

個別化医療のための分子イメージング技術を用いた 癌抑制遺伝子の機能解析

千葉 奈津子



加齢医学研究所 免疫遺伝子制御研究分野 准教授
E-mail: nchiba@idac.tohoku.ac.jp

1. はじめに

わが国における死亡の第一位は悪性腫瘍によるものであり、全死亡の約3分の1が悪性腫瘍で死亡しているのが現状である。一方、近年の悪性腫瘍の治療法の進歩により、悪性腫瘍の約60%が治癒する時代になったとされる。

分子生物学の進歩は、多くの癌関連遺伝子の同定を可能にし、遺伝子レベルでの解析が進展している。また、マイクロアレイ解析やプロテオーム解析などに代表されるポストゲノム時代の遺伝子解析も発展している。

乳癌は、欧米では女性8~9人に1人、日本では40人に1人が罹患すると推定され、食生活の欧米化などにより、日本でも乳癌の患者数および死亡数は年々増加傾向にある。乳癌においても関連遺伝子が同定され、乳癌の発生機構を分子レベルで解明することに加えて、臨床の場における遺伝子診断、新たな分子標的の探索などへの発展に期待がよせられている。

家族性乳癌は、全乳癌の約2~5%程度とされ、原因遺伝子として *BRCA1*、*BRCA2* が単離され、その後精力的に遺伝子診断とそれらの機能解析が行われた。近年はその他の家族性乳癌原因遺伝子の存在も示唆されている。その中で、現在我々は、家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* の機能解析を行っており、それによって、その遺伝子変異による発癌の分子機構を解明し、乳癌をはじめとしたその他の癌の個別化医療のための診断、治療法のためのバイオマーカーや新たな分子標的の開発を行うことを目標としている。

2. 家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* について

2.1 *BRCA1* の単離

1990年に、若年性乳癌家系が第17染色体長腕(17q21)に連鎖することが報告され、1994年に、三木

らにより、ポジショナルクローニングによって *BRCA1* が単離された[1]。その後の解析により、家族性乳癌の約30%、家族性乳癌卵巣癌の60%で異常が検出され、10%が遺伝性となる上皮性卵巣癌の40%で *BRCA1* 変異が原因とされるなど、非常に重要な癌抑制遺伝子であることが分かった。*BRCA1* 生殖細胞変異による乳癌発症リスクは約50~85%、卵巣癌発症リスクは12~60%とされ、散発性癌に比較して若年発症で、両側乳癌や多臓器重複癌の頻度が高いとされている[2]。

2.2 構造的な特徴

BRCA1 は、1863 アミノ酸からなる分子量220kDのタンパク質で、図1に示したように、N末端にRINGドメイン、C末端に2つのBRCTドメインという特徴的な構造を持つ。また、核内移行因子、核外移行因子をもち、中間部にはDNA結合領域も存在する。

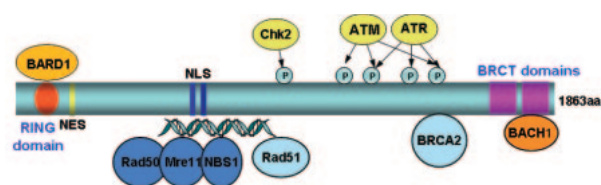


図1. *BRCA1* の構造と相互作用するタンパク質

2.3 機能

BRCA1 は、細胞周期に依存した発現パターンを示し、タンパク発現はG2-M期に最も高い。多くのタンパク質と相互作用し、細胞周期やDNA障害などに反応して、多様な複合体を形成し[3]、DNA修復、転写制御、チェックポイント機能を含む細胞周期制御、クロマチン修飾、アポトーシス、中心体複製制御などの細胞内の多様な機構に関与する。

BARD1 は BRCA1 の N 末端に結合するタンパクとして同定され、BRCA1 と同様に N 末端に RING ドメイン、C 末端に 2 つの BRCT ドメインを持つ。BRCA1 は BARD1 とともにヘテロ 2 量体を形成し、ユビキチンリガーゼ活性を持つ。家族性乳癌家系に認められる BRCA1 ミスセンス変異体は、このユビキチンリガーゼ活性が阻害されることより、この活性がその癌抑制機構に重要であることが推察されている。基質としては、BRCA1 と BARD1 の自己ユビキチン化、ヒストン、p53、ヌクレオフォスミン (NPM/B23)、 γ -チューブリン、RNA ポリメラーゼ II などが報告され、上記の細胞内の多様な機構との関わりが示唆される[4]。

また、BRCA1 は DNA 障害後に ATM や CHK2 によってリン酸化され、核内フォーカスを形成し、Rad51 や Rad50 と共局在すること、修復機構に関与する多くのタンパクと相互作用し、DNA 結合能も有することから、DNA 修復機能への関与が示唆されており、これが BRCA1 の主な癌抑制機構と考えられている。BRCA1 欠損細胞では、DNA 二重鎖切断の修復経路の 1 つである相同組み換え (HR) が大きく障害され、さらに、もう一方の DNA 二重鎖切断の修復機構である非相同 DNA 末端再結合 (NHEJ) にも関与するとされ、さらには転写共役修復 (TCR) への関与も示唆されている。

よって BRCA1 は、さまざまな DNA 障害に対する、多様な DNA 修復機構への関与と、細胞周期チェックポイントへの関与により、BRCA1 は遺伝子の恒常性を維持するケアテーカーとして働くと考えられる。

2.4 組織特異的な発癌

上述のように DNA 修復能が BRCA1 の主な癌抑制機構と考えられるが、BRCA1 は多くの組織に発現しており、BRCA1 変異による腫瘍が、乳腺、卵巣といったエストロゲン反応性の組織に発生する理由は不明であったが、近年その原因を示唆する知見も報告されている[5]。

