

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790311

研究課題名（和文） 乳癌原因遺伝子 BRCA に結合する新規分子の探索とゲノム変異導入による細胞機能解明

研究課題名（英文） Screening and analyses of novel BRCA1/2-associated proteins

研究代表者

竹中 克也（TAKENAKA KATSUYA）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20378706

研究成果の概要（和文）：乳癌原因遺伝子 BRCA2 は二重鎖切断 DNA の相同組換え修復に関与するとともに、中心体にも局在する。BRCA2 をノックダウンすると中心体複製が異常になることから、中心体複製制御にも役割を果たしている可能性が示唆されていた。我々は培養細胞の中心体画分から BRCA2 を免疫沈降し、その共免疫沈降物を質量分析した。その結果 BRCA2 に新規に結合する分子として、nucleophosmin（NPM）と Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2（ROCK2）を得ることができた。この両分子はこれまでに正確な中心体複製に役割を果たすことが知られていることから、BRCA2 とこれら両分子との結合が中心体複製に重要な働きを担っている可能性が考えられた。我々は BRCA2 が NPM と結合する分子内領域を BRCA2 の部分配列と NPM を培養細胞に共発現することによって検定した。これにより BRCA2 の 3,418 アミノ酸のうち、639-1,000 アミノ酸領域が NPM との結合領域であることを解明した。この小領域を培養細胞に強発現すると、内在性の BRCA2 と NPM の結合を阻害することができ、この時中心体数が異常に増加したり多核になったりする細胞が多く見られた。このことから、BRCA2 と NPM の結合は中心体の正確な複製と中心体数の制御に重要な役割を果たしていると考えられた。中心体数の異常による染色体の異常分配や多核の形成は癌化過程に特徴的に見られることから、乳癌発癌に BRCA2 と NPM の結合不能が関与している可能性がある。今後 BRCA2 とこれら分子との結合が癌治療の標的になり得る可能性について検討していきたい。

研究成果の概要（英文）：BRCA2 germline mutations account for the majority of heredity breast and ovarian cancer. Besides its role in DNA damage repair, it was hypothesized that BRCA2 might have a role in centrosomal amplification, since BRCA2 localizes to centrosomes as well as nuclei and the dysfunction of BRCA2 in a centrosome causes abnormalities in cell division. We identified nucleophosmin (NPM) and Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2) as novel BRCA2-associated proteins by mass spectrometry. Because it is known that ROCK2 binds to NPM at centrosomes, these 3 proteins may form a complex. NPM-binding region in BRCA2 was determined to be within amino acids 639-1,000. Exogenous expression of this BRCA2 region resulted in aberrant centrosome amplification and a high frequency of multinucleated cells. Our results suggested that a complex consisting of BRCA2, NPM, and ROCK2 maintains the numerical integrity of centrosomes and accurate cell division and that dysfunction of this regulation might be involved in the tumorigenesis of breast cancer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌原因遺伝子 BRCA1/2 は、DNA 損傷修復機能と中心体複製制御を通じてゲノム構造の安定化維持に機能し、その遺伝学的解析から乳癌発癌に大きな役割を果たしていることは明らかである。しかし、その発癌分子機構を理解するには当分子のみに留まらず相互作用する分子を含めた関連分子の系統的な機能ネットワークの解明が必要になる。そのため BRCA1/2 に新規に結合する遺伝子産物を探索・選出し、その細胞内機能を明確にすることは非常に有効なアプローチと考えられる。

我々は既に BRCA2 についてツーハイブリッド法を用いた結合分子の探索を行なった。成果の一つとして BJ-HCC-20A を新規に BRCA2 と細胞内で相互作用する分子として特定した。BJHCC-20A は癌 精巣抗原の一つで、二重鎖切断によるアポトーシス誘導時に強発現すると細胞死を抑制したことから、BRCA2 と協調して DNA 損傷修復時の情報伝達に関与しており乳癌治療の標的になり得ると考えられた。

このように一定の成果を得た一方、この探索法には以下の非効率な点が見られた。

- (1) BRCA2 は巨大分子 (3,418 アミノ酸) であるため部分的にしか bait にできない
- (2) 酵母内で結合が見られてもヒト培養細胞内では結合の見られないものが非常に多い
- (3) BRCA2 との相互作用が機能的なものであるかどうかの判別が定量化できておらず判断が困難

上記の点について本研究課題では手法の改善を行なうとともに、新規結合分子の探索とその機能解析を試みるのが必然であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、BRCA1/2 について新規に結合する遺伝子産物を探索・選出し、それら候補分子の癌化への関与を判断し、機能的に信頼度の高い結合分子を選定した。さらにその遺伝子の部分配列を過剰発現するなどして、候補分子の細胞内機能を明確にすることを目的とした。これにより、

