

滑膜肉腫原因キメラ癌遺伝子 SYT-SSX1 産物との 結合分子の解析

学位論文内容の要旨

[背景]

滑膜肉腫は若年成人の四肢、関節近傍に好発する腫瘍で、腫瘍細胞には特徴的な 18 番染色体と X 染色体の相互転座 $t(X;18)(p11.2;q11.2)$ が認められ、その結果 18 番染色体上の synovial sarcoma translocation (SYT) 遺伝子と X 染色体上の synovial sarcoma X breakpoint (SSX) 遺伝子が融合した SYT-SSX 遺伝子が形成される。現在 SYT-SSX 遺伝子は滑膜肉腫の診断マーカーとして広く用いられている。

SYT は分子量約 57 kDa の蛋白で、多くの臓器で発現している。SYT の N 末 54 アミノ酸は多くの種で保存された領域であることから SYT N-terminal homology (SNH) 領域、また中央部の約 200 アミノ酸はグルタミン(Q)、プロリン(P)、グリシン(G)、チロシン(Y)に富む配列を有しており QPGY 領域と称されているが、明らかな機能は判明していない。

また、SSX 遺伝子には homologue である SSX1 から 9 ままで報告されており、このうちキメラ遺伝子が形成されるのは主に SSX1 と SSX2 遺伝子である。SSX は分子量約 30 kDa の蛋白で、正常組織では精巣に発現している。また一部の腫瘍細胞でも発現が認められるが、正常滑膜では発現していない。SSX の N 末端には転写抑制因子と相同性のある Kruppel-associated box (KRAB) 領域が存在し、C 末端の 33 アミノ酸からなる SSX repressor domain (SSXRD) 領域は転写抑制能を有することが、人工的な転写活性化系において示されている。

SYT-SSX は細胞の転写を活性化し、癌化を誘導することが示唆されているが、野生型 SYT 及び SSX の機能が不明であることから、癌化のメカニズムも不明な点が多い。

[目的]

現在までに SYT 分子に結合する転写調節因子が幾つか報告されている。その中の hBRM を含むクロマチンリモデリング SWI/SNF 複合体は約 2 MDa であり、また p300 も巨大複合体を形成することが知られている。本研究ではまず初めに、滑膜肉腫細胞において SYT-SSX とこれらの蛋白が巨大複合体として存在するか否かを検討した。

SSX は既知の DNA 結合配列をもたないため、何らかの蛋白と結合し、転写を制御していると考えられている。最近、SSX と共に精製されると報告されたコアヒストンは 2 個の(H2A-H2B) 2 量体が (H3-H4)₂ 量体と結合している 8 量体で、H2A には H2A.X、H2A.Z、macroH2A、H2A.Bbd などの variant があることが知られている。SSX はコアヒストンのうちのいずれかに直接結合することで転写抑制機能の役割を果たすという仮説を立て、SYT-SSX1 および SSX1 とヒストンとの結合解析を行った。

[方法]

滑膜肉腫細胞株や SYT-SSX1 安定発現細胞株を用いてゲルろ過クロマトグラフィー解析を行い SYT-SSX1 とこれに結合する蛋白との複合体の分子量の検討を行った。

SYT-SSX1、SSX1 とヒストンサブユニットとの結合解析は、大腸菌から精製した GST-SSX1 と各ヒストンの 293T 細胞での一過性発現系の細胞抽出液を用い GST pull-down assay を行った。さらに、

SYT-SSX1 または SSX1 と各ヒストンを 293T 細胞に一過性に共発現させて結合解析を行い、得られた結果から GST 融合 SSX1 欠失変異体を作製し、SSX1 におけるヒストンとの結合領域の同定を行った。

〔結果〕

ゲルろ過解析の結果、SYT-SSX1 は分子量 67 kDa の蛋白であるが、分子量約 450 kDa までの複合体、さらに一部は SWI/SNF 複合体の分子量である 2MDa、あるいはそれ以上の大きさの複合体を形成して存在していることが観察された。hBRM が発現していない細胞株 SW13 ではこの巨大複合体はみられなかった。

GST pull-down assay を行ったところ、ヒストン H2A と variant である H2A.X と H2A.Bbd 及び H2B に陽性バンドがみられ、H3 との弱い結合も観察された。一方、(H2A-H2B) または (H3-H4) の組合せで共発現させた抽出液を用いた場合では、(H2A-H2B) では GST-SSX1 との結合が認められ、(H3-H4) では弱い結合が認められた。

