

平成 31 年 4 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04690

研究課題名(和文)新規BRCA1結合分子のゲノム安定性維持機構の解明とがん治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanism to maintain genome stability by novel BRCA1-interacting molecules and development of cancer therapy

研究代表者

千葉 奈津子(CHIBA, Natsuko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：50361192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性乳がん・卵巣がん症候群の原因遺伝子産物であるBRCA1は、BARD1と結合してDNA修復に関与する。我々は、プロテオーム解析で新規BRCA1結合分子として、OLA1とRACK1を同定し、その機能を解析した。その結果、これらの両分子が中心体に局在し、BRCA1、BARD1に直接結合し、中心体複製に重要な働きをすることが明らかになった。RACK1は、BRCA1の中心体局在を制御することも明らかになった。また、これらの分子の発現量の異常やがん由来の変異で中心体複製制御が異常になり、中心体数の異常を来すことが明らかになった。本研究により、BRCA1の新たなゲノム安定性維持機構が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRCA1のがん抑制能として、これまでは核内での機能である、DNA二本鎖切断修復能が注目されてきたが、本研究により、BRCA1が中心体複製制御において重要な機能を果たし、その機能破綻が中心体数の異常を引き起こすことが明らかになった。中心体は微小管形成中心として機能し、分裂期には紡錘体極となり、娘細胞への均等な染色体分配を担う細胞内小器官で、ゲノム安定性に重要な機能を担っている。よって、中心体制御能もBRCA1の重要ながん抑制能であると考えられた。本研究成果は遺伝性乳がんの遺伝子診断の病的意義の不明なバリエーションの病的意義の解明や、中心体を標的とした新しいがん治療法の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：BRCA1 is a tumor suppressor that is associated with hereditary breast and ovarian cancer. BRCA1 functions in DNA repair together with BARD1, a heterodimer partner of BRCA1. We identified BRCA1-interacting proteins, OLA1 and RACK1 and analyzed their function. OLA1 and RACK1 directly bound to BRCA1, and BARD1, localized the centrosomes, and functioned in the regulation of the centrosome duplication. RACK1 was involved in centrosomal localization of BRCA1. Abnormal level of the expression of OLA1 or RACK1 caused dysregulation of centrosome duplication. Cancer-derived variants of BRCA1, BARD1, OLA1, and RACK1 abolished their interaction and function in centrosome duplication. These results elucidated the novel regulatory mechanism by BRCA1 to maintain genome stability.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：BRCA1 中心体 ゲノム安定性維持

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

1. 研究開始当初の背景

BRCA1 (*Breast Cancer 1*) は、その変異により、遺伝性乳がん・卵巣がん症候群(HBOC)を引き起こすがん抑制遺伝子で、近年は散発性乳がんサブタイプである難治性のトリプルネガティブ乳がんとの関わりも注目されている。*BRCA1* は *BARD1* とヘテロダイマーを形成し、DNA修復、中心体制御、転写制御、クロマチンリモデリングなどに多様な機能に関与することが示されてきた。これまで、*BRCA1* のがん抑制能として、特に核内での機能である、DNA二本鎖切断修復経路におけるDNA修復能が注目されてきたが、*BRCA1* は中心体にも局在し、中心体数の制御や中心体依存性の微小管伸長にも関わる。中心体は微小管形成中心として機能し、分裂期には紡錘体極となり、娘細胞への均等な染色体分配を担う細胞内小器官で、ゲノム安定性に重要な機能を担っている。