BRCA1 生殖細胞変異をもつ個体での卵巣摘出により、乳癌の発生頻度が約 50% 減少し、また、BRCA1 変異による腫瘍発生モデルマウスでも、卵巣摘出により乳腺腫瘍の発生が抑制された。さらに、卵巣顆粒膜細胞のアロマターゼ発現は、閉経後女性の血中エストロゲン濃度を反映し、乳癌の増殖を促すが、最近 BRCA1 の発現低下が卵巣の顆粒膜細胞と脂肪組織のアロマターゼの発現を増加させることが報告された。しかしながら、エストロゲン刺激により

BRCA1 の発現が上昇するという報告がある一方、反対に BRCA1 がエストロゲンレセプターと相互作用し、その転写活性を抑制したり、増殖刺激のシグナル伝達経路を BRCA1 が抑制するといった報告もある。

詳細は未だ不明であるが、乳腺、卵巣といったエストロゲン感受性の組織では、エストロゲン刺激によって細胞増殖能が増加しており、かつ、エストロゲン代謝に関連する高度の酸化ストレスにより DNA 障害が起こりやすいにも関わらず、BRCA1 変異によって DNA 修復能が低下しているために、癌化が起こりやすい状態となっていると考えられる。

2.5 家族性乳癌家系における変異

多くの BRCA1 の生殖細胞変異が報告されており、これらは Breast Cancer Information Core (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>) で閲覧可能である。本遺伝子の変異の 80% は、タンパク切断型の変異で、フレームシフト(70%)、ナンセンス変異(10%)とされ、ミスセンス変異は少ない。広範囲に多種類の変異が分布し、異常が集中するホットスポットは認めないが、人種に特異的な founder mutation が存在し、Ashkenazi Jewish で 185delAG, 5382insC, Norway 人で 1135 insA, 1675delA, Canada 人でみられる C4446T が報告されている) [6]。

2.6 BRCA1 生殖細胞変異によって生じる癌の特徴

BRCA1 の生殖細胞変異のある患者の乳癌は、散発性乳癌に比較して、悪性度が高く、エストロゲンレセプター (ER)、プロゲステロンレセプター (PgR, HER2, cyclin D の陰性頻度が高く、p53 高発現の陽性頻度が高いとされる。

化学療法感受性に関する近年のいくつかの報告により、臨床的な特徴も明らかになってきている。BRCA1 変異のある乳癌患者の腫瘍は、乳癌には一般に使用されない白金製剤などの DNA 架橋剤には高感受性であるが、タキサン系薬剤には低感受性であるとされ、さらに、化学療法などの治療がなされない場合、予後不良であるが、術前化学療法や放射線療法がコントロール群と比較して、より有効であるなどが明らかになっている。

2.7 散発性癌への関与

散発性癌では、BRCA1 遺伝子変異をほとんど認めないため、当初、散発性癌における BRCA1 の発癌機

構における役割は少ないと考えられた。しかし、その後の解析により、散発性乳癌全体の 30~40%、散発性卵巣癌の 70%で BRCA1 の mRNA やタンパク発現が減少し、その頻度は悪性度の高いものほど高く、また、それらの癌で *BRCA1* 遺伝子がメチル化されていることが報告された。さらに、これらの散発性乳癌では、BRCA1 の生殖細胞変異を持つ患者の乳癌と同様、ER 陰性の頻度が高いとされた。さらに、それらの癌でも ER 陰性の頻度が高く、遺伝子発現プロファイルが *BRCA1* 変異を持つ患者の乳癌と類似するとされた。

また、散発性癌の 10-15%を占める Basal-like 乳癌と言われる予後不良で、ER、PgR、HER-2 が陰性のサブグループの遺伝子発現プロファイルが *BRCA1* 変異による家族性乳癌のものと酷似し、散発性癌の中に BRCA1 変異による家族性乳癌に近いサブグループが存在することが明らかとなった。よって、BRCA1 の機能低下は散発性癌の発症機構、薬剤耐性機構にも関与することが推察され、BRCA1 自身、あるいはその関連分子が散発性乳癌のバイオマーカーとなる可能性がある。

3. 家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* の機能解析

3.1 これまでの研究

我々はこれまで *BRCA1* の機能解析の研究により、以下のことを明らかにしてきた。

- (1) 生化学的な方法で、BRCA1 を含む 4 つの異なるタンパク複合体の分離に成功し、その複合体が、DNA の複製停止により変化していくことを示し、BRCA1 の多様な機能は、さまざまタンパクとの多様な複合体の形成によって発揮される[3]。
- (2) BRCA1 の細胞周期の S 期における核内フォーカスの形成や、RNA ポリメラーゼ II ホロ酵素との相互作用には BRCA1 の N 末端が重要である[7]。
- (3) BRCA1 の中間部のドメインに細胞増殖抑制効果とアポトーシスを誘導する働きがあり、BRCA1 の N 末端は、それらの作用を抑制するは働きがある[8]。
- (4) BRCA1 の有するユビキチン化能の新たな基質として RNA ポリメラーゼ II の同定に成功し、RNA ポリメラーゼ II が、紫外線照射後に BRCA1 によりユビキチン化され、その後プロテアソームにより分解されることを示し、BRCA1 の転写共役修復への関与のしきみを示し、DNA 障害後、RNA ポリメラーゼ II が BRCA1 の作用により分

