

令和元年6月13日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18817

研究課題名(和文) イヌ癌抑制遺伝子BRCA2の新規発現制御機構の解明：癌との関係性を見据えて

研究課題名(英文) Analysis of novel transcriptional suppressing mechanism in canine BRCA2

研究代表者

吉川 泰永 (Yoshikawa, Yasunaga)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：00552043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イヌやヒトにおいて癌抑制遺伝子であるBRCA2の変異や発現量の低下は、乳腺腫瘍発症と関係する。このBRCA2の発現制御に重要なプロモーター活性を抑制する新規ゲノムDNAの領域を予備的な研究から発見した。本研究課題では、転写の抑制に必要なDNAの配列を50 bpの長さ限定し、この領域に相互作用するタンパク質がBRCA2のプロモーター活性を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRCA2の変異や発現量の低下は腫瘍発症と関係している事がイヌならびにヒトで報告されている。すなわち、適切な発現量を維持することが重要である。本研究では、BRCA2の発現量を抑制するメカニズムを解明しようとするもので、新しい腫瘍発症の原因の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In dogs and human, mutations and reduction expression level of BRCA2, one of tumor suppressor gene, are related to mammary tumor development. We had found a novel DNA region that suppresses BRCA2 promoter activity in preliminary study. In this study, we limited the region which include the suppressor activity to 50 bp length. A several proteins were interacted with this DNA sequence in vitro and one of them showed the suppressor effect on BRCA2 promoter activity.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：転写抑制因子 BRCA2 シス因子 トランス因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

*Breast cancer 2, early onset (BRCA2)* はヒト乳癌の原因遺伝子として同定され、BRCA2 に変異がある女性は一生のうち乳癌になる確率が 90% 近くになる。申請者は、乳腺腫瘍発症率が高い動物種であるイヌにおいても BRCA2 が乳腺腫瘍発症に関わっていると予想して研究を行い、イヌにおいても BRCA2 が乳腺腫瘍発症の原因である可能性を示唆した。このように腫瘍と深い関わりを持つ BRCA2 は、細胞の腫瘍化の原因となる DNA 損傷を相同組換えにより修復することに貢献することで、ゲノムの安定性を維持する。もし、このような機能を持つ BRCA2 に変異が生じると、ゲノム DNA に変異が蓄積して最終的に細胞が腫瘍化してしまう。

BRCA2 の発現量は細胞周期依存的に制御されており、G1 後期 ~ G2 期にかけて BRCA2 の mRNA 量は多い。もし、常に BRCA2 の発現量が低下してしまうと、DNA 損傷の修復不全によりゲノム DNA に変異が蓄積し、細胞の腫瘍化の原因となると考えられる。すなわち、BRCA2 が関与する細胞の腫瘍化には BRCA2 の変異だけでなく、その発現量の制御機構も関与すると考えられており、申請者らもイヌ乳腺腫瘍サンプルにおいて BRCA2 の発現量が低下していることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

このような機能を持つイヌ BRCA2 を解析する過程において、申請者はイヌおよびヒト BRCA2 のイントロン領域において、BRCA2 のプロモーター活性を低下させるサイレンサー配列が存在することを発見した (図 1)。このサイレンサー配列に結合する転写抑制因子は BRCA2 の細胞周期依存的な発現に貢献していると予想され、もしこの発現制御機構に異常があれば、腫瘍発症にも関係している可能性がある。そこで、本研究では、このサイレンサー配列に結合する転写抑制因子を同定して、BRCA2 の各細胞周期における発現量に対する影響を調査することで、BRCA2 の発現制御機構の一端を解明することを第一の目的とした。さらに、新規 BRCA2 サイレンサー配列に結合する転写抑制因子と腫瘍発症との関係を調べる事で、腫瘍発症や悪性度との関係性を調べることを第二の目的とした。

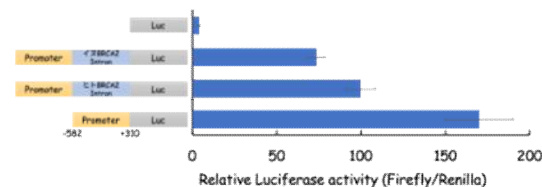


図 1. イヌおよびヒト *BRCA2* における新規サイレンサー配列

### 3. 研究の方法

#### (1) サイレンサー配列存在の確認と領域の限定

プロモーター領域の上流にサイレンサー配列を挿入した場合にもプロモーター活性が抑制されるかどうかをホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイにより確認した。次に、100 bp ずつイントロンの配列を短くしたコンストラクトを作製し、同様の方法でサイレンサー配列を 100 bp の長さに限定した。さらに 50 bp のコンストラクトを作製して、最終的に 50 bp の長さまでサイレンサー配列を限定した。この 50 bp のうちのどの配列がプロモーター活性の抑制に重要なのか調べるために 5'側から 10 bp ずつ塩基配列をアデニンまたはシトシンに、グアニンはチミンにそれぞれ変換した変異導入コンストラクトも同様に調べた。