- (1) BRCA が関与する癌化過程に機能する新規分子群の同定とそれら分子間相互作用の解明
- (2) 乳癌の診断・治療法開発における新規標的分子の発見

が可能になると期待された。

本研究は、BRCA1/2 およびそれらの関連遺伝子が構成する機能ネットワークが乳癌発癌過程に果たす役割を明らかにすることから学術的重要性が高い。得られる新規結合分子の細胞内機能に関する知見は理学的基礎医学的興味に留まらず、より臨床的な診断・治療開発に強く波及し得る。

### 3. 研究の方法

本研究では、乳癌原因遺伝子 BRCA1/2 の新規機能的相互作用分子を同定しその細胞内機能を明らかにするために、以下の方法を行なった。

- (1) BRCA1/2 が機能すると考えられる細胞内画分 (核・中心体・中間径フィラメント) からの共免疫沈降物の質量分析  
ヒト培養細胞から BRCA1/2 を免疫沈降し共免疫沈降物を得、質量分析によって結合分子候補を得た。細胞分画を行ない、BRCA1/2 が機能し得る核や中心体分画からの共免疫沈降物に注目して解析した。

## (2) 相互作用分子候補と BRCA1/2 との細胞内結合の立証

これまでに得られた相互作用分子候補について、BRCA1/2 と真に細胞内で結合しているかどうかを検討した。手法としては初めに、相互作用分子と BRCA1/2 を共にヒト培養細胞にタグ付きリコンビナントタンパク質として共発現してそれぞれのタグで共免疫沈降を行ないイムノプロットで検出した。さらにそれぞれの遺伝子産物に対する特異抗体を用い、内在性遺伝子産物を共免疫沈降後イムノプロットする手法によって最終的に確実に細胞内で結合していることの証明とした。

## (3) BRCA1/2 との相互作用に重要な分子内領域の特定

上記により BRCA1/2 と真に結合している分子について、その分子内結合領域を決定した。BRCA2 と結合分子それぞれの部分配列を培養細胞に共発現して共免疫沈降を行ない、イムノプロットによってどの領域が結合に参与する領域であるかを決定した。

## (4) 結合が表現形に与える影響の検証

上記で決定された結合部位部分配列の強発現によって内在性 BRCA2 と当該新規結合分子の結合が阻害されるかどうかを検討した。結合の阻害に成功した部分配列をヒト培養細胞に強発現し、表現形を解析した。これにより BRCA2 との分子間結合が表現形に及ぼす影響を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) BRCA2 が機能する中心体画分からの共免疫沈降物の質量分析

ヒト培養細胞 HeLa S3 の中心体画分をシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、その粗抽出液から抗ヒト BRCA2 モノクローナル抗体で免疫沈降を行なった。共免疫沈降物を LC/MS/MS による質量分析によって解析した。数十種類の共免疫タンパク質が同定された。その中に既に中心体複製に参与することが明らかにされている、nucleophosmin/B23 (NPM) と Rho-associated coiled-coil containing protein kinase  $\alpha$  (ROCK2) が含まれていた。そのため以降の解析をこの両分子に対して行なった。

### (2) NPM および ROCK2 と BRCA2 との細胞内結合の立証

COS-7 細胞に FLAG-BRCA2 と HA-NPM を共発現し、抗 FLAG 抗体免疫沈降物を抗 HA 抗体で、または抗 HA 抗体免疫沈降物を抗 FLAG 抗体でイムノプロットした。相互に共免疫沈降されることが明らかになったため、細胞内で

BRCA2 と NPM が相互作用していると示唆された。次にそれぞれの特異抗体を用いて内在性タンパク質の共免疫沈降実験を行なった。抗 BRCA2 抗体免疫沈降物は内在性 NPM と ROCK2 を含んでいた。また抗 NPM 抗体と抗 ROCK2 抗体による免疫沈降物は内在性 BRCA2 を含んでいた。以上の結果から、細胞内で BRCA2 と NPM および ROCK2 が結合していることが明らかとなった。

(3) NPM と結合する BRCA2 分子内領域の特定分子間結合作用についてより詳細に検討するため、NPM と BRCA2 のどの分子内領域が結合し得るのかを検討した。BRCA2 を数か所の領域に分割し、培養細胞に NPM と共発現し、共免疫沈降によって相互作用の有無を調べた。その結果 BRCA2 の 3,418 アミノ酸のうち、639-1,000 アミノ酸領域が NPM との結合領域であることを明らかにできた(図1)。

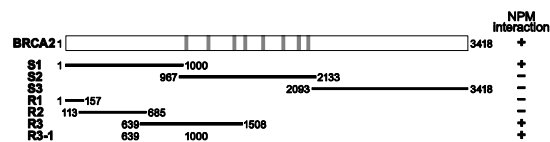


図1 NPM との結合を検討した BRCA2 分子内領域一覧

### (4) BRCA2 と NPM の結合が中心体複製に与える影響の検証

上記によって明らかになった、NPM と結合する BRCA2 分子内領域を培養細胞に強発現し、内在性の BRCA2 と NPM との結合を共免疫沈降によって検討した。その結果、BRCA2 639-1,000 の強発現は、内在性 BRCA2 と NPM の相互作用を阻害することが明らかとなった。BRCA2 と NPM の結合阻害が細胞の表現形に与える影響を調べるため蛍光免疫染色を行なった。すると強発現した細胞では中心体数が断片化や過剰複製によって異常に増加したり、多核になったりする細胞が多く見られた。このことから BRCA2 と NPM の結合は中心体の正確な複製と中心体数の制御に重要な役割を果たしていると考えられた(図2)。

