

機関番号：32713

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791262

研究課題名 (和文) 遺伝子改変マウスを用いた BACH1 の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of BACH1 in transgenic mice

研究代表者

速水 亮介 (HAYAMI RYOSUKE)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：00529894

研究成果の概要 (和文)：

DNA 損傷時の BACH1 の機能と BACH1-BRCA1 結合の機能を明らかにする事と BACH1 欠損型と BACH1-BRCA1 結合不能な BACH1^{S990A/S990A} 変異型の表現型を明らかにするため、BACH1^{-/-}と BACH1^{S990A/S990A} のマウス ES 細胞を作製し、DNA 損傷応答の解析を行い、BACH1 ノックアウトマウス、BACH1 S990A ノックインマウスを作製し、表現型を解析した。

DNA 損傷により BACH1^{-/-}, BACH1^{S990A/S990A}, BACH1 WT の順に DNA 修復機構の破綻を認めた。BACH1 ノックアウトマウス、BACH1^{S990A/S990A} ノックインマウスの表現型は腫瘍形成を認めた。さらに DNA 損傷による BACH1 ノックアウトマウスの表現型の生存率は低下を認めた。

以上より、BACH1 だけでなく BRCA1 と BACH1 の相互作用も DNA 修復・チェックポイント機構に重大な役割を果たしている事が生物学的に証明できた。

研究成果の概要 (英文)：

In order to analyze BACH1 role in DNA damage repair through its interaction with BRCA1, we generated BACH1 null and BACH1^{S990A/S990A} ES cell. **In addition**, we generated BACH1 knock-out mice and BACH1^{S990A/S990A} knock-in mice in order to analyze the phenotype of these.

BACH1 null cells showed the fearfully DNA repair defect following DNA damage. BACH1 WT cells certainly showed the few DNA repair defect following DNA damage. And furthermore, BACH1^{S990A/S990A} cells showed more defective than BACH1 WT cells, but they showed less defective than BACH1 null cells in DNA repair following DNA damage.

AS for the phenotype, BACH1 knock-out mice and BACH1^{S990A/S990A} knock-in mice developed different types of tumors. Furthermore, BACH1 knock-out mice are hypersensitive to DNA damage.

Therefore, the role of BACH1, as well as the interaction of BACH1 and BRCA1 proved biologically to be very important for DNA repair and checkpoint mechanism following DNA damage.

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：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌・BRCA1・BACH1/BRIP1・ノックアウトマウス・ノックインマウス

1. 研究開始当初の背景

BACH1/BRIP1 (BRCA1-associated C-terminal helicase 1/BRCA1-interacting protein 1, 以下 BACH1)は 乳癌および卵巣癌抑制遺伝子で最近では散発性の basal-like 乳癌の原因として注目をされている BRCA1 の BRCT 領域と相互作用する DNA ヘリカーゼであり、DNA 損傷時に BRCA1 と結合し DNA 修復機能を担う。さらに、BACH1-BRCA1 結合は細胞周期に制御された BACH1 の Ser990 のリン酸化に依存しており、DNA 二本鎖切断の修復と G2-M チェックポイント機構に働いていることがわかっている。BRCA1 と BRCA2 に変異のない早期発症乳癌群において、BACH1 の変異が認められている。さらに BRCA1/BRCA2 変異陰性家系出身の 3,000 人を超える個人について BACH1 変異を調査したところ、乳癌を認める 1,212 人中 9 人に BACH1 変異が同定されたが、2,081 人の対照では 2 人にしか同定されず (P=0.003)、乳癌の相対リスクは 2.0 (95%信頼区間[CI]、1.2-3.2、P=0.012)であった。これらの事実から BACH1 変異が実際に乳癌発症の一因となっていることがわかっている。また、BACH1 は FancJ と呼ばれ、BACH1 における両アレル性変

異は、ファンconi貧血 (FA) の原因となる。ファンconi貧血はゲノム不安定性を示す疾患であり、BACH1 は FA-BRCA 経路による DNA 修復機構において重要な役割を担っていると考えられる。

申請者は、米国コロンビア大学の Thomas Ludwig 博士とともに BACH1 のノックアウトマウスの作製に成功した (未発表)。BACH1 ノックアウトマウスは胎生致死を起因せず、生育し、Lymphoma を主とする腫瘍を形成した。そこで、BRCA1 との結合能を不活化した BACH1 S990A 遺伝子のノックインマウスの表現型の解析を行うことにより、BRCA1-BACH1 相互作用の解析に役立つと考え、本申請に至った。

2. 研究の目的

BACH1 は BRCA1 の BRCT 領域と相互作用するヘリカーゼである。この相互作用は BACH1 Ser990 のリン酸化に依存している。この遺伝子は BRCA1 依存性の DNA 修復および細胞周期チェックポイント機能において重要な役割を担っている。そこで、BACH1 ノックアウトマウスの表現型の解析と EF 細胞、MEF 細胞を用いた BACH1 の機能解析を行い、さらに BACH1 Ser990Ala (以下 S990A) ノックインマウスを作製し、BACH1-BRCA1 相互作用のもつ生物学的な

意義を解析する。

3. 研究の方法

Gene targeting 法を用いて、 $BACH1^{-/-}$ と $BACH1-BCRA1$ が結合できない変異型である Flag-HA tagged $BACH1^{S990A/S990A}$ のマウス ES 細胞を作製し、DNA 損傷応答の解析を行うことにより、 $BACH1$ の DNA 損傷時の機能を明らかにし、さらには $BACH1-BCRA1$ 結合の機能を明らかにする。

