

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300327

研究課題名(和文)新規癌抑制分子の細胞分裂制御能の解析による癌抑制能の解明と癌治療法の開発

研究課題名(英文)Function of the novel tumor suppressor in cell division and carcinogenesis

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) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：家族性乳がん原因遺伝子BRCA1は、変異により乳がん、卵巣がんを引き起こすがん抑制遺伝子である。我々は、BRCA1に結合する新規分子Obg-like ATPase 1 (OLA1)を同定し、その機能を解析したところ、OLA1がBRCA1や中心体の主要な構成因子と直接結合し、中心体の複製を制御することを明らかにした。また、OLA1の乳がん細胞株由来の変異体ではBRCA1との結合能が消失して中心体の制御能が障害され、BRCA1の家族性乳がん由来の点突然変異で、OLA1との直接結合能が著しく低下し、中心体制御能に異常を来すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The breast and ovarian cancer specific tumor suppressor BRCA1 plays important roles in DNA repair and centrosome regulation. We identified Obg-like ATPase 1 (OLA1) that interacts with BRCA1. OLA1 directly bound to BRCA1 and a component of centrosome. OLA1 localized to centrosomes in interphase and to the spindle pole in mitotic phase, and its knockdown resulted centrosome amplification and the activation of microtubule aster formation. OLA1 with a mutation observed in breast cancer cell line failed to bind BRCA1 and rescue the OLA1 knockdown-induced centrosome amplification. BRCA1 variant found in familial breast cancer also abrogated the binding of BRCA1 to OLA1. These findings suggest that OLA1 plays an important role in centrosome regulation together with BRCA1.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：BRCA1 中心体

1. 研究開始当初の背景

乳がんの患者数および死亡数は年々増加傾向にある。遺伝性乳がん・卵巣がん症候群の原因遺伝子である *BRCA1* の生殖細胞系列変異による発症リスクは乳がんで約 80%、卵巣がんで約 40%とされ、若年発症で、両側乳がんや多臓器重複がんが多い。一方、散発性乳がんでは *BRCA1* 遺伝子の変異をほとんど認めないが、散発性乳がんの 30~40%、卵巣がんのほとんどで *BRCA1* の発現量が減少し、また、散発性乳がんの 10-15% を占める Basal-like 乳がんと言われる予後不良のサブグループの遺伝子発現プロファイルが *BRCA1* 変異による家族性乳がんのものと同様であるとされ、*BRCA1* が散発性乳がんの発症にも関与することが示唆されている。

BRCA1 は *BARD1* とヘテロダイマーを形成し、ユビキチン化能を示し、DNA 修復、中心体制御、クロマチンリモデリング、転写制御などの様々な機構に参与する。*BRCA1* の腫瘍由来の点突然変異で、*BARD1* との結合能は阻害され、*BARD1* は *BRCA1* のがん抑制能を制御すると考えられる。*BRCA1* と *BARD1* はそれぞれの C 末端に、DNA 損傷後の細胞周期チェックポイントや DNA 修復に関与するリン酸化タンパク質と結合する BRCT ドメインを持つ。*BRCA1* の BRCT ドメインに結合する分子は、既にいくつか同定され、重要な働きをすることが示されているが、*BARD1* の BRCT ドメインに結合する分子についてはほとんど報告がない。そこで、我々は *BARD1* の BRCT ドメインと結合する分子をプロテオミクス解析で探索し、Obg-like ATPase 1 (*OLA1*) を同定した。

本研究開始前までの我々の *OLA1* の機能解析により、以下のことが明らかになっていた。

- (1) *OLA1* はその C 末端で、*BARD1* の BRCT ドメインに直接結合し、*BRCA1* とも相互作用した。
- (2) *OLA1* は間期で細胞質と中心体に局在し、分裂期では、その C 末端依存性に紡錘体極に局在した。
- (3) siRNA による *OLA1* の発現抑制で中心体数が増加した。
- (4) プロテオミクス解析で *OLA1* に相互作用する分子を同定した。その 1 つである *BRCA1/OLA1*-interacting protein (*BIP*) が *OLA1* と同様に中心体に局在することを明らかにした。