解され、転写が停止し、さらに BRCA1 が DNA 修復因子をリクルートするというモデルを提唱した[9] (図 2)。

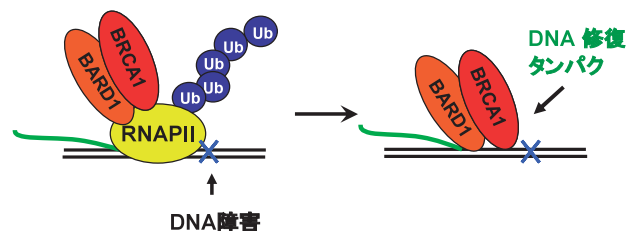


図 2. RNA ポリメラーゼ II が BRCA1 の作用により分解され、転写が停止し、さらに BRCA1 が DNA 修復因子をリクルートする。

- (5) BRCA1 の N 末端において既に報告された腫瘍由来の約 30 種類の点突然変異の発現ベクターを作製し、BRCA1 の BARD1 との結合能、細胞周期の S 期や DNA 傷害後の核内フォーカスの形成能、ユビキチン化能により、それらの点突然変異の病的意義を検討した。

3.2 分子イメージング技術を用いた BRCA1 の DNA 修復能の解析

3.2.1 レーザー照射による DNA 損傷の作製

現在、東北大学加齢医学研究所、遺伝子機能研究分野、安井明教授との共同研究により、生細胞内の DNA 損傷に対する反応を、リアルタイムで解析できる分子イメージング技術を用いた実験系により、BRCA1 の DNA 損傷部位への集積と解離をリアルタイムで詳細に観察することにより、DNA 修復における BRCA1 の役割を検討している。

このシステムは、照射用レーザー(365nm, 405nm)と共焦点レーザー顕微鏡からなり、生細胞核の一部に DNA 単鎖切断、二重鎖切断、塩基損傷などの DNA 損傷を作製し、リアルタイムで解析することができる(図 3)。365nm の色素レーザーは線量をパルスの数とフィルターで制御し、405nm の半導体レーザーは、連続光で線状に照射し、線量はレーザー出力の制御とスキャン回数で制御している。抗体を用いて内因性のタンパク質の集積と解離を解析することに加え、変異体や抗体の得られないタンパク質の解析には、GFP(green fluorescence protein)などの蛍光タンパク質を融合したタンパクを細胞に発現させて解析することができる[10-12]。

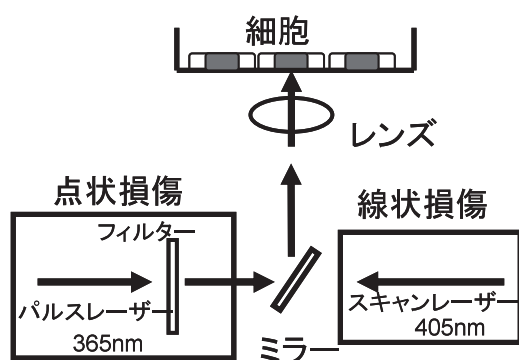


図3. レーザー照射システム(文献 (10) より改変)

3.2.2 BRCA1 の DNA 二本鎖切断への集積

我々は、BRCA1 の DNA 二本鎖切断への集積機構について詳細に検討し、その集積のメカニズムを明らかにした[13].

(1) 内因性の BRCA1 の DNA 二本鎖切断部位への集積.

まず 405nm の半導体レーザーを用いて、BRCA1 が DNA 二重鎖切断部位に集積するかどうかを検討した (図4). これまでの研究により、405nm の半導体レーザーで 500 スキャンの照射を行うと、DNA 二本鎖切断を作製することができる. レーザー照射後に、2、5、8、10、60、300、600 分後に細胞を固定し、DNA 二本鎖切断部位のマーカーであるリン酸化 H2AX (γ H2AX) に対する抗体とともに、BRCA1 に対する抗体で二重免疫蛍光染色を行い、蛍光強度を測定した (図5).

γ H2AX は、レーザー照射後 2 分後には認められ、10 分後にはほぼ最大の蛍光を認め、1 時間後もその蛍光強度は続いたが、5 時間後には半分程度となり、10 時間後には蛍光を認めなかった. 一方、BRCA1 は、5 分後に弱く集積を認め、徐々に増加し、1 時間後に最大の集積を認め、5 時間後も強い集積を認め、10 時間後も弱く集積を認めた. よって、内因性の BRCA1 は、H2AX のリン酸化に遅れて、DNA 二本鎖切断部位に集積した. また、 γ H2AX の消失に遅れて、BRCA1 の集積も消失した. 興味深いことに、放射線照射後の核内フォーカスも、BRCA1 の核内フォーカスは γ H2AX の核内フォーカスの形成に遅れて形成される.

