

機関番号：32713

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590318

研究課題名 (和文) 蛋白質相互作用解析による癌抑制遺伝子 BRCA1 の細胞周期制御分子機構の研究

研究課題名 (英文) A study on the molecular mechanisms of BRCA1-mediated cell cycle regulation from a comprehensive protein interaction analysis approach

研究代表者

呉 文文 (WU WENWEN)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10434408

研究成果の概要 (和文)：細胞周期を通して、BRCA1 の蛋白複合体を網羅的に解析した。HERC2 が S 期特異的に BRCA1 と結合し、分裂期では BRCA1 から迅速解離する現象を見出した。HERC2 は BRCA1 のユビキチンリガーゼで、BARD1 から離脱した BRCA1 を不安定させると同時に、pre-RC 複合体の MCM 蛋白質の活性化を誘発し、異常複製開始点を発火させる。HERC2 は Claspin とともに複製フォークの進行や安定を制御し、最終的に G2/M チェックポイント応答に機能する。HERC2 は BRCA1 が司っている細胞周期の G2/M チェックポイント制御機構には重要な役割を担い、BRCA1 の細胞周期調節機構には必須因子であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：BRCA1 complex was comprehensively analyzed through the cell cycle. HERC2 specifically interacts with BRCA1. The interaction is maximal during the S phase of the cell cycle, and rapidly diminishes as cells enter mitosis. HERC2 is an E3 ligase to target the BARD1-uncoupled BRCA1 for degradation, to regulate BRCA1 stability. Concomitantly, HERC2 contributes to pre-replicative complex (pre-RC) formation and activation by the inducible phosphorylation of MCM protein and results in regulation of origin firing and replication. HERC2 plays a role in replication fork progression and stabilization with Claspin, to be involved in the G2/M checkpoint. The study elucidated HERC2 plays critical roles in BRCA1-mediated G2/M checkpoint.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：BRCA1 HERC2 細胞周期 乳癌 ユビキチン化 DNA 障害 複製フォーク

1. 研究開始当初の背景：BRCA1 癌抑制遺伝子で、ゲノムの安定性を制御し、癌抑制経

路におけるハブ蛋白質と位置づけられている。BRCA1 は BARD1 と RING ヘテロダイマーを

形成し、ユビキチンリガーゼ活性を有する。その癌抑制のメカニズムはまだ解明されていない。BRCA1の癌抑制機構を解明するため、基質同定が盛んに行われてきたが、いずれにしても癌抑制機構解明には直接結びつくことができない。他方、BRCA1は細胞周期のG1期からS期への移行時に発現のピークが認められるほか、DNA損傷時の細胞周期のチェックポイント機構としても認識され、細胞周期の制御には不可欠とされている。しかし、その細胞周期制御の分子機構は依然分かっていない。BRCA1の癌抑制機構の解明には、細胞周期制御においてBRCA1自身が果たしている役割を明らかにすることが必要である。細胞周期ことでBRCA1の結合蛋白を網羅的に解析するのが有効な手段であると考えた。

2. 研究の目的：本研究の目的としては、BRCA1の細胞周期制御の分子機構を明らかにし、BRCA1の癌抑制機構を含めた新規な生命現象に更なる認識を目指す。具体的には、細胞周期特異的にBRCA1と結合する蛋白質を明らかにし、その蛋白質がBRCA1のユビキチンリガーゼ活性やユビキチン化修飾などの相関関係を明らかにすることで、BRCA1の癌抑制メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

細胞周期特異的なBRCA1結合タンパク質の同定について

- (1) 培養細胞 (HeLa、T47D) を Double Thymidine 法または Thymidine-Nocodazole 法にて同調し、各細胞周期の細胞を回収、抗 BRCA1 抗体を用いて、免疫沈降を行った。免疫沈降複合体を質量分析にて解析した。
- (2) 質量分析の結果を更に免疫沈降、ウェスタンブロットで再検証した。
- (3) 蛍光免疫染色法を用いて、細胞周期ことで BRCA1 との共局在を検証した。

HERC2 蛋白が S 期特異的に BRCA1 と結合し、分裂期では BRCA1 から迅速解離することを同定した。

機能解析について

- ①結合ドメイン解析： HERC2 のフラグメントを作成し、BRCA1 との結合サイトを検証した。
- ②ユビキチン修飾の検証： HERC2 はユビキチンリガーゼの構造特性を有することから、そのユビキチンリガーゼ活性を *in vitro* と *in vivo* ユビキチンアッセイで検証した。 *in vitro* と *in vivo* ユビキチンアッセイを用い

て、BRCA1 が HERC2 によってユビキチン化されるかどうかを検証し、HERC2 が BRCA1 のユビキチンリガーゼ活性に及ぼす影響も検証した。

③細胞周期に及ぼす影響の検証： siRNA を用いて、HERC2 をノックダウンし、細胞同調してから、細胞周期進行をフローサイトメトリー (FACS) で検証した。HERC2 をノックダウンしてから、細胞周期における BRCA1 の発現状況

ウェスタンブロットで検証した。また、BRCA1 が制御するチェックポイント機構を検証するため、放射線照射による G2/M チェックポイント誘導、細胞周期停止を HistoneH3 (ser10) 抗体を用いて PI と 2 重染色し、FACS で検証した。更に S 期に及ぼす影響を検証するため、BrdU/IdU Dual-Color DNA ラベリング/DNA ファイバー伸展技術を用いて、S 期複製フォークの進行および安定を検証した。