2. 研究の目的

従来、*BRCA1* のがん抑制機能には DNA 修復能が重要と考えられてきた。しかし、我々の研究成果により、*OLA1* が *BRCA1* とともに中心体を制御することが示唆された。また、興味深いことに乳がん細胞株で *OLA1* の homozygous な遺伝子変異が報告されており、この変異による *OLA1* の機能に変化が認められ、*OLA1* もがん抑

制遺伝子である可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、*OLA1* の中心体制御の分子機構とがん抑制機構を生化学的・細胞生物学的にさらに詳細に解析し、加えて *OLA1* のノックアウトマウスの作製と解析により、*OLA1* の個体レベルでの機能と発がんメカニズムへの関わりも解析した。さらに臨床検体を用いて *OLA1* のがん抑制機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

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

OLA1、*BIP*、*BRCA1*、*BARD1* の発現ベクターを作製した。*OLA1*、*BARD1*、*BRCA1* の変異体は、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を用いて行った。

OLA1、*BRCA1*、*BARD1* の中心体局在や、発現抑制や強制発現の影響は、抗 *OLA1* 抗体、抗 *BRCA1* 抗体、抗 *BARD1* 抗体、HA タグを付加した発現ベクターを Hs578T 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 抗体で染色される細胞で、中心体への共局在や中心体数を解析した。

(2) *OLA1* のコンディショナルノックアウトマウスの作製とその解析

OLA1 分子は酵母から哺乳類まで保存されており、生命活動に必須で重要な働きをしていることが想定される。また、*BRCA1* や *BARD1* の通常のノックアウトマウスは致死となることが既に報告されている。加えて、*OLA1* の中心体での重要な機能から、通常のノックアウトマウスは致死となる可能性が高いと考え、コンディショナルノックアウトマウスを作成した。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。

(3) 家族性乳がんにおける *OLA1* 遺伝子変異の解析

23例の *BRCA1*、*BRCA2* 遺伝子変異のない遺伝性乳がん・卵巣がん患者の白血球由来の genomic DNA を用いて、*OLA1* 遺伝子の promoter 領域、10 個の exon 領域並びに flanking intron 領域を PCR で増幅し、direct sequencing (Sanger 法) を行った。

4. 研究成果

(1) がん由来の変異による

OLA1/BRCA1/BARD1/ γ -tubulin 複合体形成と中心体への影響の解明。

免疫沈降法と Pull-down アッセイにより、OLA1 が、BRCA1、BARD1、 γ -tubulin と直接結合することが明らかになり、図の A のような複合体を形成することが示唆された。乳がん細胞由来の OLA1 の E168Q 変異体は BRCA1 との結合能が消失し(図の B)、中心体の数の制御能に異常を来した。家族性乳がん由来で DNA 修復能は正常だが、中心体の数の制御能に異常を来す BRCA1 の I42V 変異体は、OLA1 との結合能が著しく低下した(図の C)。よって、がん由来の変異による複合体形成の異常が中心体制御に異常を来すと考えられた。

乳がん由来で同定されている BARD1 の変異体は、OLA1 との直接結合能が消失した。この変異体の中心体への局在を免疫染色で解析したところ、野生型に比べて中心体への局在が著しく減少していた。また、野生型の BARD1 を過剰発現すると中心体が増加したが、この変異体では野生型に比べて中心体の増加する細胞が減少し、中心体制御能に異常があることが示唆された。