SYT-SSX1 または SSX1 と各ヒストンとの結合解析では、SYT-SSX1 においてヒストンを沈降させて SYT-SSX1 を検出した場合に H3 と H4 との結合がみられた。また SSX1 においては SSX1 を沈降させてヒストンを検出した場合、H2A.Bbd との強い結合と H2A.X でも弱い結合がみられた。

4 つの SSX1 欠失変異体と各ヒストンとの結合性解析では、SSX1mut1 (1-110 アミノ酸)あるいは mut2 (111-188 アミノ酸)を沈降し、ヒストンを検出した際に、SSX1mut1 と H2A.Bbd において強い結合がみられた。SSX1mut2 ではこの結合は認められなかった。これらのことから H2A.Bbd に着目し SSX1mut3 (1-61 アミノ酸)、mut4 (62-110 アミノ酸)を用いて解析を行ったところ、SSX1mut3 を沈降し、H2A.Bbd を検出した際に結合が認められた。以上のことから SSX1 の N 末端 61 アミノ酸が H2A.Bbd との結合領域であることが示唆された。

〔考察〕

ゲルろ過解析の結果、一部の SYT-SSX1 は SWI/SNF 複合体の分子量である約 2 MDa あるいはそれ以上の大きさの複合体を形成して存在していることが観察され、SWI/SNF 複合体に加えて新たな分子が存在する可能性が示唆された。SWI/SNF 複合体のサブユニットの 1 つである hBRM が発現していない細胞株 SW13 ではこの巨大複合体はみられなかったことから、この複合体は SYT-SSX1 と SWI/SNF 複合体との結合によるものであることが示唆された。

コアヒストンは (H2A-H2B) で 2 量体を形成し、(H3-H4)₄ 量体と結合して 8 量体となることが知られている。GST pull-down assay での SSX1 とヒストン H3、H4 との弱い結合は、SSX1 と結合した (H2A-H2B) 2 量体にさらに結合した H3、H4 が間接的に検出された結果と思われ、SSX はヒストン H2A か H2B に結合すると考えられた。

これまで報告された SSX とコアヒストンとの結合は SSX の C 末 78 アミノ酸であったが、本研究では以前の報告とは異なり、N 末端においてヒストン H2A.Bbd と結合していることが確認された。H2A.Bbd は不活性化した X 染色体に存在しない H2A ヒストンであることから、SSX は何らかの転写因子と競合して転写活性化状態のヒストンに結合することで、転写抑制に働くと予想される。今後は SSX1 と結合がみられた H2A.Bbd を含めた H2A variant での結合領域の解析、さらにはヒストンと結合することによる SSX 分子の機能の解明が必要と考えられた。また SSX1 と H2A.Bbd との結合が SYT-SSX 融合遺伝子の発癌機構において、どのような機能を有しているのかを現在検索している。

〔結論〕

滑膜肉腫細胞において、SYT-SSX1 は巨大複合体を形成していることがゲルろ過で示された。また、この複合体は hBRM(-)細胞では認められなかった。

293T 細胞を用いた一過性の発現系において、SSX1 は N 末端においてヒストン H2A variant である H2A.Bbd と結合することが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

滑膜肉腫原因キメラ癌遺伝子 SYT-SSX1 産物との 結合分子の解析

滑膜肉腫は若年成人の四肢関節近傍に好発する悪性腫瘍で、腫瘍細胞には特徴的な相互転座 t(X;18)(p11.2;q11.2)が認められる。その結果 18 番染色体上の synovial translocation protein (SYT)遺伝子と X 染色体上の synovial sarcoma X breakpoint (SSX)遺伝子が融合した SYT-SSX 遺伝子が形成され、現在この融合遺伝子は滑膜肉腫の診断マーカーとして広く用いられている。しかし、野生型 SYT 及び SSX の機能が不明なため、癌化のメカニズムも不明な点が多い。