我々は、*BRCA1* のさらなる機能解析のため、*BARD1* の結合分子をプロテオーム解析で探索し、Obg-like ATPase 1 (*OLA1*)を同定し、その機能を解析してきた。その結果、*OLA1* は、*BARD1* に加えて、*BRCA1*、中心体の重要な構成要素である γ -tubulin と直接結合し、間期に細胞質と中心体に、分裂期に紡錘体極に局在することが明らかになった。また、*OLA1* の発現抑制により、中心体の過剰複製と断片化が生じて中心体数が増加し、中心体依存性の微小管形成が亢進したことより、*OLA1* が重要な中心体制御分子であることが明らかになった。また、乳がん細胞株由来の *OLA1* 変異 E168Q、家族性乳がん由来の *BRCA1* 変異 I42V により、*BRCA1* と *OLA1* の結合能が消失し、中心体数の制御が異常になり、中心体数が増加した。よって、*OLA1* が *BRCA1* と共に中心体の複製を制御することが、がん抑制能として重要であることが明らかになった(引用文献)。

また、プロテオーム解析により新規 *OLA1* 結合分子として Receptor for activated C-kinase (*RACK1*)を同定した。これまでの解析により、*RACK1* が *OLA1* に加えて *BRCA1* に結合することが分かり、中心体に局在し、中心体数の制御に関与することが示唆された。さらに、*OLA1* の個体レベルでの機能を解析するため、*Ola1* ヘテロノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析したところ、他臓器転移を伴うB細胞型リンパ腫が発生することが明らかになった。

<引用文献>

Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The *BRCA1/BARD1*-interacting protein *OLA1* functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*, 53(1) : 101-114, 2014

2. 研究の目的

従来、*BRCA1* は、第2のHBOCの原因遺伝子産物 *BRCA2* とともに、がん抑制機能にはそのDNA修復能が重要と考えられてきたが、我々が多数の家族性乳がん由来の *BRCA1* 変異体のDNA修復能と中心体数の制御能を解析したところ、DNA修復能に異常はないが、中心体制御能が異常な家族性乳がん由来の変異体が多数同定された。また、*BRCA1* の生殖細胞系列変異のある患者の乳がん組織では、変異のない散発性乳がん比べて、中心体数が増加している乳がんが多いことも報告され、中心体制御能も *BRCA1* の重要ながん抑制能であることが示唆された。本研究では、*OLA1* と *RACK1* の *BRCA1* と協調した中心体制御能をさらに詳細に解析し、これら *BRCA1* 結合分子のゲノム安定性維持機構を解明する。また、*OLA1* についてはノックアウトマウスを用いて、個体レベルでの *OLA1* の機能を解析し、その機能破綻による発がんメカニズムを解明する。これらの解析により、がんの診断や治療法開発のための分子基盤を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *OLA1*、*RACK1*、*BRCA1*、*BARD1* の細胞学的、生化学的解析

OLA1、*RACK1*、*BRCA1*、*BARD1* の欠失変異体や点変異体の発現ベクターを作製した。点変異体は、site-directed mutagenesisにて作製した。免疫沈降は、HEK-293T細胞にこれらのベクターを導入し、Protein G ビーズを用いて行った。Pull-down アッセイは、大腸菌でGSTあるいはHis タグを付加した精製タンパク質を調整し、グルタチオンビーズあるいは、を用いて行った。

OLA1、*RACK1*、*BRCA1*、*BARD1* の中心体局在や、発現抑制や強制発現の中心体への影響は、抗 *OLA1* 抗体、抗 *RACK1* 抗体、抗 *BRCA1* 抗体、抗 *BARD1* 抗体、HA タグや Myc タグを付加した発現ベクターを細胞に導入した際には、抗 HA 抗体と抗 γ -tubulin 抗体で二重免疫染色を行い、抗 HA 抗体、抗 Myc 抗体で染色される細胞で、中心体への共同在や中心体数を解析した。

(2) *OLA1* ノックアウトマウスの解析

OLA1 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、全身で OLA1 をノックアウトした状態での影響を解析するため、全身で Cre を発現する CAG-Cre マウスと交配し、その影響を解析した。

4. 研究成果

(1) OLA1 と BARD1 による中心体制御能の解析

悪性腫瘍で OLA1 が高発現していることが既に報告されている(Sun et al. *Mol. Can. Res.* 2010)。そこで、OLA1 を過剰発現させると、発現抑制同様、中心小体の過剰複製が起き、中心体数が増加した細胞の割合が増加した。これらの OLA1 の発現量の異常による中心体数の増加は、乳腺由来細胞に特異的に観察された。

