

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 大石 元

本研究は、癌抑制遺伝子 BRCA1 の転写制御・DNA 修復機能の発現の上で非常に重要な部位である BRCT 領域に結合するタンパク複合体を解析することにより、BRCA1 の乳癌の発癌・進展における役割の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HeLa S3 細胞浮遊培養系より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 が存在することが示された。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結果、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。
2. 同定した TRRAP/hGCN5/MSH2/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。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/MSH2/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。
3. 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。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。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。

4. 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 を添加し生細胞数を測定することにより検討した。BRCT に変異を持つ乳癌細胞 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。

以上、本論文は BRCT 領域と相互作用する新規の転写/修復共役因子 BRCT-interacting hGCN5/TRRAP 複合体を同定し、その機能解析より BRCA1 とこの複合体との結合は 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。また、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が明らかになった。本研究は BRCA1 に相互作用する新規複合体を同定し、その複合体の存在が BRCA1 の機能発現の上で必須であることを示し、BRCA1 の発癌抑制機能の解明に貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。