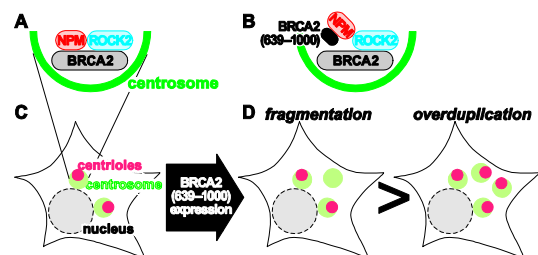


図2 BRCA2 と NPM の結合が中心体数制御に参与していることが本研究によって示された

中心体数の異常による染色体の異常分配やそれに伴う多核の形成は癌化過程に特徴的に見られることから 乳癌発癌にBRCA2とNPMの結合不能が関与している可能性が示唆された。今後BRCA2とこれら分子との結合が腫瘍マーカーや癌治療の標的になり得る可能性について検討していきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計5件)

Hui-Feng Wang, Katsuya Takenaka, Akira Nakanishi, and Yoshio Miki. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with ROCK2. *Cancer Research* 71, 68-77. (2010) 査読有 Tomoo Ogi, Siripan Limsirichaikul<sup>+</sup>, René M. Overmeer<sup>+</sup>, Marcel Volker<sup>+</sup>, Katsuya Takenaka<sup>+</sup>, Ross Cloney<sup>+</sup>, Yuka Nakazawa<sup>+</sup>, Atsuko Niimi, Yoshio Miki, Nicolaas G. Jaspers, Leon H. F. Mullenders, Shunichi Yamashita, Maria I. Fousteri, and Alan R. Lehmann. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Molecular Cell* 37, 714-727. (2010) 査読有 Xin Wang, Katsuya Takenaka, and Shunichi Takeda. *PTIP* promotes DNA double-strand break repair through homologous recombination. *Genes to Cells* 15, 243-254. (2010) 査読有 Katsuya Takenaka and Yoshio Miki. Introduction and characterization of a polymerase-dead point mutation into the *POLK* gene in vertebrates. *FEBS Letters* 583, 661-664. (2009) 査読有 Makoto Nakahara, Eiichiro Sonoda, Kuniharu Nojima, Julian E. Sale, Katsuya Takenaka, Koji Kikuchi, Yoshihito Taniguchi, Kyoko Nakamura, Yoshiki Sumitomo, Ronan T. Bree, Noel F. Lowndes, and Shunichi Takeda. Genetic evidence for single-strand lesions initiating Nbs1-dependent homologous recombination in diversification of Ig V in chicken B lymphocytes. *PLoS Genetics* 5: e1000356. (2009) 査読有

##### [学会発表](計7件)

Katsuya Takenaka, Hui-Feng Wang, Akira Nakanishi, and Yoshio Miki. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with ROCK2. BMB2010. 7-10 December 2010 (Kobe).

Hui-Feng Wang, Katsuya Takenaka, Akira Nakanishi, and Yoshio Miki. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with ROCK2. The Sixth International Symposium on Hormonal Oncogenesis. 12-16 September 2010 (Urayasu).

Katsuya Takenaka and Yoshio Miki. Introduction and characterization of a polymerase-dead point mutation into the *POLK* gene in vertebrates.

International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010. 17-20 February 2010 (Nagasaki).

Tomoo Ogi, Siripan Limsirichaikul, René M. Overmeer, Marcel Volker, Katsuya Takenaka, Ross Cloney, Yuka Nakazawa, Atsuko Niimi, Yoshio Miki, Nicolaas G. Jaspers, Leon H. F. Mullenders, Shunichi Yamashita, Maria I. Fousteri, and Alan R. Lehmann.

Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells.

International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010. 17-20 February 2010 (Nagasaki).

Katsuya Takenaka and Yoshio Miki. Introduction and characterization of a polymerase-dead point mutation into the *POLK* gene in vertebrates. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月9日 - 12日(横浜).

Tomoo Ogi, Limsirichaikul Siripan, Marcel Volker, Rene Overmeer, Katsuya Takenaka, Ross Cloney, Yuka Nakazawa, Atsuko Niimi, Yoshio Miki, Nicolaas Jaspers, Leon Mullenders, Maria Fousteri, Shunichi Yamashita, and Alan Lehmann. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 - 12日(横浜). 竹中克也, 三木義男. ゲノム上点変異導入によるPoI 活性中心変異株の作製と解析. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月21日 - 24日(神戸).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹中 克也 ( TAKENAKA KATSUYA )

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20378706