#### (2) サイレンサー配列と相互作用するタンパク質の同定

プロモーター活性の抑制に関わるタンパク質を同定するために 50 bp に限定したサイレンサー配列を結合させたセファロースビーズを用いてこれに結合する核タンパク質を精製した。コントロールとしてビーズのみを反応させたサンプルとプロモーター活性の抑制に影響しない配列を結合させたセファロースビーズに反応させたサンプルとを用いた。LDS サンプルバッファーによりタンパク質を溶出し、SDS-PAGE を行い、コントロールのサンプルと比較して、サイレンサー配列を含む 50 bp においてバンド強度が強くなるバンドを切り出し、このバンドに含まれるタンパク質を質量分析により同定した (図 2)。

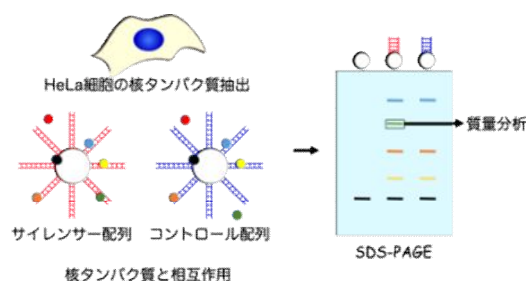


図 2. サイレンサー配列と相互作用するタンパク質の同定法

### (3) サイレンサー配列と相互作用するタンパク質の強制発現やノックダウンの影響

サイレンサー配列と相互作用するタンパク質を複数種類同定したので、その機能を調べるために、HeLa 細胞においてそれらのタンパク質を強制発現、または、ノックダウンした細胞を作製した。それらの細胞において(1)で用いたレポーターアッセイによりプロモーター活性の抑制が見られるか観察した。

さらに定量的 PCR を行い、内因性 BRCA2 の相対的な発現量を定量した。

## 4. 研究成果

### (1) サイレンサー配列存在の確認と領域の限定

まず、プロモーターとイントロンの配列の位置関係を逆にしても、プロモーター活性が抑制されたので、この領域にサイレンサー配列が存在する事が示唆された(図 3)。

次に 100 bp ずつ 5'側と 3'側から短縮したコンストラクトを解析することで、サイレンサー配列が存在する領域を絞っていった。今回は、図 3 において緑色で示される領域に焦点を当てて、さらに 50 bp の長さ限定した(図 3)。

次に限定した 50 bp の領域に変異を 10 bp 導入し、サイレンサー配列が何処にあるのか調べたところ、サイレンサー配列が存在すると考えられる 30 bp を同定する事が出来た。

