

[別紙1]

論文題目 癌抑制遺伝子 BRCA1 と相互作用する新規転写／修復共益因子複合体の機能解析

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 13 年 4 月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

大石 元

【緒言】

食生活の欧風化に伴い、本邦でも乳癌の発症頻度は上昇している。乳癌症例のほとんどは孤発性のものであるが、約 5-10%が家族性に発症するといわれている。1994 年、家族性乳癌の遺伝子解析が進められ、ポジショナルクローニング法により BRCA1, BRCA2 が同定された。BRCA1 は遺伝子座 17q21 に存在し、家族性乳癌においては約半数に BRCA1 あるいは BRCA2 に変異を認め、家族性乳癌・卵巣癌家系では約 90%に変異を認めると報告されている。BRCA1 変異キャリアーの有する腫瘍は残りの野生型のアレルの BRCA1 遺伝子が失われるか不活化していることが分かっている。BRCA1 変異を持つキャリアーでは生涯乳癌罹患率が 50-85%であり、卵巣癌に関しては 15-60%といわれている。

BRCA1 は癌抑制遺伝子として機能しており、その機能が障害される家族性変異では乳癌あるいは卵巣癌が高率かつに若年性に発生する。BRCA1 の細胞内での機能は多彩であり、①DNA 損傷修復(特に相同組み替えを必要とする 2 重鎖切断の修復)、②タンパクユビキチン化(その標的タンパクは同定されていない)、③転写調節(DNA 損傷などの細胞ストレスに対して応答する遺伝子群の発現調節)、④細胞周期調節(G1/S, G2/M 期で細胞周期を停止)といった生物学的なプロセスに関与している。その多岐にわたる機能の一部は BRCA1 に相互作用する特定のタンパク質との結合を介して発現される。BRCA1 は DNA 修復・転写制御などに関連し、核内レセプターであるエストロゲンレセプター α (ER α)と相互作用するが、その機能はいまだに不明な点が多い。また、BRCA1 の不活性化がどのような機序で発癌に至るのかはまだ明らかになっていない。

BRCA1 は 220kDa(1863 アミノ酸)の核タンパクであり、アミノ酸末端に RING フィンガー領域およびカルボキシル末端に BRCT(BRCA1 C-Terminus)モチーフの 2 回反復構造といった保存されたドメイン構造を有している。しかしながら、全体的な相同性を持つ既存のタンパクは知られていない。2 回繰り返しの BRCT モチーフは BRCA1 だけでなく DNA 損傷を受けた際に細胞周期を調節する複数の遺伝子で認められている。BRCT 領域の変異は家族性乳癌で頻発しており、BRCT の変異体では BRCA1 の DNA 損傷修復能および転写活性化能の両機能が低下する。すなわち BRCT 領域は BRCA1 の機能発現の上で非常に重要な部位である。本研究では、BRCT 領域と相互作用する転写/修復共役因子を同定し、その機能を解析した。

【方法および結果】

HeLa S3 細胞浮遊培養系より Dignam の方法に準じて核タンパクを調整し、陽イオンカラム(P11)と GST 融合した BRCT 領域を固定化したアフィニティーカラムを使用して BRCT と結合するタンパク複合体を精製し、MALDI/TOF-MS 法により同定した。カラムより溶出させた複合体の中には、ヒストンアセチル化複合体であり ER α とエストロゲン存在下で結合し、ER α の転写活性化因子として作用する TRRAP/hGCN5 が存在することがわかった。さらに複合体の構成因子を解析するため、hGCN5 を恒常的に発現する MCF-7 乳癌細胞を用いて精製を行った。詳細な複合体精製のために、アフィニティー精製の溶出液をグリセロール密度勾配法にかけ、複

合体を分離した。目的の複合体画分をさらに TOF-MS にて解析したところ TRRAP/hGCN5 複合体以外に MSH2/MSH6 といったミスマッチ修復に関与する因子が含まれていることが明らかになった。MSH2/MSH6 は、BRCA1 と結合する巨大な DNA 修復因子複合体 BASC (BRCA1 associated genome surveillance complex) の構成因子であることが分かっているが、このほかの BASC の構成因子は見出されなかった。また、この複合体には ER α は含まれなかった。

この BRCT-interacting hGCN5/TRRAP 複合体 (TRRAP/hGCN5/MMSH2/MSH6 複合体) と BRCA1 のタンパク間結合は GST pull down 法、免疫共沈降法、Far Western Blotting 法を用いて検討した。GST pull-down 法および Far Western Blotting 法では、野生型 BRCT と TRRAP/hGCN5/MSH2/MSH6 複合体は TRRAP を介して結合し、乳癌家系でみられる点変異型 BRCT は TRRAP と結合せず、この複合体との結合は無くなることが明らかとなった。免疫共沈降法では、乳癌細胞において TRRAP/hGCN5/MMSH2/MSH6 は細胞内で内在性の複合体として共存することが分かった。また、DNA 修復複合体 BASC の構成因子である RAD50 も共存していることが分かった。乳癌細胞以外の腎臓由来あるいは肝臓由来の細胞では BRCA1 と TRRAP/hGCN5 の複合体形成を確認することはできなかった。