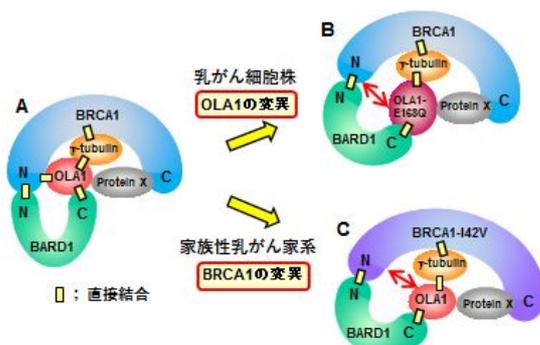


図 がん由来の変異による複合体の異常

(2) OLA1 の中心体制御の分子メカニズムの解明。

OLA1 が大腸がんや肺がんを高発現するという報告があり、野生型の OLA1 を過剰発現すると、BRCA1 依存性に中心体数が増加した。しかし、中心体制御能に異常のある乳がん細胞由来の E168Q 変異体ではその程度はわずかであった。正常な OLA1 の過剰発現が中心体増加を引き起こすことを利用して、リン酸化の候補残基、アセチル化部位として報告されている残基、OLA1 の ATPase 活性に重要な ATP の結合残基の変異体を過剰発現したところ、中心体数の増加が E168Q 変異体と同程度に低下する変異体が同定された。

(3) OLA1 の新規結合分子の機能解析。

我々がプロテオミクス解析で新規 OLA1 結合分子として同定した BIP は OLA1 と同様に中心体に局在し、OLA1、BRCA1 の N 末端と直接結合することが明らかになった。本分子は乳がん発現量が高いほど患者の生存率が低いとされている。そのため、乳がん細胞株で本分子を過剰発現したところ、中心体数が増加した。BRCA1 の N 末端領域の家族性乳がん由来の多数の変異体との相互作用について、免疫沈降法で解析したところ、BIP との相互作用が BRCA1 の 2 つの変異体で著しく低下していた。さらに、pull-down アッセイによって直接結合についても解析したところ、直接結合も低下していた。興味深いことに、これらの BRCA1 変異体は、中心体への局在が野生型に比較して低下しており、本分子が BRCA1 の中心体局在に関与することが示唆された。

(4) *Ola1* ノックアウトマウスの表現型の解析。

OLA1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。まず、全身で Cre を発現する CAG-Cre マウスと交配し、全身でのノックアウトの影響を解析したところ、*Ola1* ホモノックアウトマウスは胎生期、生後も体長が小さく短命で、発育異常が起こることが明らかになった。*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、脾臓で異型性のある細胞の増加が見られ、病理形態学的に血球系の腫瘍であることが示唆された。

(5) BRCA1、BRCA2 に変異のない家族性乳がんの検体における OLA1 遺伝子変異の解析。

OLA1 の遺伝子変異が家族性乳がんの原因となるかどうかを検討するため、23 検体の BRCA1、BRCA2 に変異のない家族性乳がんの genomic DNA で OLA1 遺伝子の変異の有無を解析した。本解析では、OLA1 遺伝子の変異は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Fujita H, Yoshino Y, and Chiba N. Regulation of centrosome cycle. Molecular & Cellular Oncology 査読有 3(2), 2016, e1075643

DOI:10.1080/23723556.2015.1075643

千葉 奈津子, BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御能とゲノム安定性の維持機構生化学, 査読無, 87 巻, 2015, 741-743

千葉 奈津子, BRCA1 とその新規結合分子 OLA1 による中心体制御能と乳がん発症機

構 実験医学、査読無、32 巻、2014、908-910

松澤 綾子、千葉 奈津子、家族性乳がん原因遺伝子産物 BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の中心体制御機構、細胞工学、査読無、33 巻、2014、432-433

松澤 綾子、千葉 奈津子、家族性乳がんの原因遺伝子の産物である BRCA1 の新規の結合タンパク質 OLA1 は中心体を制御する ライフサイエンス新着論文レビュー ライフサイエンス統合データベースセンター、査読無、2014、<http://first.lifesciencedb.jp/archive/s/8075>

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*, 査読有 53(1), 2014, 101-114,