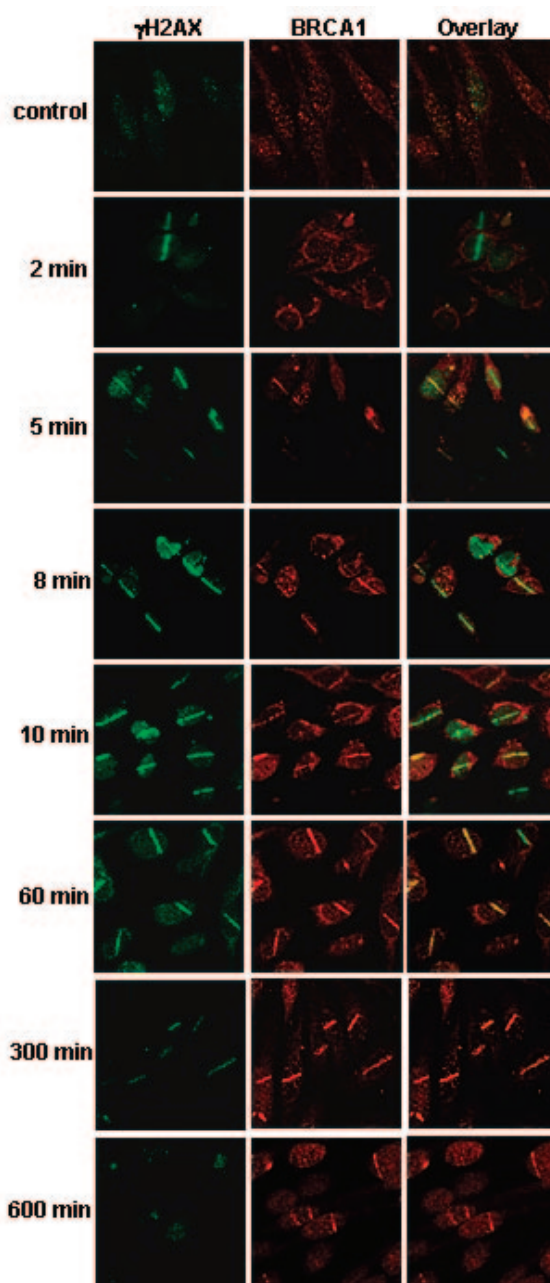


図4. 細胞核の一部に線状にレーザーを照射し、 γ H2AX と BRCA1 の抗体で二重免疫蛍光染色したところ、内因性の BRCA1 はレーザー照射部位に集積した.

(2) GFP 融合 BRCA1 の DNA 二本鎖切断部位への集積.

次に、BRCA1 の集積をリアルタイムで観察するため、Green fluorescence protein(GFP)を BRCA1 に融合させた融合タンパクを発現するベクターを作製し、Saos-2 細胞に導入し、レーザーを照射した. 図6のように内因性の BRCA1 と同様に、GFP を融合した BRCA1 はレーザー照射部位に集積した.

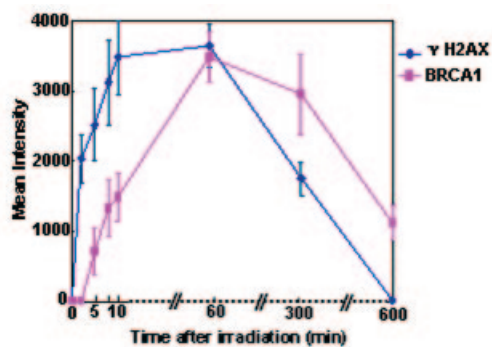


図5. レーザー照射部位の蛍光強度. レーザー照射後に γ H2AX と BRCA1 の抗体での二重免疫蛍光染色を行った.

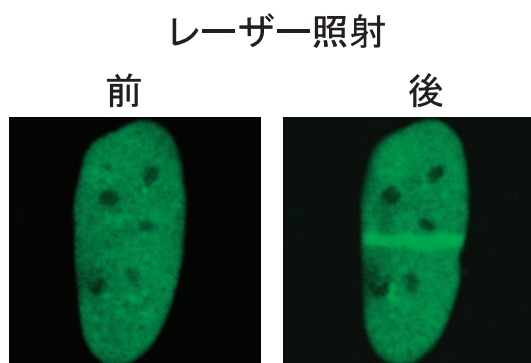


図6. GFP 融合 BRCA1 のレーザー照射部位への集積をリアルタイムで観察した.

(3) BRCA1 は N 末端と C 末端を介して, DNA 二本鎖切断部位に集積する.

次に, GFP を融合した BRCA1 の各種欠失変異体の発現ベクターを作製し, BRCA1 の集積に必要な領域を検討した. 6 つの欠失変異体のうち, 中間部領域の変異体のみ, 集積せず, N 末端領域と C 末端領域はそれぞれ独立に, レーザー照射によって作製された DNA 二本鎖切断部位に集積した (図7).

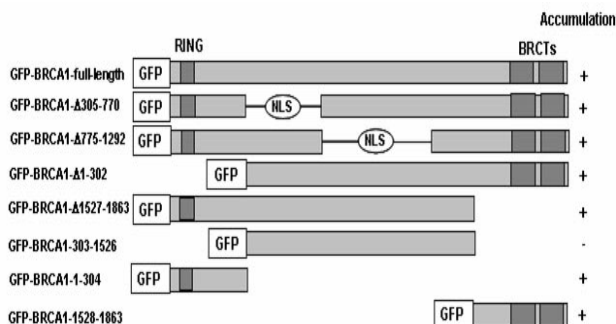


図7. GFP を融合した BRCA1 の各種欠失変異体の構造とその DNA 二本鎖切断部位への集積の有無.

また, 蛍光強度を測定し, 集積の kinetics について検討した (図8). N 末端領域と C 末端領域の集積の kinetics は異なっており, N 末端領域はレーザー照射後に速やかに DNA 二本鎖切断部位に集積したが, C 末端領域は, 徐々にゆっくりと集積した. BRCA1 の全長は, N 末端領域と C 末端領域の集積パターンを融合したような集積パターンとなり, 早く集積する BRCA1 タンパク質もあるが, ゆっくりと徐々に集積する BRCA1 も存在すると考えられた.

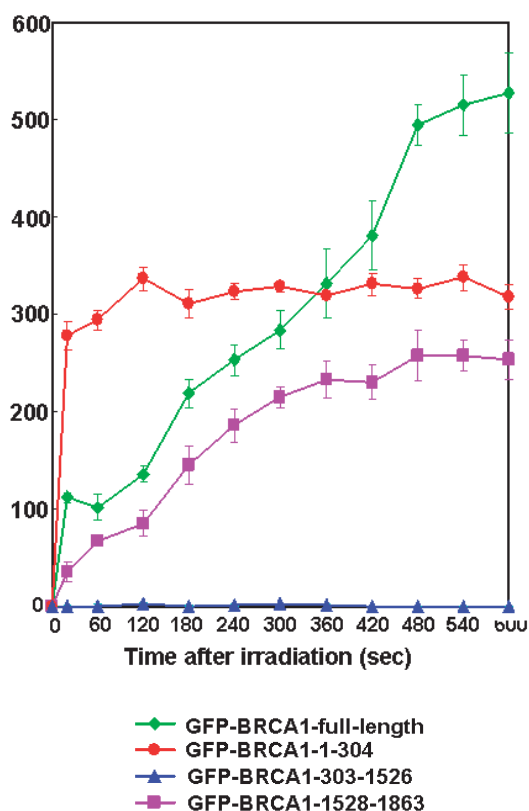


図8. BRCA1 の欠失変異体を作製し, レーザー照射部位への集積の kinetics を比較した. 領域毎に異なる集積パターンを示した.