BRCA1 との結合能が消失し、中心体数の制御能が異常になることが明らかになっている OLA1 の E168Q 変異体では中心体数の増加した細胞の割合はわずかであった。よって、機能正常の OLA1 の過剰発現では中心体が増加し、機能が異常な変異体では中心体数の増加がわずかになると仮定した。OLA1 のリン酸化の候補残基、アセチル化残基、ATPase 活性に重要な ATP 結合残基の変異体の発現ベクターを作成し、これらの OLA1 変異体を過剰発現し、中心体数の増加について観察し、その中心体制御能を解析した。その結果、リン酸化の候補残基の変異体 S36A、T124A、T325A、アセチル化残基の変異体 K242R、ATP 結合残基の変異体 F127A で、中心体数の増加した細胞の割合が E168Q と同程度に低くなり、中心体制御能に異常があることが示唆された。OLA1 の 3'UTR を標的にした siRNA とともにこれらの変異体を導入し、内因性の BRCA1 を発現抑制して、これらの変異体の中心体制御能解析したところ、これらの変異体では中心体数の増加を来し、中心体数の制御能が異常であることが示唆された。

そこでこれらの変異体の BRCA1、BARD1、 γ -tubulin との直接結合能と相互作用を解析したところ、S36A、F127A、T325A 変異体では、BARD1 との直接結合能が消失し、BRCA1、BARD1、 γ -tubulin との相互作用が著しく低下していた(図 1)。一方、BRCA1、BARD1 との直接結合能には変化を認めなかった。よって、BARD1 と OLA1 の直接結合能が複合体形成に重要であることが示唆された。

BARD1 の中心体制御能の重要性が示されたため、BARD1 の発現抑制と過剰発現の中心体への影響を検討したところ、OLA1 同様に乳腺由来細胞で、中心体数が増加することが明らかになった。加えて、乳がん由来の BARD1 変異体、C645R、V695L、S761N の OLA1 との相互作用を解析したところ、これらの 3 つの変異体で相互作用が減弱し、V695L では OLA1 との直接結合能が消失し、中心体数の制御が異常になることが明らかになった(図 1)。

また、リン酸化候補残基の S36、T124、T325 の疑似リン酸化変異体では、過剰発現による中心体数の増加が野生型に近く認められ、中心体の数の制御能が回復していた。また、BARD1 との結合能に重要な残基である S36、T325 残基の疑似リン酸化変異体では、BARD1 との結合能も回復した。OLA1 の S36、T124、T325 残基のリン酸化が中心体制御に重要であることが明らかになった。

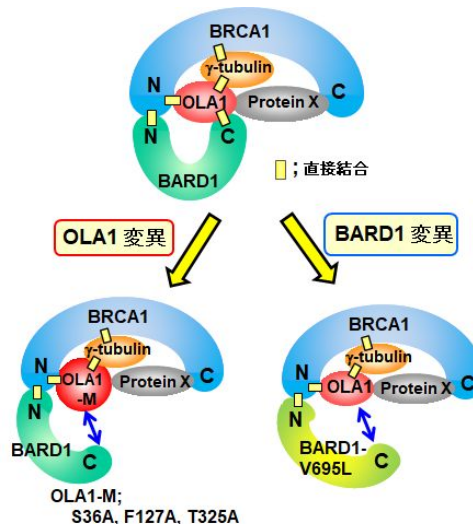


図1 OLA1とBARD1の変異による複合体形成への影響

(2) RACK1 の中心体制御能の解析

OLA1 結合分子として同定された RACK1 は、中心体、紡錘体極、ミッドボディに局在し、OLA1 に加えて BRCA1 の N 末端、BARD1 の C 末端、 γ -tubulin と直接結合することが明らかになった(図 2)。