SYT は分子量約 57 kDa の蛋白で、多くの組織で発現している。現在までに SYT 及び SYT-SSX に結合する転写調節因子が幾つか報告されている。その中の hBRM を含むクロマチンリモデリング SWI/SNF 複合体は約 2MDa であり、また p300 も巨大複合体を形成することが知られている。本研究ではまず初めに、滑膜肉腫細胞において SYT-SSX1 がどの位の分子量の複合体として存在するかを、滑膜肉腫細胞株や SYT-SSX1 安定発現細胞株を用いてゲルろ過クロマトグラフィー解析を行い分子量の検討を行った。

SYT-SSX1 は分子量 67 kDa の蛋白であるが、分子量約 450 kDa までの複合体、さらに一部は SWI/SNF 複合体の分子量である 2MDa、あるいはそれ以上の大きさの複合体を形成して存在していた。hBRM が発現していない細胞株 SW13 ではこの巨大複合体はみられず、この複合体は SYT-SSX1 と SWI/SNF 複合体との結合によるものであり、SWI/SNF 複合体に加えて新たな分子が存在する可能性が示唆された。

また、SSX1 は分子量約 30 kDa の蛋白で、正常組織では精巣に、また一部の腫瘍細胞でも発現が認められる。SSX の N 末端には KRAB 領域が存在し、C 末端の SSXRD 領域は転写抑制能を有することが示されているが、既知の DNA 結合配列をもたず何らかの蛋白と結合し転写を制御していると考えられている。最近、SSX と共に精製され C 末端で結合していると報告されたコアヒストンは、2 個の(H2A-H2B) 2 量体が(H3-H4)₂ 4 量体と結合した 8 量体で、H2A には H2A.X、H2A.Z、H2A.Bbd などの variant があることが知られている。本研究では SSX はコアヒストンのうちのいずれかに直接結合することで機能の役割を果たすという仮説を立て、SSX1 及び SYT-SSX1 とヒストンとの結合解析を行った。

大腸菌から精製した GST-SSX1 と各ヒストンの 293T 細胞での一過性発現系の細胞抽出液を用いて GST pull-down assay を行った。ヒストン H2A と variant である H2A.X と H2A.Bbd 及び H2B との結合、H3 との弱い結合が観察された。SSX1 または SYT-SSX1 と各ヒストンを 293T 細胞に一過性に共発現させて結合解析を行った。SSX1 においては Bbd との強い結合と H2A.X でも弱い結合がみられ、SYT-SSX1 においては H3 と H4 との結合がみられた。この結果から GST 融合 SSX1 欠変異体を作製し、SSX1 におけるヒストンとの結合領域の同定を行った。SSX1 mut1 (1-110 アミノ酸)あるいは

mut2 (111-188 アミノ酸)において、H3、H4 とともに結合がみられなかった。SSX1 mut1 と H2A.Bbd において強い結合がみられたことから、H2A.Bbd に着目し SSX1 mut3 (1-61 アミノ酸)、mut4 (62-110 アミノ酸)を用いて同様の解析を行った。SSX1 mut3 と H2A.Bbd に結合が認められ、SSX1 の N 末端 61 アミノ酸が H2A.Bbd との結合領域であることが示唆された。

本研究では以前の報告とは異なり、SSX1 は N 末端においてヒストン H2A.Bbd と結合していることが確認された。H2A.Bbd は転写活性化領域に存在し転写を調節と考えられることから、SSX は転写活性化状態のヒストンに結合することで、転写抑制に働くと予想された。また SYT-SSX1 において H3 と H4 との結合がみられ、コアヒストンに結合することで遺伝子の発現調節に関与することが推測された。今後はヒストンと結合することによる SSX 分子の機能とこれによる SYT-SSX 発癌機構の解明が必要と考えられた。

口頭発表に当たり、副査の上出教授より、巨大複合体でのヒストンの有無、SYT-SSX の細胞局在、副査の畠山(鎮)教授より、結合したヒストンの形態、SSX と SYT-SSX の細胞内拮抗等に関する質問があった。また主査の長嶋教授より細胞株の由来、SYT-SSX が抑制すると推定される遺伝子とその遺伝子との関連、SYT の検討の有無等に関する質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は SYT-SSX1 及び SSX1 が結合する蛋白分子の解析を行い、SYT-SSX1 と SSX1 が異なるヒストンと結合性を示すことを明らかにした点で優れていると判断され、今後の滑膜肉腫の癌化機構を明らかにする上で貴重な示唆を与えたものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。