

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18020

研究課題名(和文) BRCA1/BARD1の中心体制御機構の破綻による発がん・悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of carcinogenesis by dysregulation of the centrosome by BRCA1/BARD1

研究代表者

大塚 慧 (Otsuka, Kei)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20772437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000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であるBRCA1はBARD1とヘテロダイマーを形成し、DNA損傷修復や中心体制御に関与する。我々は、BARD1アイソフォームの過剰発現によって引き起こされる中心体の異常を解析した。その結果、BARD1の過剰発現により中心小体の過剰伸長が引き起こされることが明らかとなった。またBARD1は中心小体の伸長因子CPAPの安定化に、BRCA1/BARD1はCPAPの分解に関与することが明らかとなった。本研究により新たなBRCA1のゲノム安定化機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん抑制遺伝子BRCA1は、BARD1とヘテロダイマーを形成し、中心体制御を介してゲノムの安定化に寄与する。BARD1には、BRCA1と結合できない構造のBARD1アイソフォームが多数存在し、その高発現とがんの悪性度との関係が報告されていたが作用機構は不明であった。本研究によりBARD1アイソフォームは中心小体の伸長を介してゲノムの不安定を引き起こすことが明らかとなった。本研究の成果はがん診断における分子マーカーの開発や、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 analyzed the effect of BARD1 isoform on centrosome or centriole in breast cancer. Overexpression of BARD1 induced centriole over-elongation. BRCA1/BARD1 decreased the expression of CPAP. On the other hand, BARD1 interacted with CPAP and increased the expression of CPAP. These results elucidated that the novel regulatory mechanism by BRCA1 to maintain genome stability.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん BRCA1 BARD1 中心体

様式 C-19、F-19-1、Z-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かか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 損傷修復、中心体制御、クロマチンリモデリングなど様々な機能に参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核内での DNA 二本鎖切断修復経路における DNA 損傷修復能が着目されてきたが、*BRCA1* は中心体に局在し、中心体数の制御や中心体依存性の微小管伸長にも関与する。中心体は微小管形成中心として機能し、娘細胞への均等な染色体分配を担う細胞小器官でありゲノム安定性に重要な機能を担っている。近年、DNA 損傷修復能は正常であるが、中心体数の制御能に異常である *BRCA1* のがん変異が報告されており、乳がんにおける *BRCA1* のがん抑制能として中心体制御能は注目されている。

我々はこれまでに、*BRCA1* は *BARD1* や *OLA1* と複合体を形成し、中心体数を制御していることを明らかにしてきた。*BARD1* との結合能が消失した *BRCA1* のがん変異が報告されていることから、*BRCA1* と *BARD1* の結合はがん抑制能に重要である。*BARD1* には多数のアイソフォームが存在し、*BARD1* アイソフォームの多くは N 末端の欠損している。*BARD1* アイソフォームの発現はがんで高発現であり、がんの悪性度との関連が報告されているが、その作用機構は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

従来、*BRCA1* のがん抑制能にはその DNA 損傷修復能が重要と考えられてきたが、家族性乳がん由来の *BRCA1* 変異体の DNA 損傷修復能と中心体制御能を解析したところ、DNA 損傷修復能に異常はないが、中心体制御能が異常な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。*BARD1* アイソフォームは乳がんや婦人科がんで高発現であることが報告されており、その発現量とがんの悪性度との関連が報告されているが、その詳細な作用機構は明らかとなっていない。*BARD1* アイソフォームの多くは N 末端の RING ドメインを欠損しており、正常な *BRCA1/BARD1* 複合体と競合的に機能すると考えられている。*BRCA1* と *BARD1* の N 末における結合も中心体制御能に重要であること、*BARD1* の発現量が中心体数に影響を与えることが報告された。そこで本研究では *BARD1* アイソフォームの過剰発現が中心体へ与える影響を解析し、がん診断や治療方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) *BARD1* アイソフォームの過剰発現による中心体数への影響の解析

BARD1 β 、*BARD1* δ 、*BARD1* ω の発現ベクターを作製した。いくつかの乳がん細胞、非乳がん細胞で *BARD1* アイソフォームの発現ベクターを導入し、中心体マーカおよび中心小体マーカ一の免疫染色により、中心体数の異常および中心小体の構造の異常を解析した。

(2) *BARD1* β と中心小体タンパク質の相互作用解析

BARD1 アイソフォームの過剰発現と中心小体の異常の関係を明らかにするため、エピトープタグ融合 *BARD1* アイソフォーム発現ベクター、*BARD1* フラグメント発現ベクターおよび中心小体伸長因子 CPAP の発現ベクターを作製した。発現ベクターを HEK-293T 細胞へ導入し、共免疫沈降法により相互作用を解析した。