(4) BRCA1 の N 末端は Ku80 依存性に DNA 二本鎖切断部位に集積する.

さらに, 他の DNA 修復タンパクの欠損細胞を用いて, BRCA1 の DNA 二本鎖切断部位への集積が他の DNA 修復タンパク質に依存するかどうかを検討した (図9).

ATM は, DNA 損傷に反応して, BRCA1 を含めた修復タンパク質をリン酸化することが知られている.

H2AX は、上記に述べたように、DNA 損傷後直ちにリン酸化され、リン酸化フォームである γ H2AX は DNA 二本鎖切断のマーカーとされている。DNA-PKcs, XRCC4, Ku80 は DNA 二本鎖切断の修復経路である、非相同 DNA 末端再結合 (NHEJ) で働くと考えられている。

N 末端領域は、Ku80^{-/-}細胞でのみ、その集積が見られず、N 末端の集積は、Ku80 タンパク質に依存していることが示された。一方、C 末端領域はこれらのすべての細胞で、DNA 二本鎖切断部位への集積が認められた。よって、これらの集積は ATM によるリン酸化に依存せず、また、H2AX のリン酸化は BRCA1 の集積に先立って起こるが、そのリン酸化には依存しないことが明らかとなった。

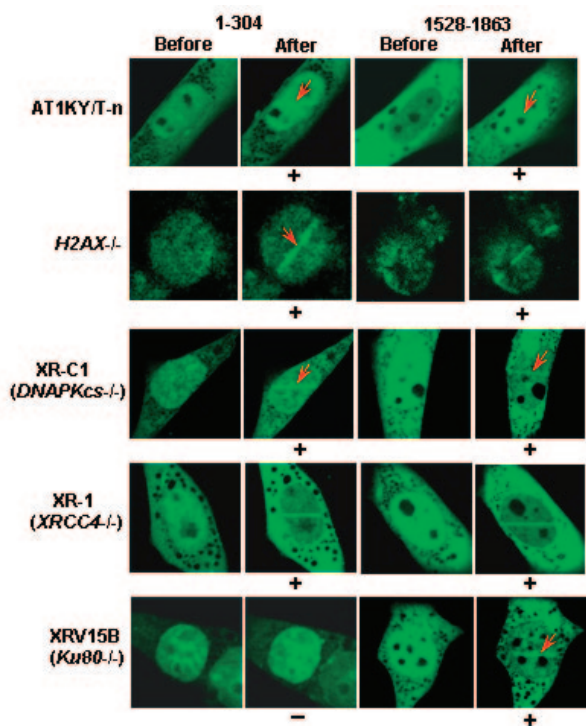


図 9. 各種 DNA 修復因子の欠損細胞での BRCA1 の N 末端と C 末端のレーザー照射による DNA 二本鎖切断部位への集積。

次に、Ku80^{-/-}細胞での N 末端領域のレーザー照射部位への集積の消失が、Ku80 を Ku80^{-/-}細胞に強制発現させることで回復するかどうかを検討した。図 10 のように、HA タグを付加した Ku80 タンパク質の発現させると、BRCA1 の N 末端領域の集積は認められ、同時に Ku80 の集積も認められた。

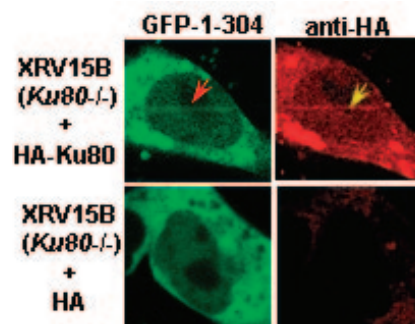


図 10. Ku80^{-/-}細胞に HA-Ku80 の発現ベクターを導入すると、GFP-BRCA1 の N 末端は DNA 二本鎖切断部位に集積した。

さらに、GFP-Ku80 タンパク質の DNA 二本鎖切断部位への集積の kinetics を解析したところ、Ku80 は、BRCA1 の N 末端領域と同様に、レーザー照射後に速やかに集積した。一方、BRCA1 の N 末端に結合するタンパク質として同定された、BARD1 タンパク質は、これらと異なり、ゆっくりと徐々に集積し、異なったメカニズムで集積することが示唆された。

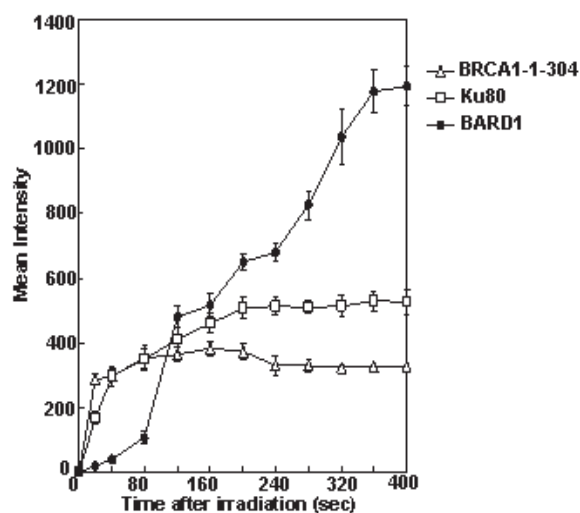


図 11. BRCA1 の N 末端領域、Ku80、BARD1 のレーザー照射部位への集積の kinetics。

(5) BRCA1 は N 末端で Ku80 と相互作用する。

さらに、BRCA1 は Ku80 と相互作用するかどうかを免疫沈降法で検討した。293T 細胞に、HA タグを付加した、全長、N 末端の欠失変異体、C 末端の欠失変異体と FLAG タグを付加した Ku80 タンパク質を導入し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、Western blot で相互作用を検討した。BRCA1 の全長と C 末端の欠失変異体では、