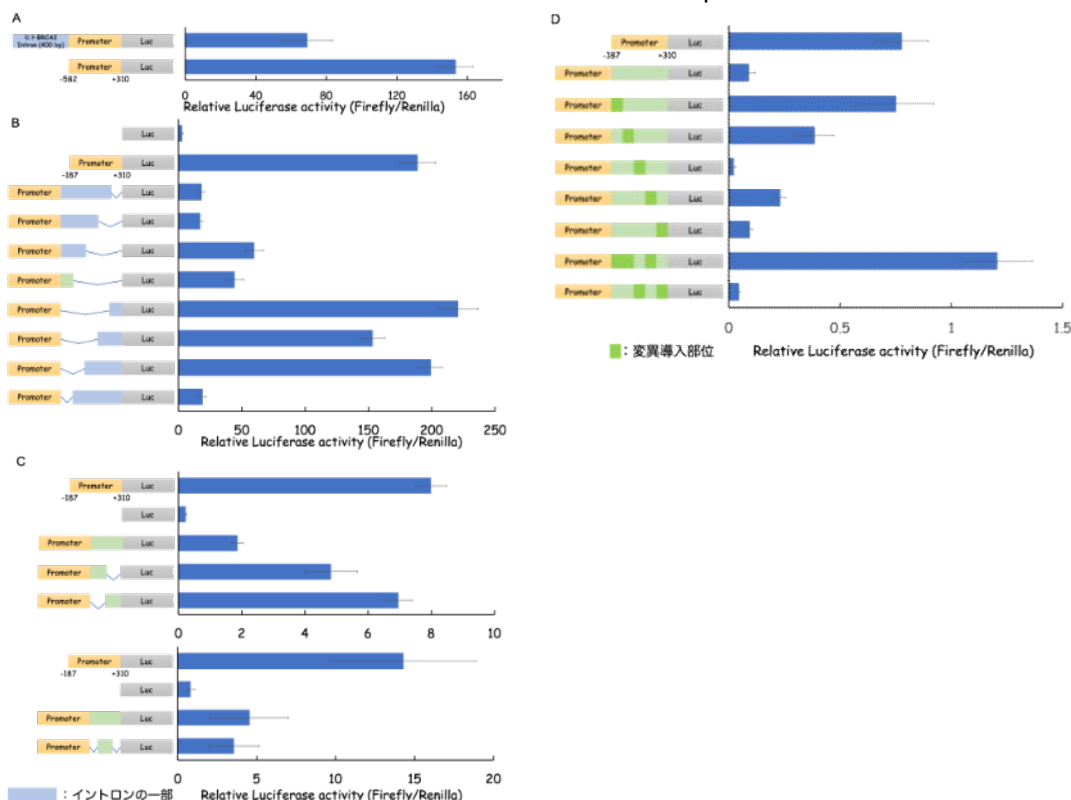


図 3. サイレンサー配列の限定

- プロモーターとサイレンサー配列を含むイントロンの位置を逆にした場合でもプロモーター活性が抑制された。
- 5'側および3'側から 100 bp ずつ短縮したコンストラクトを解析し、サイレンサー配列が含まれるであろう 100 bp を特定した。
- B で特定した領域をさらに 50 bp の範囲に限定した。中央の 50 bp にサイレンサー配列配列が含まれることが示唆された。
- 限定した 50 bp に 10 bp ずつ変異を導入したコンストラクトを解析し、特に重要な 30 bp の配列を同定した。

### (2) サイレンサー配列と相互作用するタンパク質の同定

同定した 50 bp を用いて、この配列と相互作用する核タンパク質を生化学的な精製手法により同定した。

細胞の抽出法により抽出されるタンパク質が変化するため、それぞれの方法で合計 6 種類のタンパク質を同定する事が出来た(図 4)。

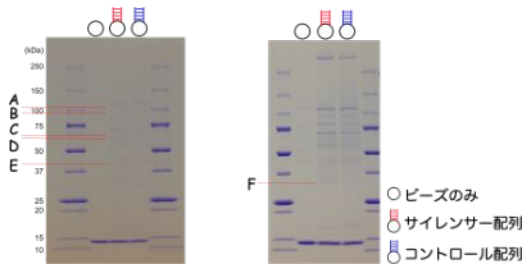


図 4. サイレンサー配列と相互作用するタンパク質の同定

サイレンサー配列とコントロール配列を結合させたビーズを用いて、それらの DNA、に相互作用するタンパク質を精製し SDS-PAGE により分析した。染色強度に差があるバンドを質量分析によりタンパク質の同定を試み、6 種類の転写抑制因子の候補タンパク質を同定した。

### (3) サイレンサー配列と相互作用するタンパク質の強制発現やノックダウンの影響

6 種類の候補タンパク質を強制発現させた細胞を作製し、(1)と同様の方法でプロモーター活性の抑制能を調べた。その結果、候補タンパク質 E を除く、5 種類のタンパク質を強制発現させるとプロモーター活性がさらに抑制された (図 5)。

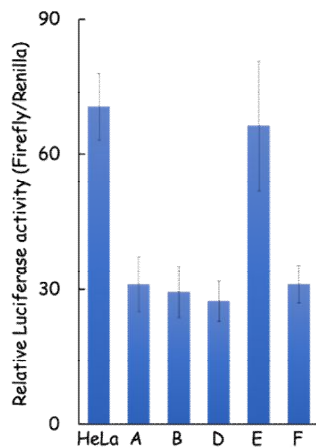


図 5. 転写抑制因子の候補タンパク質の強制発現による BRCA2 プロモーター活性における影響

次にこの 5 種類の候補タンパク質をノックダウンした細胞を作製し、プロモーター活性の良く性能を調べたところ、候補タンパク質 F のみ転写抑制が解除された (図 6)。すなわち、この候補タンパク質 F が最も転写抑制因子である可能性が高いと考えられた。

また、この遺伝子をノックダウンした細胞では、内因性 BRCA2 の mRNA の発現量が HeLa 細胞と比較して半減していた。

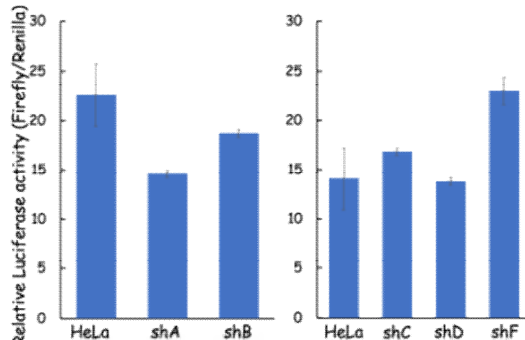


図 6. 転写抑制因子の候補タンパク質のノックダウンによる BRCA2 プロモーター活性における影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 吉川泰永、折野宏一  
BRCA2 の新規サイレンサー配列の同定と解析  
第 41 回分子生物学会(2018 年)

2. 吉川泰永、大隅恒佑、森松正美、折野宏一  
腫瘍抑制遺伝子 BRCA2 のエキソン 11 における新規腫瘍関連変異の検索  
第 161 回獣医学会学術集会(2018 年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。