

審査の結果の要旨

氏名 本城 晴紀

本研究は、ゲノム網羅的 siRNA スクリーニングで新規 HR 因子候補として抽出された BRCA1 転写共役因子 MED1 について、BRCA1 との相互作用、相同組換修復経路の制御能、転写副産物 R-loop の処理能に関する機能解析を行ったものである。また BRCA1 変異による R-loop 蓄積の意義に関して、細胞株および 18 例の高異型度漿液性癌の臨床検体を用いた検討も行っており、下記の結果を得ている。

1. 免疫沈降法で MED1 が BRCA1 と細胞内において相互作用することを確認した。さらに MED1 が BRCA1 の BRCT 領域とヒト細胞内で複合体を形成すること GST pull down 法にて示した。またルシフェラーゼアッセイにより MED1 過剰発現が BRCA1-BRCT の転写活性を正に制御することが示された。

2. MED1 を siRNA でノックダウンした後、Double thymidine block にて細胞周期を G1 / S 境界に同調させ、同調解除した細胞を用いて、FACS による細胞周期解析を行い、MED1 欠失細胞では G2 / M 期停止が生じることが示された。ウエスタンブロッティングでは MED1 が BRCA1 依存性転写産物 p21、GADD45 $\alpha$  の発現を調節していることが示され、MED1 は BRCA1 の抗腫瘍的な細胞周期調節機能に寄与する可能性が示唆された。

3. コロニー形成アッセイでは MED1 を siRNA でノックダウンした細胞では IR、CDDP の感受性が高まることが示された。MED1 を siRNA でノックダウンした後に Hydroxyurea 処理を施し、主要な HR 因子のタンパク発現についてウエスタンブロッティングで観察したところ、MED1 欠失細胞では転写制御を介した ATM、Chk2、H2AX のリン酸化タンパク発現の低下を認めた。免疫染色では MED1 ノックダウンにより DSB 部位への pATM、 $\gamma$ H2AX、RPA の集積が阻害されており、MED1 は ATM 下流の広範囲に渡ってシグナルを制御し DSB 修復に寄与していると考えられた。

4. DR-GFP アッセイによる検討では、BRCA1 ノックダウン細胞では HR 活性がコントロールに比して約 1/7 に、MED1 ノックダウン細胞では約 1/2 に減弱し、MED1 が HR 活性に寄与する可能性が示された。免疫染色では MED1 ノックダウンにより DNA 損傷部位への RAD51、 $\gamma$ H2AX、BRCA1 の核内集積減弱が示され、DR-GFP アッセイの結果と符合した。

5. EJ5-GFP assay では MED1 ノックダウン細胞で C-NHEJ 活性が約 1/2 に低下していた、ウエスタンブロッティングでの検討では MED1 欠失細胞での DNA-PKcs のリン酸化が著しく抑制されており、MED1 は DNA 損傷を認識するレベルの C-NHEJ 上流域の制御に対しても影響を持つ可能性が示唆された。また MED1 ノックダウン条件では PARP1 のリン酸化抑制と、

XRCC1 の転写抑制を認め、MED1 欠失が Alt-NHEJ にも支障をきたす可能性が推察された。これらの結果から BRCA1 非依存性の DNA 損傷修復路に関しても MED1 はその上流域で寄与する可能性が示唆された。

6. コメットアッセイでは *MED1* ノックダウンにより IR による DNA 損傷が遷延することが示され、ウエスタンブロッティングでは *MED1* ノックダウンにより ATM、Chk2 のリン酸化が遅延・遷延する現象を認めた。

7. RNaseH1 を併用したコメットアッセイでは、*MED1* ノックダウンにより生じた DNA 損傷が、RNaseH1 強制発現によりキャンセルされる現象が確認された。さらに免疫染色では *MED1* ノックダウンによる R-loop 蓄積を認め、*MED1* が R-loop の処理に寄与する可能性が示唆された。

8. 培養細胞を用いた蛍光免疫染色、DRIP アッセイでは、*BRCA1* のノックダウン下で核内 R-loop が増加することが示された。

9. 既に *BRCA1* 変異プロファイルが判明している高異型度漿液性癌臨床検体 18 例 (*BRCA1*mut. 9 例 vs. g*BRCA1*wt. 9 例) を対象として免疫染色を行ない、腫瘍部での R-loop 蓄積を評価したところ、*BRCA1*変異陽性群において変異陰性群に比して腫瘍部における R-loop 蓄積が優位に増加すること、*BRCA1*変異陽性例で正常卵管上皮から卵管上皮内癌へ移行するにつれて R-loop 蓄積が増加することが示された。*BRCA1* 変異キャリアでは R-loop 漸増が正常卵管上皮から STIC、高異型度漿液性癌への発展過程において早期から生じている可能性が示唆された。

以上、本論文では *MED1* が *BRCA1* の BRCT 領域に結合し、BRCT 領域の転写活性を促進する新規タンパク質であることを解明した。また *MED1* は相同組換え修復経路、余剰な R-loop の分解除去、細胞周期調節 (G2 / M 期チェックポイント制御) に寄与することで癌抑制的な機能を担うことが示された。本研究はこれまで未知に等しかった、*MED1* の相同組換え修復経路における機能の解明に重要な貢献をなすと考えられる。加えて、*BRCA1* 変異陽性高異型度漿液性癌において、正常卵管から STIC、高異型度漿液性癌へと発展する発癌過程に R-loop の漸増が関連している可能性についても明らかにした。この結果は、*BRCA1* 変異キャリアに対する卵巣癌発症の予防戦略や早期発見のバイオマーカーの確立に貢献するものと考えられる。

よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。