相互作用を認めたが、N 末端の欠失変異体では相互作用を認めず、BRCA1 はその N 末端を介して、Ku80 タンパク質と相互作用することが分かった。さらにこれらの相互作用は、放射線照射で増強した。

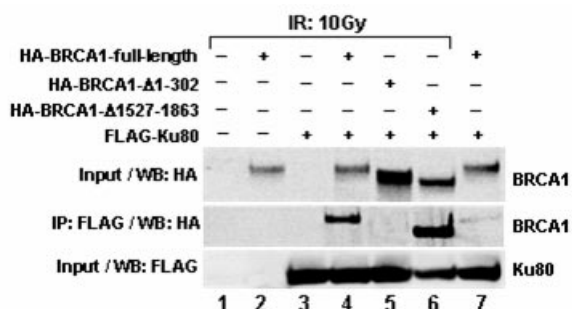


図 12. BRCA1 は、その N 末端領域を介して、Ku80 と相互作用する。

(6) BRCA1 の 2 つの断片は独立に DNA 二本鎖切断部位に集積する。

BRCA1 の N 末端には RING ドメインが存在する。Ku80 との相互作用は RING ドメインを介するのかどうかを検討するため、図 13 のような、BRCA1 の a.a. 1-100, a.a.1-200, a.a.1-304, a.a. 101-200, a.a.101-304, a.a.201-304 の短い断片に GFP を融合させて、その集積を検討した。その結果、a.a.201-304 以外のすべての断片が、レーザー照射部位に集積し、RING ドメインの存在する a.a. 1-100 に加えて、a.a. 101-200 の領域も DNA 二本鎖修復への集積能があることが分かった (図 14)。

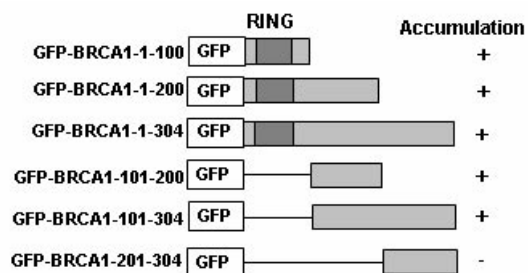


図 13. GFP を融合した BRCA1 の a.a. 1-100, a.a.1-200, a.a.1-304, a.a. 101-200, a.a.101-304, a.a.201-304 の構造。

さらに、これらの断片の集積の kinetics を解析すると、図 14 に示したように、a.a.201-304 以外のすべての断片がレーザー照射部位に、照射後速やかに集積することが明らかとなった。よって、a.a.1-100 と a.a.101-200 の BRCA1 断片は同じメカニズムで DNA 二本鎖切断部位に集積することが推察された。

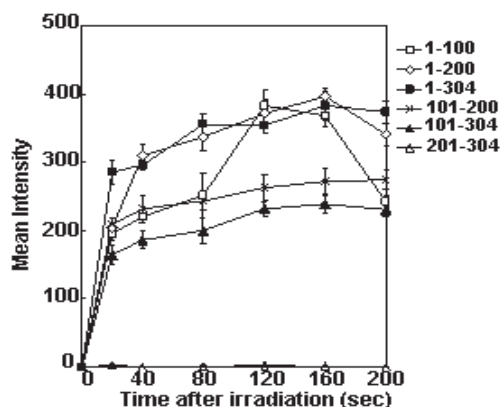


図 14. GFP-BRCA1-a.a. 1-100, a.a.1-200, a.a.1-304, a.a. 101-200, a.a.101-304, a.a.201-304 の照射部位への集積の kinetics。

(7) BRCA1 の N 末端の点突然変異により、BRCA1 の速い集積と Ku80 との相互作用は減弱または消失する。

BRCA1 の a.a.101-200 の領域には、これまでのところ、特に特徴的な構造や配列は報告されていない。しかし、いくつかの点突然変異が Breast Cancer Information Core で報告されている。

そこで、それら変異の中で比較的報告の多い変異である、Y105C, P142H, E143K, Y179C を GFP-101-200 の発現ベクターに導入し、その DNA 二本鎖切断部位への集積が変化するかどうかを検討した (図 15)。

4 つの変異体は集積を認めたものの、いずれも野生型に比較して集積は減弱し、特に、P142H に関しては、著しくその集積が減弱していた。

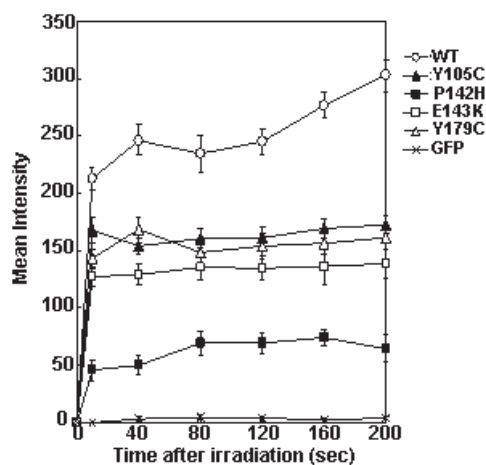


図 15. GFP-BRCA1-a.a. 101-200 の野生型、Y105C, P142H, E143K, Y179C の変異体のレーザー照射部位への集積。

さらに、GFP を融合した全長の BRCA1 にこれらの変異を導入して、DNA 二本鎖切断部位への集積を検討した。いずれの変異体も集積は認められたが、野生型で認められる、速い集積が減弱し、特に、P142H では、速い集積が消失し、C 末端領域に類似した集積パターンを示した。