さらに、 $BACH1$ ノックアウトマウス、 $BACH1^{S990A}$ ノックインマウスを作製し、表現型を解析する。

(1) $BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の DNA 損傷による感受性の解析。

作製した $BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の ES 細胞・MEF 細胞を 6-well プレートにまき、様々な濃度の Mitomycin-C により DNA 損傷を与え、それぞれの濃度の細胞生存率を Giemsa 染色により解析する。

(2) $BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の ゲノム不安定性の解析。

作製した $BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の ES 細胞・MEF 細胞に Mitomycin-C を与え、nocodazol block にて細胞を分裂期に同期して、固定・Giemsa 染色を行い染色体切断の様子を観察する。

(3) $BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の G2/M 期チェックポイント機構の解析。

作製した $BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の ES 細胞・MEF 細胞に γ -IR を与え、固定・ヒストン H3 のリン酸化の蛍光免疫染色、Propidium iodide (PI) stain を行い、FACScan にて解析する。

(4) $BACH1^{S990A/S990A}$ の DNA 損傷時の局在の解析。

$BACH1^{S990A/S990A}$ の ES 細胞・MEF 細胞に γ -IR を与え、固定・Flag-HA tag の蛍光免疫染色を行い、顕微鏡で観察し、 $BCRA1$ と共に局在を解析する。

(5) $BACH1$ ノックアウトマウス, $BACH1^{S990A/S990A}$ ノックインマウスの表現型の解析

作製した $BACH1$ ノックアウトマウス, $BACH1^{S990A/S990A}$ ノックインマウスを飼育し、腫瘍形成などの表現型を解析する。

(6) $BACH1$ ノックアウトマウス, $BACH1^{S990A/S990A}$ ノックインマウスの DNA 損傷による感受性の解析

作製した $BACH1$ ノックアウトマウス, $BACH1^{S990A/S990A}$ ノックインマウスに γ -IR を与え、経時的生存率と腫瘍形成などの表現型を解析する。

4. 研究成果

$BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の DNA 損傷による感受性の解析として、Mitomycin-C により DNA 損傷を与え細胞生存率を解析したところ、 $BACH1$ WT では細胞生存率の低下はそれほど認めていなかったが、 $BACH1^{-/-}$ では劇的な細胞生存率の低下を認めた。 $BACH1^{S990A/S990A}$ では、 $BACH1$ WT と $BACH1^{-/-}$ の中間の細胞生存率の低下を認めた。

$BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の ゲノム不安定性の解析として、Mitomycin-C を与え染色体切断の様子を観察したところ、 $BACH1$ WT では染色体切断はそれほど認めていなかったが、 $BACH1^{-/-}$ では大多数の染色体切断を認めた。 $BACH1^{S990A/S990A}$ では、 $BACH1$ WT と $BACH1^{-/-}$ の中間の染色体切断数・切断率を認めた。

$BACH1^{-/-}$, $BACH1^{S990A/S990A}$ の G2/M 期チェックポイント機構の解析として、 γ -IR を与え、

FACSscanにて解析した。BACH1 WT では G2/M 期チェックポイント機構の破綻は認めていなかったが、BACH1^{-/-}では劇的な G2/M 期チェックポイント機構の破綻を認めた。BACH1^{S990A/S990A}では、BACH1 WT と BACH1^{-/-}の間程度の G2/M 期チェックポイント機構の破綻を認めた。

BACH1 ノックアウトマウスの表現型は 50 匹中 32 匹に腫瘍形成 (Lymphoma など) を認めた。BACH1^{S990A/S990A} ノックインマウスの表現型は 30 匹中 3 匹に乳癌の発現を認めた。

さらに、BACH1 ノックアウトマウス、BACH1^{S990A/S990A} ノックインマウスの DNA 損傷による感受性の解析のため、γ-IR を与えたところ、BACH1 ノックアウトマウスの生存率は、BACH1^{WT}が 100%生存しているのに対し 21 日後には 85%のマウスが死亡した。

それに対し、BACH1^{S990A/S990A} ノックインマウスは BACH1^{WT}と差がなかった。

以上より、BACH1 は DNA 修復・チェックポイント機構に重大な役割を果たしており、BRCA1 と BACH1 の相互作用も DNA 修復・チェックポイント機構に重大な役割を果たしている事が生物学的に証明できた。

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 4 件)

1. Wu W, Nishikawa H, Hayami R, Sato K, Honda A, Aratani S, Nakajima T, Fukuda M, Ohta T. BRCA1 ubiquitinates RPB8 in response to DNA damage. **Cancer Res.** 67:951-8, 2007. 査読有
2. Tsuzuki M, Wu W, Nishikawa H, Hayami R, Oyake D, Yabuki Y, Fukuda M, Ohta T. A truncated splice variant of human BARD1 that lacks the RING finger and

ankyrin repeats. **Cancer Lett.** 233(1):108-16, 2006.

3. Hayami R, Sato K, Wu W, Nishikawa T, Hiroi J, Ohtani-Kaneko R, Fukuda M, Ohta T. Down-regulation of BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase by CDK2. **Cancer Res.**, 65:6-10, 2005.
4. Sato K, Hayami R, Wu W, Nishikawa T, Nishikawa H, Okuda Y, Ogata H, Fukuda M, Ohta T. Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. **J. Biol. Chem.**, 279:30919-22, 2004.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

速水 亮介 (HAYAMI RYOSUKE)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：05298940

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし