

審査の結果の要旨

氏名 谷川 道洋

本研究は家族性乳癌卵巣癌の発癌メカニズムにおいて重要な役割を演じる BRCA1 の BRCT 領域の癌抑制機能を解析することを目的に、BRCT 領域の新規結合因子として顔貌異常・知能発育遅延・糖尿病・心血管異常を主症状とする Williams-Beuren 症候群の原因となる多能性転写因子 TFII-I(transcription factor II-I)を同定した。TFII-I が BRCA1 の担う癌抑制機能をどのように修飾するかを明らかにすることで、卵巣癌・乳癌の治療につながる分子的解明を行うことを目的とし、下記の結果を得ている。

1. TFII-Iと野生型BRCTとの結合をin vivoにおけるGST pull down法にて確認した。内在性のBRCA1とTFII-Iの結合を見るために免疫沈降法を行い、TFII-IとBRCA1が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。また、変異BRCA1が発現しているHCC1937細胞での免疫沈降法や、強制発現系での免疫沈降法によりこの複合体形成にはBRCT領域が必須であること、TFII-IのC末端がBRCA1との結合領域であることが明らかになった。
2. TFII-IがBRCTの転写活性化能に与える影響をルシフェラーゼアッセイにて検討したところ、GAL4-BRCTのルシフェラーゼ活性がTFII-I発現によりおよそ2倍に増強され、特異的増強効果を示した。BRCA1は脱アセチル化酵素SIRTのプロモーターに結合し転写制御を担うことは既知であるが、本研究ではSIRT1-lucを用いたルシフェラーゼアッセイを行い、BRCA1のSIRT1に対する転写活性化能をTFII-Iが増強することを示した。クロマチン免疫沈降法により、SIRT1のプロモーター1354-1902の領域にBRCA1、TFII-I、SIRT1、私の共同研究者がBRCA1の転写抑制

因子として同定していたDBC1(deleted in breast cancer 1)の四者が存在し、転写複合体を形成している可能性を示した。

3. 我々が新規に同定したBRCA1結合タンパクであるDBC1とTFII-Iが複合体形成することを免疫沈降法にて示した。発現ベクターをトランスフェクトした強制発現系の免疫沈降法により、両者の複合体形成に互いのN末端が必要であることを示した。また、SIRT1-Lucを用いたルシフェラーゼアッセイにより、両者の相互作用がBRCA1によるSIRT1の精緻な転写制御に重要であることが判明した。
4. TFII-I及びDBC1の細胞周期調節能をフローサイトメトリーにて解析した。G1/S境界、G2/M境界への細胞同調はそれぞれDouble Thymidine Block法及びNocodaole処理を用いた。内在性のTFII-Iをロックダウンすると、G1→S期への移行が抑制され、内在性DBC1をロックダウンするとG2/M期で停滞した細胞が増加した。また、BRCA1が転写制御を担うp21、GADD45の転写制御にTFII-IおよびDBC1が関与することが、各々のルシフェラーゼアッセイにて示された。
5. TFII-IとBRCA1の細胞内における共存を蛍光免疫染色法にて検討したところ、 γ 線によりDNA損傷を惹起した細胞においてBRCA1とTFII-Iが核内において集積を形成し共存することが観察された。また、TFII-IはDNA二本差切断部位(DSB)を示す γ H2AXの集積とも共存することから、二本鎖切断修復に寄与する可能性が示された。また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、内在性のTFII-I、DBC1、SIRT1をロックダウンするとコロニー形成能の低下が認められ、三者のDNA損傷修復経路への寄与が示された。
6. BRCA1がDNA二本鎖切断の相同組み換え修復経路において重要な役割を担う事、またDBC1及びTFII-IがBRCA1を介した転写制御をするSIRT1の脱アセチル化能が同経路で重要であることが近年報告されていたため、新規のBRCA1共役因子であるDBC1及びTFII-Iの相同組み換え修復への寄与を検討した。相同組み換え修復能はMohindraらが樹立した大腸癌細胞株SW480sn3細胞を用いた相同組換え修復能アッセイで評価した。内在性のSIRT1・DBC1・TFII-Iをロックダウンすると相同組

み換え修復能の低下が認められたことからTFII-IおよびDBC1は相同組み換え修復能があることが判明した。

以上、本論文は新規に BRCA1 の BRCT 結合因子として TFII-I を同定し、既に私の共同研究者が同定していた BRCA1 の転写抑制因子 DBC1 と相互作用し、BRCA1 の新規の発癌抑制機能として注目されている脱アセチル化酵素 SIRT1 の転写調節の上流制御機構を担うことを明らかにした。また BRCA1 の新規共役因子である TFII-I と DBC1 がゲノム恒常性維持のために BRCA1 が担う細胞周期制御機構及び相同組み換え修復能に寄与する可能性を示した。本論文により、BRCA1 の持つ抗腫瘍機序である転写活性化能を抑制するため、癌促進的機序に関連すると考えられていた DBC1 の癌抑制的な側面と、TFII-I の発癌抑制機序への関与が新規に示された。また近年癌に対する分子治療の有望な標的として注目されている相同組み換え修復経路に BRCA1 の転写共役因子が寄与するというこれまでにない知見が初めて示された。本論文は、学位の授与に値するものと考えられる。