

論文の内容の要旨

論文題目 家族性乳癌卵巣癌原因遺伝子産物 BRCA1 の癌抑制機能を担う因子の同定及び機能解析

氏名 谷川 道洋

1) 緒言および目的

本邦において卵巣癌の推定罹患数は 7,913 で女性全癌死亡数の 2.7%、部位別第 10 位である。死亡数は 4,654 で、部位別第 9 位である。診断・治療技術の進歩に伴い、同年代での粗死亡率は低下傾向だが、高齢者急増に伴い全罹患数・死亡数は増加しており、病因の解明と診断・治療につながる研究が急務である。卵巣癌の 5-10%は遺伝性で、その 70%程度で家族性乳癌卵巣癌原因遺伝子 BRCA1 の変異を認める。BRCA1 は広範な生物学的役割をもち、ゲノムの安定性維持に寄与する。C 末の BRCT 領域は転写活性化能を有し、癌家系で見られる点変異でその転写活性化能が消失することから、癌抑制及び正常な細胞発育に重要である。近年 BRCT の DNA 損傷修復経路への寄与が解明され注目されている。我々は BRCT 領域の機能解析を継続的に行っており、BRCA1 が脱アセチル化酵素 SIRT1 のプロモーター上に存在し転写制御を担うという既報に着目し、BRCA1 の転写抑制因子として DBC1 を同定し報告した。本研究では BRCT の新規結合因子として、顔貌異常・知能発育遅延・心血管異常を主症状とする常染色体優性遺伝性疾患 Williams-Beuren 症候群の原因となる多能性転写因子 TFII-I を同定し、BRCA1 を介した SIRT1 転写制御を行うことを示した。また TFII-I と DBC1 は複合体を形成していた。DBC1 および TFII-I が BRCA1 の担う癌抑制機能をいかに修飾するかを明らかにすることで、卵巣癌・乳癌の治療へ向けた分子的解明を行うことを目的とした。

2) 材料と方法

GST pull down assay

野生型 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、HeLa 細胞の核抽出液を、低温下にインキュベートし、結合したタンパクを SDS-PAGE で泳動し、バンドを解析した。

免疫沈降法、ウェスタンブロッティング

TFII-I と BRCA1 の内在性複合体形成をみるために、HeLa 細胞、HCC1937 細胞を用いた。全細胞溶解液に特異的抗体を入れた後、Protein G Sepharose Fast Flow と混和し内在性免疫複合体を精製した。また COS7 細胞に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、全細胞抽出液を 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 で泳動し、ウェスタンブロッティングを行った。同様に TFII-I と DBC1 の複合体形成を、HeLa 細胞、COS7 細胞を用いた免疫沈降法にて検討した。

ルシフェラーゼ活性測定

COS7 細胞、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、発現ベクターをトランスフェクションし、Firefly luciferase 活性を測定した。トランスフェクション効率を正のため Renilla luciferase 活性も同時に測定した。

蛍光免疫組織染色

HeLa 細胞、U2OS 細胞、HCC1937 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、特異的一次抗体、二次抗体を用いて蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡にて BRCA1、TFII-I、DBC1、SIRT1 の動態を検討した。

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

HeLa 細胞を 1.5%ホルムアルデヒドで架橋化し、超音波破碎し可溶性クロマチン画分の断片化を行った。特異的抗体で免疫複合体を形成し、DNA 飽和した 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 PCR 反応を行った。

フローサイトメトリーによる細胞周期解析

siRNA で SW480sn3 細胞の内在性 TFII-I、DBC1 のノックダウンを行い、ダブルチミジンブロック法及びノコダザール処理にて G1/S 境界及び G2/M 境界に細胞周期を同調させた。血清添加して同調解除を行い、経時的に細胞を回収し、Propidium Iodide 染色を行いフローサイトメトリーにて細胞周期解析を行った。

放射線感受性試験

siRNA で SW480sn3 細胞の内在性 TFII-I、DBC1、SIRT1 のノックダウンを行った後、 γ 線照射 (0~8Gy) を行った。照射した細胞は 60 mm dish 1 枚あたり 2×10^3 cells に調整して撒き込み、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$

