

論文の内容の要旨

論文題目 BRD4/CHD4 複合体による遺伝子発現制御機構の解析

氏名 坂内 千尋

【序論】

Bromodomain-containing protein 4 (BRD4)はプロモドメインと extra-terminal (ET) ドメインを有するタンパク質である。BRD4 はそのプロモドメインによりアセチル化ヒストンを認識し、他の転写関連因子との相互作用を介して様々な遺伝子の発現に関与する。疾患との関連においては、BRD4 は様々な種類のがん細胞で過剰発現し、c-Myc などのがんドライバー遺伝子の発現上昇を介してがん細胞の増殖に関与していることが知られ、BRD4 阻害剤によるがん治療研究が精力的に進められている。その中でBRD4 のプロモドメインとアセチル化ヒストンとの結合を競合的に阻害する低分子化合物は、アセチル化リジン模倣型 BRD4 阻害剤として様々ながんモデルにおける有効性が確認され、複数の化合物がすでに初期臨床試験にまで進んでいる。しかしながら、最近、JQ1 をはじめとするアセチル化リジン模倣型 BRD4 阻害剤への抵抗性を示すがん種も報告されてきた。その抵抗性をもたらす分子機構については不明な点が多いことから、BRD4 による転写制御のより詳細な分子機構の解明が望まれている。当研究室では、BRD4 による転写制御の新たなメカニズムを追究するため、タンパク質間相互作用を担うことが知られているものの、詳細な解析が行われてこなかった BRD4 の ET ドメインに着目して研究を進めてきた。質量分析法を用いて ET ドメインの結合因子解析を行い、chromodomain helicase DNA binding protein 4 (CHD4)を同定した。CHD4 は転写抑制複合体である Nucleosome Remodeling Deacetylase (NuRD)の構成因子の一つであることから、CHD4 が BRD4 と結合することにより転写を抑制していると考えられた。これは転写抑制因子としてのBRD4 という新しい遺伝子発現制御機構の可能性を示唆するものであり、その解析はBRD4 の詳細な転写制御機構の解明につながると考え、BRD4/CHD4 複合体による遺伝子発現制御機構と、その細胞機能への寄与について研究を進めた。

【方法・結果】

1. CHD4 はBRD4 ET ドメインと結合する

まず質量分析法で同定された CHD4 が実際に BRD4 ET ドメインに結合するかについて、リコンビナント BRD4 ET ドメインと CHD4 の欠損変異体のプルダウン実験によって検討を行った。その結果、CHD4 は BRD4 ET ドメインと 1-487 アミノ酸領域で結合することが明らかになった。このアミノ酸領域のうち、さらに詳細な結合領域の同定をペプチドスポットアッセイにより行ったところ、CHD4 の 286-303 アミノ酸の中の「LKIKL」配列が結合に重要であることが示された。また、核内でのタンパク質結合を検出する LacO/LacI システムによっても BRD4 ET ドメインと CHD4 との結合が確認され、細胞内においても BRD4 ET ドメインと CHD4 が結合することが明らかとなった。