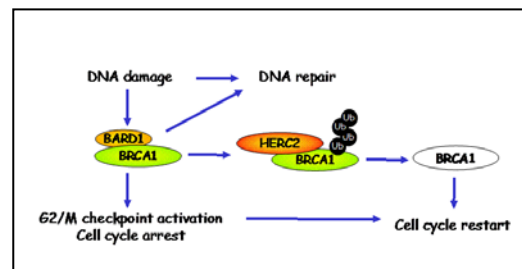
4. 研究成果

HERC2 蛋白が S 期特異的に BRCA1 と結合し、分裂期では BRCA1 から迅速解離することを同定した。

HERC2 は HECT と RLD ドメインを持ち、ユビキチンリガーゼの構造特性を有する。この構造特性から、HERC2 はユビキチンリガーゼ E3 活性を有し、その活性はユビキチン結合部位である 4762 番目のアミノ酸システインに依存すること、また、HERC2 は核と細胞質間のシャトルタンパク質であることを明らかにした。

HERC2 の HECT ドメインは BRCA1 の分解領域とダイレクトで結合する。HERC2 は BARD1 とヘテロダイマーを形成していない BRCA1 をユビキチン化する。BARD1 の過剰発現は HERC2 による BRCA1 のユビキチン化を弱める。HERC2 は BRCA1/BARD1 ヘテロダイマーのユビキチンリガーゼ活性を直接影響しない。

BRCA1 は S 期 foci 形成する。HERC2 は S 期特異的に BRCA1 と共局在する。HERC2 は BARD1 から離脱した BRCA1 と結合して、それをユビ



図一 1

キチン化させ、分解する。HERC2はBARD1から離脱したBRCA1を不安定させることによって、G2/Mチェックポイント機構を機能停止状態にする役割を果たしている。

HERC2はBRCA1が司っている細胞周期のG2/Mチェックポイント制御機構には重要な役割を担い、BRCA1の細胞周期調節機構には必須因子である(図-1)。

HERC2はBRCA1の結合蛋白でもあるClaspinと複合体を形成する。BRCA1の機能不全がClaspinの蛋白質分解を誘導し、G2/Mチェックポイント応答不能を引き起こすことに対して、HERC2蛋白を除却することによって、Claspinが安定され、G2/Mチェックポイント応答が回復する。

HERC2はPCNA、TopBp1およびMCM7など複数の複製因子とも共局在し、複製フォークに局在する。

Claspinの機能不全時、複製フォークが不安定となり、複製も停止状態に陥る。siRNA技術を用いた解析結果では、HERC2蛋白はClaspinの複製フォーク進行障害誘発や複製フォークの不安定化誘導に働き、pre-RC複合体のMCM蛋白質の活性化を制御することによって、異常複製開始点の発火制御に機能していることを明らかにした(図-2)。HERC2はClaspinとともに複製フォークの進行や安定を制御する。

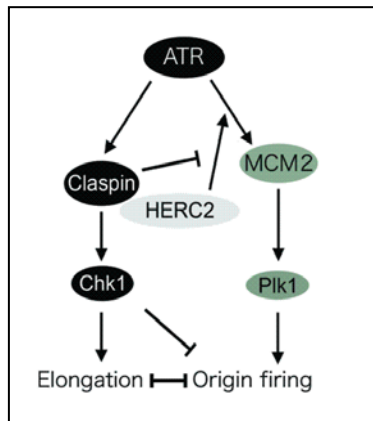


図-2

本研究ではHERC2がBRCA1の細胞周期調節機構に必須因子であることを明らかにした。

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8件)

1. Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman AR, Ohta T.

phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage

through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. *Cancer Res.* 70:6746-56.

2010(査読あり)

2. Wu W, Sato K, Koike A, Nishikawa H, Koizumi H, Venkitaraman AR, Ohta T.

is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation. *Cancer Res.* 70:6384-92.

2010(査読あり)

3. Asakawa H, Koizumi H, Koike A, Takahashi M, Wu W, Hiroataka Iwase, Fukuda M and Ohta T.

Prediction of breast cancer sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on status of DNA damage repair proteins. *Breast Cancer Research.* 12:R17.

2010(査読あり)

4. Ohta T, Wu W, Koike A, Asakawa H, Koizumi H, Fukuda M.

chemosensitivity of basal-like breast cancer based on BRCA1 dysfunction. *Breast Cancer.* 16:268-74. 2009(査読あり)

5. Takeshita T, Wu W, Koike A, Fukuda M, Ohta T.

pathways by proteasome inhibitors corresponds to enhanced chemosensitivity of cells to DNA damage-inducing agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64:1039-46. 2009(査読あり)

2009(査読あり)

6. Nishikawa H, Wu W, Koike A, Kojima R, Gomi H, Fukuda M and Ohta T.

BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Res.* 69:111-119. 2009(査読あり)

7. Wu W, Koike A, Takeshita T, and Ohta T.

The ubiquitin E3 ligase activity of

BRCA1 and its biological functions.

Cell Div. 3:1, 2008(査読あり)

8. Oshima R, Nakano H, Katayama M, Sakurai J, Wu W, Koizumi S, Asano T, Watanabe T, Asakura T, Ohta T, Otsubo T. Modification of the Hepatic Mitochondrial Proteome in Response to Ischemic Preconditioning following Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Liver. Eur Surg Res. 40:247-255, 2008(査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Wenwen Wu The E3 ligase activity of HERC2 regulates BRCA1-mediated G2/M checkpoint function independent of BARD1
5th Cold Spring Harbor Meeting On The ubiquitin Family April 22 2009 Cold Spring Harbor, NY

(2) 呉 文文 BRCA1 を分解するユビキチンリガーゼの同定 2008 年 9 月 27 日 第 16 回乳癌学会学術総会 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉 文文 (WU WENWEN)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 10434408

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