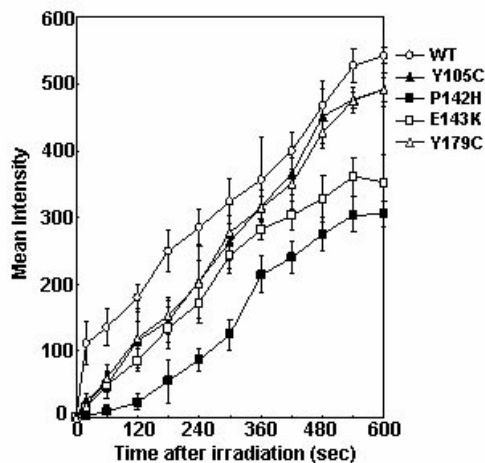


図 16. GFP-BRCA1-全長の野生型, Y105C, P142H, E143K, Y179C の変異体のレーザー照射部位への集積。

よって、P142H 変異体と Ku80 との相互作用に変化があるかどうかを免疫沈降法で検討した。293T 細胞に、GFP を融合した BRCA1 の a.a. 101-200 の断片の野生型あるいは P142H 変異体全長と FLAG タグを付加した Ku80 タンパク質を導入し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、Western blot で相互作用を検討した。図 17 に示すように、P142H 変異体では、Ku80 との相互作用は認められなかった。

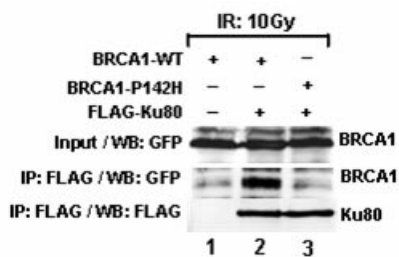


図 17. BRCA1 の P142H 変異体は Ku80 との相互作用が消失した。

(8) BRCA1 の Ku80 と相互作用の消失は、放射線照射後の細胞の生存率に影響する。

さらに、この Ku80 と BRCA1 の相互作用による、BRCA1 の DNA 二本鎖切断部位への速い集積の減弱

の減弱が DNA 修復機構に影響し、DNA 損傷後の細胞の生存に関与しているかどうかを検討するために、BRCA1 欠損細胞である HCC1937 細胞に、BRCA1 の野生型、またはこの P142H 変異体を導入し、放射線を照射して、colony formation assay を行った。図に示すように、HCC1937 細胞に、BRCA1 の野生型を導入するとコントロールに比較して放射線抵抗性を示したが、P142H 変異体を導入しても、放射線抵抗性は認めなかった。

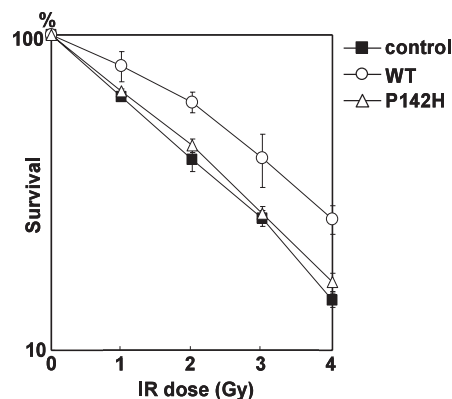


図 18. BRCA1 欠損細胞に、BRCA1 の野生型または P142H 変異体を導入し、放射線を照射後、colony formation assay を行った。

(9) まとめ

以上のように、我々は、レーザーを用いて、生細胞の核に DNA 二本鎖切断を限局的に作製して、DNA 修復因子の反応をリアルタイムで観察できる実験により、BRCA1 の DNA 二本鎖切断部位への集積のメカニズムを解明した。

これらの解析により、BRCA1 が N 末端と C 末端依存性に異なったメカニズムで集積することが明らかとなった。特に、N 末端に関しては、Ku80 に依存して集積することが明らかとなった。これまで、BRCA1 と NHEJ との関わりを示す報告は見られたが、その機構は不明であった。本研究により、BRCA1 が Ku80 と相互作用し、損傷部位への速く集積することが関与していることが推察される。また、既に報告されている突然変異により、これらの機能が障害され、放射線照射後の細胞の生存率にも影響を与えていることより、この機能は BRCA1 の癌抑制能の一つと考えられる。

3.2.3 BRCA1 の紫外線による損傷に対する修復能における役割

上述のように、BRCA1 は DNA 二重鎖切断の修復経路の 1 つである相同組み換え (HR) や非相同 DNA 末端再結合 (NHEJ) にも関与するとされている。しかし、一方、それによって生じる主な DNA 障害が二重鎖切断ではない紫外線照射によっても、リン酸化されたり、核内フォーカスを形成したりすることが分かっている。

