

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340027

研究課題名(和文) BCL11Bとその変異の放射線応答への影響：p53-MDM2シグナル回路の解析

研究課題名(英文) Effect of BCL11B and its mutations on the radiation response: analysis of a p53-MDM2 feed-back loop

研究代表者

小幡 美貴 (OBATA, Miki)

新潟大学・医学部・教務職員

研究者番号：00420307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子BCL11Bの機能に注目しp53-MDM2調節回路について解析してきたが、近年、クロマチン再構成複合体SWI/SNFを構成する成分の変異が種々のがんに関与し、BCL11Bがその一構成成分であるとの報告がなされた。そこで、我々もBCL11Bの変異体を用いて機能解析を行った。その結果、BCL11BがSWI/SNF複合体に結合し、BCL11B変異により複合体から離脱することを見いだした。これはBCL11BがSWI/SNF複合体を介して細胞増殖を制御することを示唆した。しかし、BCL11Bの点変異が線照射によるp53-MDM2の周期変動に与える影響については、明らかな相違は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive profiling of cancer genomics has revealed that somatic mutations of genes encoding SWI/SNF chromatin complexes are a common driver mechanism of tumorigenesis. Since BCL11B was reported to affect transcription as a SWI/SNF component, we examined whether BCL11B incorporated into SWI/SNF complexes in HCT116 cells by transfecting BCL11B expression plasmids into cells, followed by glycerol density sedimentation analysis of the cell lysates. Most of the wild-type BCL11B but not the mutant-type BCL11B proteins were detected in the fractions of large complexes with BRG1 and other SWI/SNF components, indicating that BCL11B is the subunit of SWI/SNF complexes. Initially, we attempted to investigate whether the mutation of BCL11B affects the oscillation of p53-MDM2 by gamma ray irradiation. We failed to detect the difference of oscillation of p53-MDM2 between in the presence of wild-type and mutant-type BCL11B.

研究分野：分子生物学

キーワード：BCL11B がん抑制遺伝子 SWI/SNF複合体 放射線応答 p53-MDM2フィードバックループ

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線応答に Bcl11b は関与する: Bcl11b^{KO/+}マウスにガンマ線照射をすると、胸腺細胞のS期の細胞の割合は野生型マウスに比べ、約3倍多くなり、周期の停止が減弱することがわかった。p53^{KO/+}マウスを用い、同様の照射実験を行うと、期待通り周期の停止が減弱し、Bcl11b^{KO/+}p53^{KO/+}ダブルヘテロ型マウスではさらに減弱が顕著となる。これは Bcl11b が放射線応答に関与することを示すが、その機構は不明である。また、細胞の放射線照射応答ではp53が中心的な役割を果たすことが知られている。我々は、BCL11Bがp53制御下にあるMDM2の発現を抑制し、その抑制はp53-MDM2フィードバックループ調節機構に関与することを報告した。BCL11BによるMDM2転写活性の抑制にはMDM2-P2プロモーターに存在するp53RE(p53 responsive element)が必要であることも報告している。

(2) BCL11B はがん抑制遺伝子として働く: Bcl11bはマウスモデルを用いた放射線発がん実験により申請者が単離したハプロ不全型がん抑制遺伝子で転写因子として作用し、組織分化や細胞増殖さらにはがん化に関与することが明らかになってきている。一方、Bcl11bは細胞分化を制御する因子であることもわかっている。胸腺、神経、皮膚、腸管、歯や耳などの組織で発現が確認されており、これらの組織の分化や発達に重要な役割を担っている。

2. 研究の目的

(1) 細胞の放射線照射応答やがん化ではATMタンパク質の下流に位置するp53が中心的な役割を果たす。細胞周期の停止、アポトーシスの抑制、代謝制御などの調節に関与するp53のタンパク量の調節は、p53-MDM2フィードバックループにより制御されている。p53-MDM2フィードバックループによるp53の発現調節において、その転写調節と放射線応答、細胞周期調節の機構におけるBCL11Bの役割に注目し、BCL11B変異とp53発現制御機構との関連について明らかにする。