2. BRD4/CHD4 複合体はオートファジー・アポトーシス・細胞周期を促進する遺伝子群の発現を抑制する

続いて、BRD4/CHD4 複合体が制御する遺伝子群を検討するべく、大腸がん由来の細胞株である HCT116 細胞を用いて RNA-sequencing (RNA-seq) を行った。まず CHD4 を欠損した際の遺伝子発現を検討するため、siRNA を 24 時間処置して CHD4 のノックダウンし、RNA-seq を行った。その結果、CHD4 の transcripts per million (TPM) により CHD4 のノックダウンの成功は確認できたものの、CHD4 欠損によって有意に発現変動が見られた遺伝子のうち、1.5 倍以上に発現上昇したのは 89 遺伝子、0.6 倍以下に発現低下したものは 44 遺伝子であり、大きな発現変動が見られた遺伝子は多くはなかった。そこで十分な検討のためには異なる系が必要であると考え、murine leukemia virus (MLV) インテグラーゼの部分ペプチドに着目した。このペプチドは BRD4 ET ドメインと相互作用することが知られており、BRD4 と CHD4 との相互作用を阻害し得ると考えられる。MLV ペプチドによって BRD4/CHD4 複合体の結合が解離するかについて、LacO/LacI システムを用いて検討すると、検出用に蛍光タンパク質 TagBFP を付加した MLV ペプチドの発現により BRD4 と CHD4 が解離することが示された。MLV による BRD4 と CHD4 の結合阻害が確認できたため、このペプチドを用いて BRD4/CHD4 複合体によって発現制御される遺伝子を検討するべく、HCT116 細胞にドキシサイクリン (Dox) により MLV を誘導して RNA-seq を行った。また、MLV との比較のため JQ1 を 24 時間処置した後の RNA-seq も行った。ここで BRD4/CHD4 複合体が抑制性転写複合体として機能する可能性の検討を目的とすることから、MLV 誘導または JQ1 処置によって発現上昇した遺伝子を標的遺伝子として取得し、両条件で共通して得られた発現上昇遺伝子に対してエンリッチメント解析を行った。その結果、細胞周期の停止・アポトーシス・オートファジーを誘導する遺伝子群の発現上昇が見られた。さらに、これらの経路の関連遺伝子の発現上昇は JQ1 に比較して MLV で大きい傾向が見られた。

3. MLV は JQ1 抵抗性がん細胞の生存・増殖を抑制する

細胞周期の停止及びアポトーシスやオートファジーの促進が実際に起きているかについて検討を行った。まずオートファジーについて Dox または JQ1 を 24 時間処置した後にオートファジーマーカーである LC3B-II の蓄積によって検討したところ、MLV 及び JQ1 のいずれによっても促進された。次にアポトーシスについてカスパーゼ 3 の活性の測定により検討を行った。その結果、Dox による MLV 誘導によってカスパーゼ 3 活性が上昇したのに対し、JQ1 によってはその活性の上昇が見られなかった。続いて PI によって DNA を染色し、フローサイトメトリーを用いて各細胞の DNA 量を測定することで細胞周期を検討した。Dox による MLV 誘導で G1/G0 期の細胞集団の割合が増加したが、JQ1 では細胞集団の割合の変化は見られなかった。以上のことから、MLV は細胞周期の停止・アポトーシス・オートファジーを誘導するのに対し、JQ1 はオートファジーを促進するのみであることが示唆された。最後に MLV 及び JQ1 の HCT116 細胞の生存・増殖への寄与をコロニーフォーメーションアッセイにより検討した。その

結果、JQ1 の効果を検討すると増殖の抑制は見られなかった一方で、MLV の誘導によって HCT116 細胞の増殖が抑制されたことから、MLV は JQ1 抵抗性のがん細胞の生存・増殖を抑制することが示唆された。

【総括・展望】

本研究によって BRD4/CHD4 複合体は細胞周期の進行・アポトーシス・オートファジーの関連遺伝子群の転写を負に制御することが示された。また、その転写制御の阻害により上記経路が活性化されがん細胞の増殖を抑制することを示した。これは JQ1 抵抗性を示すがん細胞においても確認された。このような結果から、JQ1 抵抗性がん細胞において、JQ1 は BRD4/CHD4 複合体の阻害により細胞周期・アポトーシス・オートファジー関連遺伝子の発現を上昇させるものの、その上昇幅は大きくなく、実際にオートファジーは引き起こすものの細胞周期の停止やアポトーシスの促進は引き起こさず、腫瘍抑制効果が見られないこと、それに対して BRD4/CHD4 の結合を阻害する MLV は JQ1 と同様に細胞周期・アポトーシス・オートファジー関連遺伝子の発現を上昇させ、かつその上昇幅が大きいため実際にオートファジーだけでなく細胞周期の停止やアポトーシスの促進も引き起こすことで細胞の生存・増殖を抑制できると考えられる。JQ1 抵抗性のがん細胞は複数存在することが知られていることから、BRD4/CHD4 結合は JQ1 に抵抗性を示す様々ながんの新たな治療標的となることが示唆された。本研究では BRD4/CHD4 結合阻害を MLV ペプチドの発現により行ったが、今後 BRD4/CHD4 結合を阻害する化合物を開発することができれば、既存のアセチル化リジン模倣型 BRD4 阻害剤に抵抗性を示す様々ながんの有効な治療薬の創出に繋がると考えられる。