家族性乳がん由来の BRCA1 変異体である R133H、E143K 変異体では RACK1 との結合能が減弱し、中心体局在が減少した(図 3)。さらに RACK1 の発現抑制により、BRCA1 の中心体局在がコントロールに比べて diffuse になり、異常

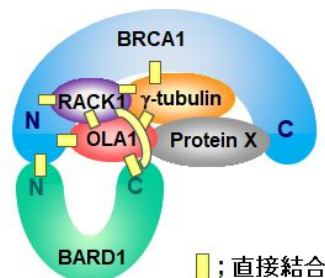


図2 BRCA1/BARD1/OLA1/RACK1/複合体

な局在パターンを示し、BRCA1 の中心体局在に RACK1 が重要であることが示唆された。さらに RACK1 の発現抑制は、中心体の複製のタイミングあるいはスピードを遅延させ、中心体の複製を抑制することも明らかになった。興味深いことに、中心体の複製は、乳腺由来細胞では、他の組織由来の細胞より中心体の複製のタイミングが早い、あるいはスピードが速くなっており、RACK1 の発現抑制による中心体複製の抑制は、乳腺由来細胞でのみ観察された。

RACK1 は多くのがんで、高発現が報告されているが、特に乳がんでは、高発現した細胞は高悪性度で予後不良であることが報告されている (Cao et al. *Breast Cancer Res Treat*, 2010)。そこで、RACK1 を過剰発現したところ、中心体の過剰複製による中心体数の増加が、乳腺由来細胞に特異的に見られた。よって、発現抑制の結果と合わせ、RACK1 が中心体複製に重要な働きをすることが明らかになった。

また、RACK1 の多数のがん由来の変異体について BRCA1、OLA1、BARD1、 γ -tubulin との結合能や、さらに OLA1 同様、過剰発現による中心体数の増加が引き起こされるかどうかを検討し、中心体制御能を解析したところ、RACK1 の K280E 変異体は、BRCA1 との結合能が減弱し、BRCA1 の中心体局在を減弱させ、さらに強制発現による中心体数の増加も減弱した (図 3)。以上より、RACK1 が BRCA1 の中心体局在を制御し、それによって、中心体複製を制御し、その機能破綻が発がんに関与することが示唆された。

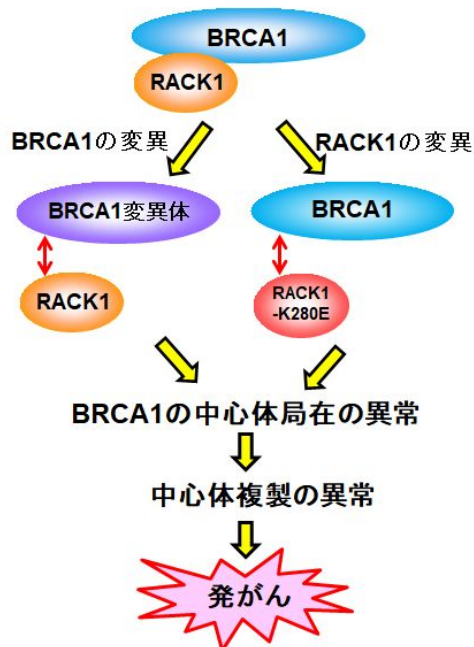


図3 RACK1の中心体制御

(3) OLA1 ノックアウトマウスの解析

Ola1 ホモノックアウトマウスは胎生致死で、胎生期も体長が小さく、発育異常が起きていた。*Ola1* ヘテロノックアウトマウスは、野生型と同様の外観であったが、脾臓腫瘍が観察された。