の条件で 14 日間培養した後、4%パラホルムアルデヒドにて固定しギムザ染色した。コロニーをカウントして、0 Gy に対する生存率を計算した。

DNA 相同性組換え修復能アッセイ

無機能ネオマイシン (G418) カセットを安定発現する SW480sn3 細胞を用いた。このカセット内には I-SceI 認識部位があり、I-SceI 発現により二重鎖切断される。遺伝子座内で相同組み換え修復 (HR) がなされると、ネオマイシン耐性が生じて G418 耐性を獲得する。内在性 TFII-I、SIRT1、DBC1 のノックダウン 48 時間後に I-SceI 発現ベクターをトランスフェクションした。導入 48 時間後、G418 (1 mg/ml) の選択培地で 60mm dish 1 枚あたり 2×10^5 cells の細胞を撒き込み、2 週間後にコロニー形成効率を評価した。

3) 実験結果

TFII-I の、BRCT 新規結合タンパク質としての同定

GST pull down assay により、TFII-I と野生型 BRCT が結合することが判明した。

TFII-I と BRCA1 の複合体形成

HeLa 細胞では TFII-I と BRCA1 は特異的に共沈降し、内在性複合体を形成することが判明した。変異 BRCA1 を発現している HCC1937 細胞では複合体は形成されなかった。強制発現系での免疫沈降法で、TFII-I と BRCA1 の複合体形成が確認され、TFII-I の C 末を欠いた発現ベクターをトランスフェクションした場合、複合体形成が確認されないことから C 末領域が結合領域であることが判明した。

TFII-I と BRCA1 の細胞内における共存と、DNA 損傷時の核内フォーカスの形成

BRCA1 と TFII-I が定常状態で核内に共存していた。γ線により DNA 損傷を惹起した細胞において BRCA1 と TFII-I が核内集積にて共存し、TFII-I が DNA の二本鎖切断修復に寄与する可能性が示された。

TFII-I の BRCA1 に対する転写活性増強効果

GAL4-BRCT のルシフェラーゼ活性が TFII-I 発現により増強し、特異的増強効果を示した。BRCA1 を介した SIRT1 の転写制御に対し、TFII-I が増強作用を示した。ChIP assay により、SIRT1 promoter 1354-1902 の領域に DBC1、BRCA1、SIRT1、TFII-I の四者が存在することが判明した。

TFII-I と DBC1 の複合体形成

内在性及び強制発現系で免疫沈降法を行い、DBC1 と TFII-I が複合体を形成すること、両者の複合体

形成には互いの N 末端が必要であることが判明した。また両者の相互作用が、BRCA1 を介した SIRT1 の転写制御に重要であることが判明した。

TFII-I 及び DBC1 の細胞周期制御への寄与

TFII-I のノックダウンにより G1→S 期の移行が抑制され、DBC1 のノックダウンにより G2/M 期で停滞した細胞が増加することが判明した。p21、GADD45 の発現制御に対し TFII-I、DBC1 が関与することが、ルシフェラーゼアッセイにて示された。

DBC1 および TFII-I は放射線による DNA 二本鎖切断修復に寄与する

U2OS 細胞に γ 線照射を行うと、TFII-I が γ H2AX の集積と共在した。SW480sn3 細胞を用いた放射線照射後のコロニー形成能評価では、TFII-I、DBC1 をノックダウンすると顕著なコロニー形成能の低下が認められ、両者の DNA 損傷修復経路への寄与が示された。

TFII-I、DBC1 は HR に寄与する

DNA 相同組換え修復能アッセイで、DBC1、TFII-I をノックダウンすると HR 能の低下が認められたことから、両者が HR に関与することが示された。

4) 考察

多能性転写因子 TFII-I は、BRCA1 の BRCT 領域に結合しその転写活性増強に働き、BRCA1 依存性の SIRT1 発現に寄与することがわかった。また SIRT1 の脱アセチル化能抑制因子であり、我々が BRCA1 の転写抑制因子として報告した DBC1 と TFII-I が結合し、BRCA1 転写複合体を形成することが判明した。また TFII-I、DBC1 が、細胞周期制御や HR 機構に寄与することが新たに示された。DBC1 は BRCA1 の持つ抗腫瘍機序である転写活性化能を抑制し、生存促進因子 SIRT1 の発現を抑制することから癌促進的機序に関連すると考えられたが、本研究では癌抑制的な機能が新たに判明した。また TFII-I の発癌メカニズムにおける寄与を示唆するものは本研究が初めてである。BRCA 変異性乳癌卵巣癌において HR 経路は癌治療の有望な分子標的と考えられており、本研究が乳癌・卵巣癌の治療につながる分子的解明になることが期待される。