

論文の内容の要旨

論文題目 乳癌抑制遺伝子 DBC1 (deleted in breast cancer 1) の転写因子としての機能解析-DBC1 は BRCA1 との結合を介し生存促進因子 SIRT1 の発現を直接抑制する-

指導教員 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入 (進) 学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 平池 春子

1) 緒言および目的

新規乳癌抑制候補遺伝子として染色体 8p21 領域から同定された DBC1 (deleted in breast cancer 1) は、乳癌で欠損しているゲノム領域から同定されたものの、乳癌において発現が増強しているという報告もあり、その生物学的意義は不明な点が多い。DBC1 は核移行シグナルを持つ核内タンパクであり、DBC1 は細胞死の際にカスパーゼにより切断され、ミトコンドリアに移行することで細胞死をさらに促進すること、抗老化分子 SIRT1 と内在性複合体を形成し、SIRT1 依存性 p53 脱アセチル化能を抑制し、p53 依存性細胞死を促進するという分子機構がごく最近知られるようになってきた。SIRT1 の造腫瘍的作用が注目されるに従い、DBC1 の持つ生理的作用についても近年注目が集まっている。

家族性乳癌・卵巣癌発症の原因遺伝子として知られている BRCA1 は、家族性乳癌家系においてはおよそ半数で変異がみられると報告されており、典型的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 は核内に局在し、タンパク分解、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生物学的な役割を持つ。カルボキシ末端に位置

する BRCT 領域は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、その転写活性化能が失われることが知られている。BRCT 領域に存在する転写活性化能は、正常な細胞発育に対して重要なものであることが予想される。よってこの領域そのもの、およびその転写活性化能に関与する遺伝子についての解明は急務であるが、BRCT の転写活性化能を抑制する因子の報告は少ない。

BRCA1 が SIRT1 のプロモーター上に存在し SIRT1 の発現量を増強させるという報告と、SIRT1/DBC1 が内在性複合体を形成することから、本研究では DBC1 と BRCA1 のクロストークに注目した。特に DBC1 が転写因子として核内レセプターと相互作用する報告が相次いでおり、DBC1 の転写因子としての役割を研究することを主要な目的とした。

2) 材料と方法

免疫沈降法、ウェスタンブロッティング

内在性 DBC1/BRCA1 複合体の形成をみるために、HeLa 細胞の細胞抽出液を用いた。細胞を回収後、細胞溶解液を各々の特異的抗体を用いて免疫複合体を形成させ、Protein G Sepharose Fast Flow と混和し内在性免疫複合体を精製した。また 293T 細胞に発現ベクター(pcDNA Flag BRCA1, pcDNA Flag BRCA1 A1708E, pcDNA Myc DBC1) 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、細胞抽出液を 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。ビーズはともに十分洗浄した後に SDS-PAGE で泳動され、ウェスタンブロッティングに供された。

GST pull down assay

発現ベクター pcDNA Myc にサブクローンされた DBC1 の全長と deletion mutant を用いて、 $[^{35}\text{S}]$ methionine 標識したタンパクを *in vitro* 翻訳により発現させた。野生型 BRCT (1528~1863 アミノ酸)、点変異 BRCT を大腸菌内の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タンパク発現誘導を行いアフィニティーカラムとして使用した。GST 融合 BRCT タンパクと、標識タンパクは、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、バンドを解析した。

ルシフェラーゼ活性測定・Mammalian two-hybrid assay

293T 細胞に、ルシフェラーゼレポーターベクター、internal control 用ベクター、pM ベクター、VP16 ベクター、発現ベクターをリポフェクション法でトランスフェクションし、細胞を回収後 Firefly luciferase 活性が測定された。トランスフェクション効率を是正のため Renilla luciferase 活性も同時に測定した。

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

HeLa 細胞を 1.5% フォルムアルデヒドで架橋化し、超音波破碎することで可溶性クロマチン画分の断片化を行った。各々の特異的抗体を用いて免疫複合体を形成させ、DNA 飽和された Protein G Sepharose Fast Flow と混和し免疫複合体を精製した。ビーズからタンパク・クロマチン複合体を溶出し、脱架橋化を行い得られた DNA 断片に対し PCR 反応を行うことで、DBC1 および BRCA1 の結合しているプロモーター領域の同定を行った。