(2) BCL11Bがクロマチン再構成複合体のひとつであるSWI/SNF複合体の一員であることが報告された。これに基づき、BCL11BがSWI/SNF複合体の構成タンパクである事を確認し、SWI/SNF複合体を介する転写の調節への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BCL11B変異タンパク発現プラスミドの作製:ヒトT-ALLで既に報告されている14種の突然変異のうち、欠失変異を呈するものを除く8種の点変異発現ベクターをミュータジェネシスキットを用いて作製する。ヒト大腸がんで見つかった2種の点変異に関しては既に作製済みである。

(2) BCL11B変異タンパク質の転写活性をレポーターアッセイで調べる:BCL11Bタンパク質が発現していない培養細胞系に変異体BCL11B発現ベクターとMDM2プロモーターのレポーターベクターおよび内部標準としてpRL-TKベクターとをco-transfectする。24時間後に細胞を回収して細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定する。転写活性と結合能を比較する。

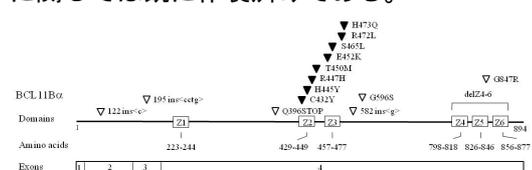
(3) BCL11BがSWI/SNF複合体の一員であることを確認する:BCL11Bを発現しているヒトT-ALL細胞MOLT4F細胞を用いて核タンパク質を分離し、グリセロール密度勾配遠心法を用いて分画する。各分画に存在するタンパクをウエスタンブロット法で解析する。

(4) BCL11Bの変異体とSWI/SNF複合体との関係を解析する:BCL11Bを発現していないヒト大腸がん由来HCT116細胞にBCL11B変異体の発現ベクターをトランスフェクションして(3)と同様に核タンパク質を分離し、グリセロール密度勾配遠心法を用いて分画し、ウエスタンブロット法で解析する。

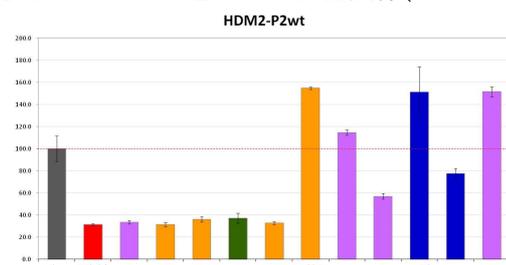
(5) Bcl11bコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析:Bcl11bコンディショナルノックアウトマウスに4-ヒドロキシタモキシフェンを投与し、Bcl11bを欠落させる。12Gyのガンマ線を照射して腸上皮の回復を観察する。

4. 研究成果

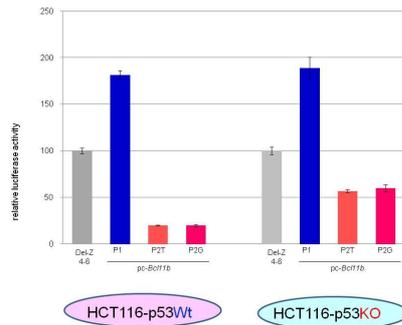
(1) 作成済みの野生型BCL11B発現ベクターを基にミュータジェネシスキットを用いて、点変異型BCL11Bを発現するベクターを作製した。T-ALLで既に報告されている14種の突然変異のうち、欠失変異を呈するものを除く8種の点変異発現ベクターを作製した。ヒト大腸がんで見つかった2種の点変異に関しては既に作製済みである。



(2) BCL11B変異によるMDM2転写抑制作用とp53との関連性について検討した。作製した8種類の点変異BCL11B発現ベクターを用いて、MDM2のプロモーター領域に対してレポーターアッセイを行った。その結果、HCT116細胞ではP2プロモーター活性に対してBCL11Bのヒスチジン変異体(H445Yと