脾臓腫瘍は、病理組織学的解析の結果、濾胞構造や細胞の異型性から、悪性リンパ腫、異型細胞の増殖、髄外造血の亢進の3群に分類された。悪性リンパ腫ではB細胞型であった。HE染色でそれぞれの細胞の形態を観察したところ、細胞分裂像が多く、中心体異常の結果と考えられる異常な染色体分配が起きている分裂像が多く観察された。悪性リンパ腫組織、異型細胞の増殖を認める組織、正常脾臓組織で中心体の増加した細胞を計数したところ、悪性リンパ腫で明らかに中心体数が増加していることが明らかになった。また、腫瘍は雌マウスのみ形成された。女性ホルモンが中心体数の制御に影響を与えるのではないかと考え、女性ホルモン処理による影響を解析した。ヒト乳腺由来細胞で OLA1 を発現抑制すると中心体数が増加するが、この現象への女性ホルモンの影響を観察したところ、エストロゲン処理が OLA1 の中心体複製制御に影響を及ぼすことが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. [Yoshino Y](#), Qi H, Kanazawa R, Sugamata M, Suzuki K, Kobayashi A, Shindo K, Matsuzawa A, Shibata S, Endo S, Miyanishi Y, Shimaoka T, Ishioka C, Kanno S, Yasui A, and [Chiba N](#). RACK1 regulates centrosome duplication by controlling localization of BRCA1 to the centrosome in mammary tissue-derived cells. *Oncogene*, 査読有, doi: 10.1038/s41388-018-0647-8. *in press*
2. [Yoshino Y](#), Qi H, Fujita H, [Shirota M](#), Abe S, Komiyama Y, Shindo K, Nakayama M, Matsuzawa A, Kobayashi A, Ogoh H, [Watanabe T](#), Ishioka C and [Chiba N](#). BRCA1-interacting protein OLA1 requires interaction with BARD1 to regulate centrosome number. *Molecular Cancer Research*, 査読有, 16(10):1499-1511, 2018, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0269.1499
3. [Watanabe G](#), [Chiba N](#), Nomizu T, Furuta A, Sato K, Miyashita M, Tada H, Ohuchi N, Ishida T. Increased centrosome number in *BRCA*-related breast cancer specimens determined by immunofluorescence analysis. *Cancer Science*, 査読有, 109(6):2027-2035, 2018, doi: 10.1111/cas.13595
4. [Takahashi M](#)*, [Chiba N](#)*, Shimodaira H, [Yoshino Y](#), Mori T, Sumii M, Nomizu T, Ishioka C. (*co-first author) OLA1 gene sequencing in patients with *BRCA1/2* mutation-negative

suspected hereditary breast and ovarian cancer. *Breast Cancer*, 査読有, 24(2):336-340, 2017, doi: 10.1007/s12282-016-0709-0

[学会発表](計19件)