蛍光免疫組織染色および免疫組織化学染色法

乳癌細胞株 MCF-7 を 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、特異的一次抗体、二次抗体を用いてコンフォーカル顕微鏡により細胞内における BRCA1、DBC1 の発現を検討した。都立駒込病院において治療を受けた乳癌患者から書面による同意を得た後に採取した術前生検組織をフォルムアルデヒドで固定、パラフィン包埋し、4mm の切片に切断した。クエン酸緩衝液による抗原賦活化、内因性ペルオキシダーゼブロッキングを行った後、各種タンパクに対する特異的一次抗体、二次抗体を用いて染色した。

統計学的処理

統計処理として、2 群間の比較に Mann-Whitney の U 検定、多群間の比較に One-Factorial ANOVA、Bonferroni/Dunn の post hoc test、Kruskal-Wallis 検定を用いた。データの数値およびグラフは平均値±標準偏差または誤差にて示してある。有意水準は $p = 0.05$ とした。

3) 実験結果

DBC1 と BRCA1 の複合体形成

DBC1 と BRCA1 は特異的に共免疫沈降するので DBC1 と BRCA1 は HeLa 細胞内で内在性複合体を形成していることが判明した。293T 細胞に DBC1 および BRCA1 (野生型および変異型) の発現ベクターをトランスフェクションしたのち、免疫沈降を行ったが、DBC1 と BRCA1 (野生型および変異型) は特異的に共免疫沈降するので DBC1 と BRCA1 (野生型および変異型) は複合体を形成していることが判明した。

DBC1 と BRCT の結合領域の同定

GST pull down assay により、DBC1 と野生型および変異型 BRCT は直接的に結合することが判明した。同様に、DBC1 のアミノ酸末端 (DBC1 N: 1-230 アミノ酸) が BRCT との結合領域であることが判明した。Mammalian two-hybrid assay により上記の GST pull down assay の結果が確認された。

DBC1 と BRCA1 の MCF-7 細胞内における共存および動態変化

DBC1 と BRCA1 は、定常状態では MCF-7 細胞の核内において共存した。細胞に紫外線を照射して細胞死を誘導したが、細胞死を誘導した細胞の細胞質において、両者が共存していることが示された。

DBC1 の BRCA1 に対する転写活性抑制効果

DBC1 が BRCT の転写活性化能に与える影響を検討したところ、GAL4-BRCT のルシフェラーゼ活性は DBC1 発現により半減し、特異的抑制効果を示した。BRCA1 は SIRT1 promoter を持つルシフェラーゼベクターの活性を上げることが知られているが、DBC1 はこの増強効果を抑制した。ChIP assay により、SIRT1 promoter 1354-1902 の領域に DBC1、BRCA1、SIRT1 の三者が存在することが判明した。

DBC1 の乳癌生検組織における発現

乳癌生検組織における DBC1 の発現を、駒込病院乳癌症例について免疫組織化学染色法にて検討し、乳癌予後規定因子との関連を調べた。DBC1 および SIRT1 の発現量を点数化して評価したところ、DBC1 発現と乳癌の核異形度が正の相関を示すことが明らかとなった。一方 DBC1 発現、SIRT1 発現と HER2 の発現は逆相関することがわかり、乳癌の予後規定因子と関連がある可能性が示唆された。

4) 考察

免疫沈降法・蛍光細胞免疫染色により DBC1 と BRCA1 は内在性複合体をなしていたため、この複合体形成は機能的である可能性が示された。特に MCF-7 細胞においては、細胞死が起きている細胞内においても細胞質に両者が移行して共存していることから、この複合体形成が細胞死に関与する可能性が示唆された。また DBC1 の転写調節因子としての機能として、DBC1 が BRCT の活性を抑制する新規機能を持つことを明らかにした。DBC1 は BRCA1 の持つ生存促進因子 SIRT1 の発現増強作用を抑制することも明らかとなり、これらはいずれも癌促進的機序に関連するものと考えられ、この分子生物学的機序が乳癌発症・進展機序に重要である可能性が考えられた。SIRT1 は乳癌を含む各種癌で発現が増強していることが知られているが、その一方で、癌抑制的に作用する二面性を持った分子であることが明らかとなっている。このため DBC1 の作用が最終的に癌促進的に作用するか、癌抑制的に作用するかは、今後の検討が必要であると考えられる。