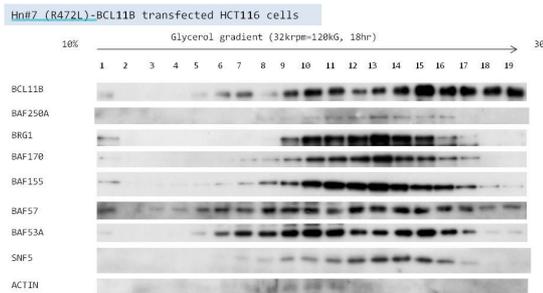
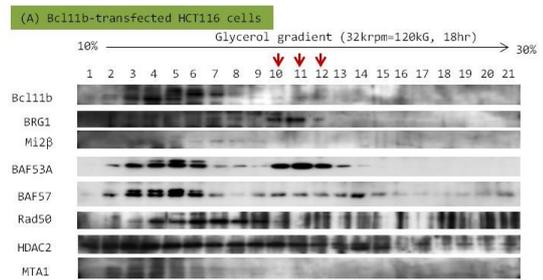
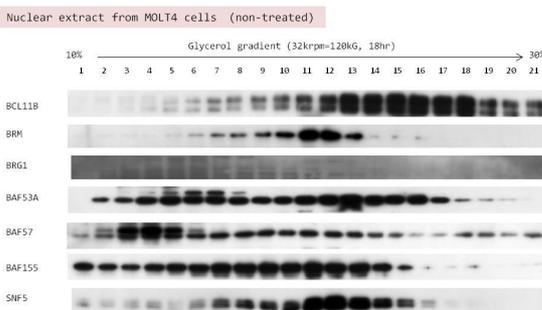


H473Q)で抑制効果が減弱した。また、p53欠損 HCT116 細胞では変異による機能障害を認めず、p53 依存性であることが判明した。また、p21 に対しては、BCL11B による転写活性の抑制は p53 非依存性で、BCL11B 変異により転写活性抑制が減弱されたが MDM2 に対する効果に比して少なかった。

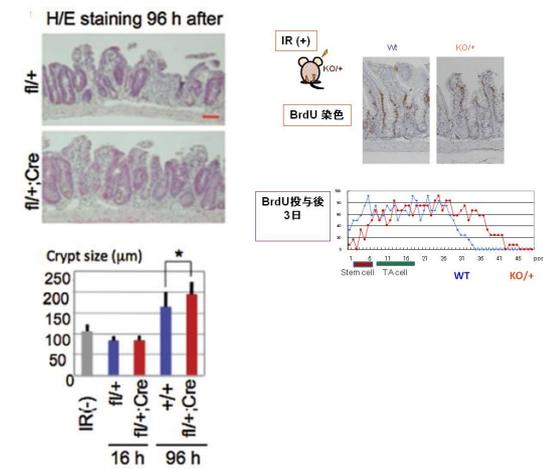


(3) BCL11B が SWI/SNF 複合体の一員として転写に関与し、変異による発がん機構は SWI/SNF 複合体機能障害に帰するとの報告に基づき、BCL11B 陽性のヒト T 細胞白血病由来 MOLT4F 細胞から核抽出物を調製し、グリセロール密度勾配遠心法で分画した。その結果、複合体が存在する分子量の大きい画分で BCL11B と共に数種の SWI/SNF 複合体の構成タンパクが確認され、BCL11B が複合体の一員であることが示唆された。また、BCL11B を発現していない HCT116 細胞に BCL11B を導入して同様の解析を試みた。核抽出物を調製し、グリセロール密度勾配遠心法で分画した結果、SWI/SNF 複合体の構成タンパクが存在する分画に BCL11B が存在することが確認できた。そこで、マウス個体を用いて同様の解析を試みた。Bcl11b 野生型マウスから胸腺細胞を採集して、核抽出物を精製した後、グリセロール密度勾配遠心法で分画し SWI/SNF 複合体構成タンパクとの複合体形成を解析した。Bcl11b は SWI/SNF 複合体の主要な構成タンパクと同じ分画に確認され、Bcl11b がマウス個体においても SWI/SNF 複合体の一員として機能している事が示唆された。

(4) BCL11B 点突然変異体発現ベクターを BCL11B を発現していない HCT116 細胞に導入して、核抽出物を調製し、グリセロール密度勾配遠心法で分画した。その結果、SWI/SNF 複合体の構成タンパクが存在する分画から BCL11B が解離することが確認できた。



(5) Bcl11b^{lox/+};Lgr5-Cre^{ERT2} マウスに 4-OHT を投与し、クリプト内の幹細胞に発現す Bcl11b を欠損させる。12Gy のガンマ線を照射して 96 時間後に腸管のクリプトサイズを測定した。その結果 4-OHT で bcl11b を欠損させると、4-OHT 処理をしないコントロールマウスに比べてクリプトサイズが明らかに増加することが判明した。また、Bcl11b^{KO/+} マウスでは野生型に比べて、ガンマ線照射後に腸上皮の回復期で BrdU(+)細胞数が多い状態が継続していた。これらの事から、Bcl11b の欠損により細胞増殖抑制が掛りにくくなる事が判った。