1. 小林輝大, 吉野優樹, 千葉奈津子. BRCA1 結合分子 BIP2 の過剰発現は PLK1 と Aurora A の活性化により中心体過剰複製を引き起こす. 第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年 9 月 27 日, 大阪)
2. 齋匯成, 吉野優樹, 千葉奈津子. BRCA1 結合分子である OLA1 は中心体の DNA 損傷応答を制御する. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年 9 月 28 日, 横浜)
3. 吉野優樹, 齋匯成, 藤田拓樹, 小林輝大, 千葉奈津子. 中心体制御における新規 BRCA1 結合因子 OLA1 と BARD1 の相互作用の重要性. 第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年 9 月 27 日, 大阪)
4. Yuki Yoshino, Huicheng Qi, Kei Otsuka, and Natsuko Chiba. Function of BRCA1-interacting proteins OLA1 and BIP in centrosome and carcinogenesis. BASSER CENTER FOR BRCA 6th Annual Scientific Symposium BRCA1, BRCA2 and Beyond: An Update on hereditary Cancer, May 22 2018, Philadelphia, USA
5. 吉田貴大, 吉野優樹, 小河穂波, 佐々木伯大, 中村保宏, 渡邊利雄, 千葉奈津子. BRCA1 の新規結合分子 Ola1 のノックアウトマウスの表現型の解析. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (2017 年 12 月 7 日, 神戸)
6. 吉野優樹, 小林輝大, 宮西優太郎, 齋匯成, 遠藤栞乃, 新藤一葉, 千葉奈津子. 新規 BRCA1 結合分子 BIP2 と BRCA1 のバランスが正常な中心体複製に重要である. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (2017 年 12 月 7 日, 神戸)
7. Huicheng Qi, Kazune Ohashi, Fang Zhenzhou, Yuki Yoshino, Natsuko Chiba. BRCA1-interacting protein OLA1 is involved in the centrosomal duplication and response to DNA damage. The 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University 第 33 回京都大学放射線生物研究センター国際シンポジウム (2017 年 12 月 5 日, 京都)
8. Yuki Yoshino, Huicheng Qi, Natsuko Chiba. Function of the novel BRCA1-interacting protein OLA1 in centrosomal regulation and carcinogenesis. 2nd Global Insight Conference on Breast Cancer Sep.4 2017 Rome, Italy
9. 吉野優樹, 小林輝大, 菅股眞美, 早坂美月, 齋匯成, 千葉奈津子. 新規中心体制御因子 RACK1 による BRCA1 中心体局在制御と発がん 第 69 回日本細胞生物学会大会 (2017 年 6 月 15 日, 仙台)
10. 齋匯成, 吉野優樹, 方震宙, 千葉奈津子. BRCA1 結合分子 OLA1 による中心体の DNA 損傷応答機構の解明. 第 69 回日本細胞生物学会大会 (2017 年 6 月 13 日, 仙台)
11. Huicheng Qi, Yuki Yoshino, Zhenzhou Fang, and Natsuko Chiba. Roles of OLA1 in DNA damage induced centrosome amplification. The 2017 Japan-NIH joint Symposium (2017 年 2 月 16 日, 仙台)
12. Chiba N. Recent advance and further challenge in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome. New frontiers of hereditary cancer towards the precision medicine. 遺伝性腫瘍の新しい展開・プレジジョン医療の実現へ向けて 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月 6 日, 横浜)
13. 齋匯成, 吉野優樹, 石岡千加史, 千葉奈津子. 新規中心体タンパク質 BIP2 は BRCA1 の中心体局在と発がん機構に関与する. 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月 8 日, 横浜)
14. 吉野優樹, 齋匯成, 石岡千加史, 安井明, 千葉奈津子. 中心体制御因子としての新規 BRCA1 結合因子 BIP2 の同定. 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月 8 日, 横浜)
15. 新藤一葉, 吉野優樹, 齋匯成, 菅股眞美, 早坂美月, 千葉奈津子. 新規中心体タンパク質 BIP2 は BRCA1 の中心体局在制御に関与する 第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 27 日, 仙台)
16. 吉野優樹, 齋匯成, 菅股眞美, 安井明, 千葉奈津子. BRCA1 依存性に中心体数を制御する新規中心体タンパク質 BIP2 の同定. 第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 27 日, 仙台)

[図書](計1件)

1. 藤田拓樹, 千葉奈津子 シリーズ:最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング シリーズ1 最新遺伝性腫瘍・家族性腫瘍研究と遺伝カウンセリング 第1章 総論 5.遺伝子腫瘍の分子遺伝学 遺伝子医学 MOOK 別冊 メディカル ドゥ, 47-51, 2016

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/cab/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 利雄

ローマ字氏名：WATANABE Toshio

所属研究機関名：奈良女子大学

部局名：大学院人間文化研究科

職名：教授

研究者番号：60201208

(2)研究分担者

研究分担者氏名：吉野 優樹

ローマ字氏名：YOSHINO, Yuki

所属研究機関名：東北大学

部局名：加齢医学研究所

職名：助教

研究者番号：60755700

(3)研究分担者

研究分担者氏名：城田 松之

ローマ字氏名：SHIROTA, Matsuyuki

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学（系）研究科（研究院）

職名：講師

研究者番号：00549462

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。