

6. TRAP220 が BRCT の転写活性化能に影響を与えるか否かを検討するため 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。

以上、本論文は BRCA1 と TRAP220 が *in vitro* および *in vivo* において結合しうること、協調的な転写活性化能を持つことを明らかにし、これまで BRCA1 に結合することが知られていなかった Mediator 複合体の関与について明らかにした。よって学位の授与に値するものと考えられる。