(6) これまで BCL11B はターゲットにより転写調節能が上方制御であったり、下方制御するものが存在した。この事は、転写因子としての機能を鑑みると不思議な現象であったと言える。しかし、本研究において、BCL11B が転写因子としてではなく、SWI/SNF 複合体の一員として転写調節に関与し、発がんの抑制に寄与する事を強く示唆する結果が得られた。

一方、BCL11B が MDM2 のプロモーターに結合し、p53 依存的に転写調節に働く事から、

BCL11B が p53-MDM2 フィードバックループの調節に深く関わっている事が示唆されていた。BCL11B に生じた変異によって p53-MDM2 フィードバックループの周期的変動に変化をもたらす結果を期待したが、これを裏付けるに十分な結果を得ることが出来なかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Sakamaki A, Katsuragi Y, Otsuka K, Tomita M, Obata M, Iwasaki T, Abe M, Sato T, Ochiai M, Sakuraba Y, Aoyagi Y, Gondo Y, Sakimura K, Nakagama H, Mishima Y, Kominami R. Bcl11b SWI/SNF-complex subunit modulates intestinal adenoma and regeneration after γ -irradiation through Wnt/ β -catenin pathway. Carcinogenesis. 2015 Jun;36(6):622-31. 査読有 doi: 10.1093/carcin/bgv044.

Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green PL, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. Cancer Sci. 2015 Apr;106(4):461-5. 査読有 doi: 10.1111/cas.12618.

Kamimura K, Abe H, Kamimura N, Yamaguchi M, Mamizu M, Ogi K, Takahashi Y, Mizuno K, Kamimura H, Kobayashi Y, Takeuchi M, Yoshida K, Yamada K, Enomoto T, Takakuwa K, Nomoto M, Obata M, Katsuragi Y, Mishima Y, Kominami R, Kamimura T, Aoyagi Y. Successful management of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy: report of a first Japanese case. BMC Gastroenterol. 2014 Sep 13;14:160. 査読有 doi: 10.1186/1471-230X-14-160

Katsuragi Y, Anraku J, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Obata M, Mishima Y, Sakuraba Y, Gondo Y, Kodama Y, Nishikawa A, Takagi R, Ohshima H, Kominami R. Bcl11b transcription factor plays a role in the maintenance of the ameloblast-progenitors in mouse adult maxillary incisors. Mech Dev. 2013 Sep-Oct;130(9-10):482-92. 査読有 doi: 10.1016/j.mod.2013.05.002.

Go R, Hirose S, Katsuragi Y, Obata M, Abe M, Mishima Y, Sakimura K, Kominami R. Cell of origin in radiation-induced premalignant thymocytes with differentiation capability in mice conditionally losing one Bcl11b allele. Cancer Sci. 2013 Aug;104(8):1009-16. 査読有 doi: 10.1111/cas.12193.

[学会発表](計 4 件)

小幡 美貴, Role of BCL11B in the SWI/SNF chromatin remodeling complexes, 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

小幡 美貴, Effect of mutations in BCL11B on the SWI/SNF chromatin remodeling complexes, 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、京都国際会館 (京都府・京都市)

小幡 美貴, Effect of BCL11B mutations identified in T-ALL leukemias on SWI/SNF chromatin remodeling complexes, 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

小幡 美貴, 転写因子 BCL11B は p53 を介して細胞周期を調節する?、第 56 回日本放射線影響学会大会、2013 年 10 月 18-20 日、クラウンパレスホテル青森 (青森県・青森市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小幡 美貴 (OBATA,Miki)
新潟大学・医学部・教務職員
研究者番号 : 00420307

(2)研究分担者

三嶋 行雄 (MISHIMA,Yukio)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号 : 30142029

木南 凌 (KOMINAMI,Ryo)
新潟大学・医歯学総合研究科・研究員
研究者番号 : 40133615

葛城 美德 (KATSURAGI,Yoshinori)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号 : 60401759

(3)連携研究者

()

研究者番号 :