BRCT の転写活性化能は、BRCT と gal4-DNA 結合領域とのキメラタンパクを細胞内で発現させ、gal4 system を組み込んだプラスミドをレポーターとして MCF-7 乳癌細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性の測定により検討した。野生型 BRCT の転写活性化能は BRCT-interacting hGCN5/TRRAP 複合体 (TRRAP/hGCN5/MSH2/MSH6 複合体) 存在下でより増強した。RNAi 法にて各因子の発現を減弱させると、BRCT の転写活性化能は減少した。hGCN5 のヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性の活性中心部分に点変異を入れ、その活性を減少させた突然変異体を用いたところ、BRCT の転写活性化能は弱まった。また、ER α の転写活性化能に対する影響を見るため、ERE-TATA をプロモーターに組み込んだルシフェラーゼアッセイの系で BRCA1 及びこの複合体による転写活性の変化を見た。ER α の転写活性は E₂ 存在下で BRCA1 により抑制されるが、TRRAP/hGCN5 を強制発現させるとその抑制が解除された。次に、BRCT-interacting hGCN5/TRRAP 複合体の構成因子が BRCA1 のコアクチベーターとして機能するべく、BRCA1 に結合しその標的遺伝子上にリクルートされているかどうかを調べた。BRCT の両アレルに家族性乳癌家系の変異を持つ HCC1937 乳癌細胞に、BRCA1 をアデノウイルスを用いて導入し、p21^{WAF1/CIP1} のプロモーターを標的としたクロマチン免疫沈降法を行った。BRCA1 が 0.01% MMS (methylmethane sulfonate) による DNA 損傷で活性化されると BRCA1 は p21 のプロモーター上にリクルートされた。それに伴い hGCN5/TRRAP が同様の領域に共存していることが分かった。また、その際に同プロモーター領域はヒストン H3 がアセチル化された状態になっており、hGCN5 複合体によるアセチル化であると推測された。

DNA 修復能は、プラスミドを導入した HCC1937 培養細胞系に DNA 傷害性物質 MMS 0.1% を添加し生細胞数を測定することにより検討した。乳癌細胞 HCC1937 において、RNAi 法により TRRAP, hGCN5, MSH2 各因子の発現を抑制したところ BRCA1 を介した DNA 修復能が阻害され、細胞の生存数が減少した。また、hGCN5 は BRCA1 の DNA 損傷修復能を増強した。HAT 活性の欠失した hGCN5 点変異体ではこの作用はみられなかった。

【結論】BRCA1 と BRCT-interacting hGCN5/TRRAP 複合体 (TRRAP/hGCN5/MSH2/MSH6 複合体) の結合は、BRCA1 の転写制御および DNA 修復の両機能に必要であることが分かった。TRRAP と BRCT のタンパク-タンパク相互作用をみる実験より、BRCA1 と BRCT-interacting hGCN5/TRRAP 複合体の結合部位となっているのは TRRAP であることが明らかとなった。同時に家族性乳癌でみられる変異ではこの BRCT と TRRAP の相互作用が消失する。この結果より、BRCT の変異による BRCA1 の機能すなわち転写活性化能及び DNA 損傷修復機能の低下は BRCT-interacting hGCN5/TRRAP 複合体が結合できないことによるものと考えられた。hGCN5/TRRAP 複合体は BRCA1 を介した DNA 損傷修復あるいは転写制御の共役因子として働き、その HAT 活性が BRCA1 の転写・修復機能活性化に重要であることが明らかとなった。今回新規に同定した BRCT-interacting hGCN5/TRRAP 複合体 (TRRAP/hGCN5/MSH2/MSH6 複合体) には、BRCA1 に結合する

DNA 損傷複合体 BASC の因子である MSH2 と MSH6 が含まれていたが、それ以外の BASC の因子は見出すことはできなかった。しかし、anti-BRCA1 抗体で免疫沈降すると BASC の一因子である RAD50 も hGCN5/TRRAP とともに見出された。このことより hGCN5/TRRAP 複合体は BRCA1 上で BASC とより大きな複合体を形成し、BRCA1 の DNA 損傷修復能をより促進していると考えられる。すなわち hGCN5/TRRAP 複合体の HAT 活性が転写でも修復でも重要であることから、HAT 活性によりクロマチン構造を修飾し、転写装置および DNA 修復装置がアクセスしやすい状況を作り出す役割をしていると考えられる。また、BRCA1 が ER α のリガンド依存的な転写活性化を抑制するうえで、この複合体との結合が重要であることから、BRCA1 によりエストロゲンの下流のシグナルが転写制御レベルで抑制される機序の一部が明らかになった。以上より、当研究により様々な BRCA1 の機能発現には hGCN5/TRRAP HAT 複合体が必要であることが分かった。

以上より、BRCA1 の変異体での発癌における分子メカニズムを解明する上でこの複合体が鍵となる可能性を提起した。BRCA1 の発癌抑制機能の組織特異性については今後の更なる検討が必要である。