よって、フィルターを用いて細胞内に局限して紫外線を照射して、DNA 障害を引き起こしたところ (図 19)、BRCA1 の集積が確認された (図 20)。

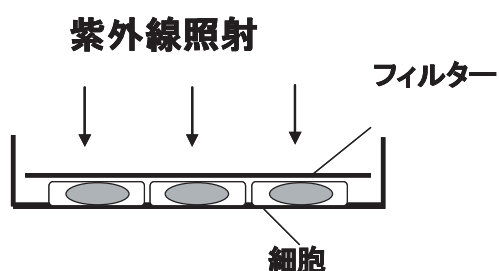


図 19. 細胞上にフィルターを置いて、紫外線を照射する。

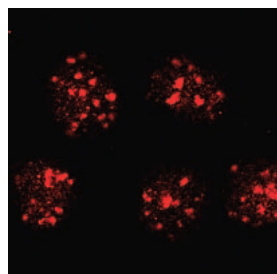


図 20. BRCA1 は限局的な紫外線照射部位に集積する。

さまざまな DNA 修復タンパクの欠損細胞を用いて BRCA1 の集積を解析したところ、ある DNA 修復タンパクの欠損細胞において BRCA1 の集積が阻害されることが確認された。これまでこの修復タンパクと BRCA1 の相互作用などを示す報告はなく新しい知見となる。さらに、転写阻害剤を用いた照射実験や siRNA を用いて、紫外線照射後の細胞増殖能を検討した実験などにより、BRCA1 が転写共役修復 (TCR) への関与に関与することを明らかにした。

3.3 新規家族性乳癌原因遺伝子 BRCA1 関連分子の同定とその機能解析

近年、BRCA1 の BARD1 と共役したユビキチン化能が注目されており、上述のように、我々も、BRCA1 のユビキチン化の基質として、BRCA1 の BRCT ドメインに結合する RNA ポリメラーゼ II を同定している。また、最近、BRCT ドメインが、DNA 障害後の細胞周期チェックポイントや DNA 修復経路に関与するリン酸化タンパクと相互作用すると報告された。BRCA1 は、それ自身でもユビキチン化能を持つが、BRCA1 の N 末端に結合する BARD1 と相互作用することで、ユビキチン化能は著しく増加し、BRCA1 の RING ドメイン内に存在する点突然変異により、BARD1 との結合能とユビキチン化能が阻害されることから、BARD1 が BRCA1 の癌抑制機能を制御する重要な因子であると推察される。

よって、我々は BRCA1 の癌抑制機能には BARD1 の BRCT ドメインも重要なのではないかと考え、BARD1 の BRCT ドメインを含むタンパク複合体を精製し、その構成タンパクを同定し、その機能を解析することとした。

HA, FLAG を付加した BARD1 の BRCT ドメインタンパクを強制発現する細胞を作製し、大量培養後、DNA 障害後に相互作用するタンパクをアフィニティ精製し、LC-MS/MS にて同定した。

現在、同定したいくつかもタンパクの中で、1 つのタンパクが BARD1 の BRCT ドメインを直接結合することを確認し、BRCA1/BARD1 複合体によってユビキチン化されることを明らかにした。また、細胞内の特徴的な構造に局在することも明らかになっており、BRCA1 の癌抑制能への関与を含めて、現在さらなる解析を行っている。

4. おわりに

近年、BRCA1 欠損細胞が、DNA 単鎖切断の修復に関わる poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)に対する阻害剤に感受性であることが判明した[14]。これは、細胞内の複数の DNA 修復経路の中で、BRCA1 が関与するもの以外の系を阻害することで、BRCA1 欠損細胞のみに強い細胞毒性を起こすことができるということである。このような考えから、BRCA1 の DNA 修復能に関する詳細な解析により、家族性乳癌、卵巣癌の発癌機構の解明、さらに新たな治療標的を探索することが可能になると考えられる。

また、散发性癌の一部でも BRCA1 の発現が低下していることより、家族性乳癌、卵巣癌だけでなく、散发性癌にも有効な新たな治療薬の開発にも寄与することができると考えられる。また、近年は乳癌、卵巣癌以外に、食道癌、大腸癌、肺癌などへの関与も検討されている。

今後は、本研究を進展させ BRCA1 を分子マーカーとして利用することにより、個別化医療の基礎を築き、さらには、これらの癌の発症機構を解明し、新たな治療薬となる分子標的の探索、予防法解明にも寄与することを目標とする。

また、これまでの BRCA1 の研究に加え、さまざまな腫瘍関連分子に着目し、分子イメージング技術などの新しい技術を用いて、それらの機能を詳細に解析することにより、発癌や再発のリスク評価、薬剤感受性の予測、治療のための新たな標的分子探索に関する研究を展開したいと考えている。また、細胞内タンパク群の動態を解析するために、タンパク発現、相互作用、翻訳後修飾や、目的タンパク質の精製・同定などを効率的に行える実験系の開発もめざしている。

文 献

- [1] Miki Y, ほか 45 名. *Science* **266**, 66-71, 1994.
- [2] 千葉奈津子, 石岡千加史. *日本臨床* **65-6**, 601-605, 2007.
- [3] Chiba N and Parvin JD. *J Biol Chem* **276-42**, 38549-38554, 2001.
- [4] 太田智彦, 蛋白質核酸酵素 **51**, 1395-1400, 2006.
- [5] Noruzinia M, ほか 2 名. *Cancer* **104**, 1567-1574, 2005.
- [6] 千葉奈津子, ほか 2 名. 癌診断研究の最前線 実験医学増刊, 2007 (*in press*).
- [7] Chiba N and Parvin JD. *Cancer Res* **62**, 4222-4228, 2002.
- [8] You F, ほか 5 名. *Oncogene* **23-34**, 5792-5878, 2004.
- [9] Starita LM, ほか 5 名. *J Biol Chem* **280-26**, 24498-505, 2005.
- [10] 蘭利, ほか 2 名. *実験医学* **24-3**, 364-370, 2006.
- [11] Lan L, ほか 7 名. *Proc Natl Acad Sci USA* **101-38**, 4153-4162, 2004.
- [12] Lan L, ほか 6 名. *J Cell Sci* **118**, 13738-13743, 2005.

[13] Wei L, ほか 5 名. *Mol Cell Biol* (*in press*).

[14] Farmer H, ほか 13 名. *Nature* **434**, 917-921, 2005.