(3) 全長 *BARD1* および *BARD1* β の発現量変化が中心小体伸長因子の発現量へ与える影響の解析

乳がん細胞における全長 *BARD1* および *BARD1* β の発現量変化が CPAP の発現量へ与える影響を解析するため、全長 *BARD1* および *BARD1* β の過剰発現ベクターあるいは siRNA を乳がん細胞へ導入し、ウェスタンブロットにより CPAP を検出した。

4. 研究成果

(1) *BARD1* アイソフォームの過剰発現による中心体数への影響の解析

BARD1 は RING ドメイン、ANK リピートおよび BRCT

ドメインを持つ。そこで RING ドメインを欠き N 末端に特異的な 24 アミノ酸を持つ *BARD1* β 、RING ドメインおよび ANK リピートを欠く *BARD1* δ および RING ドメインを欠く *BARD1* ω を選択した (図 1)。これらを乳がん細胞で過剰発現させると、どの *BARD1* アイソフォームの過剰発現においても中心体数の異常が生じた。加えて、*BARD1* β の過剰発現においては中心小体の過剰な伸長も観察された。

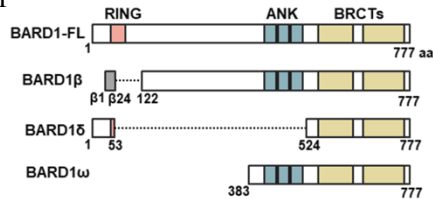


図1 *BARD1* アイソフォームの構造

(2) BARD1 β と中心小体タンパク質の相互作用

BARD1 β の過剰発現により中心小体の過剰伸長が生じたことから BARD1 β と CPAP の相互作用解析を行った。その結果、BARD1 β と CPAP は相互作用することが明らかとなった。さらに BARD1 β のフラグメントと CPAP の相互作用解析を行ったところ、BARD1 β は N 末領域で CPAP と相互作用すること、BARD1 β と CPAP との相互作用には BARD1 β の特異的な 24 アミノ酸が重要であることが明らかとなった。BARD1 β における CPAP との相互作用領域である N 末領域のみの過剰発現で中心小体の過剰な伸長が引き起こされるか否かについて解析を行ったところ、中心小体の過剰伸長が観察された。一方で、BARD1 β の特異的な 24 アミノ酸のない BARD1 の N 末フラグメントでは中心小体の過剰伸長は観察されなかったことから BARD1 β による中心小体の過剰伸長には 24 アミノ酸が重要であることが示唆された。

(3) 全長 BARD1 による CPAP の発現制御

BARD1 アイソフォームは全長 BARD1 と競合した機能を持つ可能性があることから、全長 BARD1 も CPAP の発現制御に関与する可能性が考えられた。そこで全長 BARD1 の過剰発現および発現抑制による CPAP の発現量への影響を解析した。その結果、全長 BARD1 の過剰発現により CPAP の発現量は減少し、全長 BARD1 の発現抑制により CPAP の発現量は増加した。BRCA1 と BARD1 はヘテロダイマーの形成しユビキチンリガーゼ活性を示すことから、BRCA1 も CPAP の発現制御に関与するか否かを解析した。その結果、全長 BARD1 と同様に、BRCA1 の過剰発現により CPAP の発現量は減少し、発現抑制により CPAP の発現量は増加した。CPAP が BRCA1/BARD1 のユビキチンリガーゼ活性により分解される可能性が考えられたことからユビキチン化アッセイにより、BRCA1/BARD1 の発現が CPAP のユビキチン化に影響を与えるかについて解析した。その結果、BRCA1/BARD1 の過剰発現によりユビキチン化 CPAP の量は増加した。以上の結果から BRCA1/BARD1 はユビキチン化により CPAP の分解に関与する中心小体の制御に関与するが、BARD1 β は相互作用により CPAP を安定化し CPAP の発現量を増加させることで中心小体の過剰伸長を引き起こす可能性が示唆された。

5. 主な論文発表等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. [Otsuka K](#), Yoshino Y, Qi H, Chiba N. The Function of BARD1 in Centrosome Regulation in Cooperation with BRCA1/OLA1/RACK1. *Genes (Basel)*, 査読あり, 2020, 11(8):842. doi: 10.3390/genes11080842.

[雑誌論文] (計 1 件)

大塚慧、内山千尋、吉野優樹、齋匯成、千葉奈津子. BARD1 アイソフォームの発現は中心体の異常な伸長を引き起こす. 第 42 回分子生物学会学術総会 (2019 年)

[図書]

(計 0 件)

[産業特許権]

○出願状況 (計 0 件)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsuka Kei, Yoshino Yuki, Qi Huicheng, Chiba Natsuko	4. 巻 11
2. 論文標題 The Function of BARD1 in Centrosome Regulation in Cooperation with BRCA1/OLA1/RACK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 842 ~ 842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes11080842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚慧、内山千尋、吉野優樹、齋藤成、千葉奈津子
2. 発表標題 BARD1アイソフォームの発現は中心体の異常な伸長を引き起こす
3. 学会等名 第42回分子生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------