DOI:10.1016/j.molcel.2013.10.028

Towler W I, Zhang J, Ransburgh D, Toland A, Ishioka C, Chiba N, and Parvin J D. Analysis of BRCA1 variants in double strand break repair by homologous recombination and single strand annealing. *Human Mutation*, 査読有, 34(3), 2013, 439-445,

DOI: 10.1002/humu.22251

千葉 奈津子、新規乳がん関連分子の細胞分裂制御能の解析による発がん機構の解明と治療法の開発 *がん*と人、査読無、第 39 号、2012、48-49

Kais Z, Chiba N, Ishioka C, Parvin J D. Functional differences among BRCA1 missense mutations in the control of centrosome duplication. *Oncogene*, 査読有, 31(6), 2012, 799-804

DOI:10.1038/onc.2011.271

[学会発表](計 2 2 件)

飯地 雄大、渡邊 利雄、千葉 奈津子 他、中心体制御因子 Ola1 ノックアウトマウスに自然発生した造血器系腫瘍の病理組織学的解析、第 20 回 造血器腫瘍研究会、2016 年 2 月 12 日、かずさアカデミアホール(千葉県・木更津市)

千葉 奈津子、BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の中心体制御能の破綻と発がん、第 19 回 東北家族性腫瘍研究会学術集会、2016 年 1 月 30 日、T K P ガーデンシティ仙台(宮城県・仙台市)

吉野 優樹、千葉 奈津子 他、新規 BRCA1 結合分子 OLA1 による中心体数制御機

子機構、第 33 回染色体ワークショップ 第 14 回核ダイナミクス研究会、2016 年 1 月 14 日、松島一の坊(宮城県・松島町)

藤田 拓樹、千葉 奈津子 他、新規 BRCA1 結合分子 OLA1 と協調した BARD1 の中心体制御機構、第 33 回染色体ワークショップ 第 14 回核ダイナミクス研究会、2016 年 1 月 13 日、松島一の坊(宮城県・松島町)

吉野 優樹、千葉 奈津子 他、BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御機構の解析、第 33 回染色体ワークショップ 第 14 回核ダイナミクス研究会、2016 年 1 月 13 日、松島一の坊(宮城県・松島町)

Fujita H, Chiba N et al, OLA1 and BRCA1/BARD1 heterodimer cooperatively regulate centrosome replication and carcinogenesis. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

藤田 拓樹、千葉 奈津子 他、BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御能の破綻による発がん機構、第 23 回 DNA 複製・組み換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 21 日、焼津グランドホテル(静岡県・焼津市)

藤田 拓樹、千葉 奈津子 他、OLA1 は BRCA1、BARD1 とともに中心体を制御する、第 74 回日本がん学会学術総会、2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

千葉 奈津子、渡邊 利雄 他、家族性乳がん原因分子 Brca1 の新規結合分子 Ola1 の欠損マウスにおける発がん、第 19 回造血器腫瘍研究会、2015 年 1 月 24 日、グランドはがくれ(佐賀県・佐賀市)

高橋 雅信、千葉 奈津子 他、家系内集積を認める BRCA1/2 遺伝子変異陰性乳がん・卵巣がん患者における OLA1 胚細胞性変異解析、第 18 回東北家族性腫瘍研究会学術集会、2015 年 1 月 31 日、T K P ガーデンシティ仙台(宮城県・仙台市)

松澤 綾子、千葉 奈津子 他、家族性乳がん原因遺伝子産物 BRCA1 の新規関連分子の中心体制御能の解析、第 32 回染色体ワークショップ 第 13 回核ダイナミクス研究会、2014 年 12 月 16 日、安芸グランドホテル(広島県・廿日市)

千葉 奈津子 他、新規 BRCA1/BARD1 結合分子 OLA1 は中心体複製機構に関与する、第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

藤田 拓樹、千葉 奈津子 他、BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の中心体制御能の破綻と

発がん機構、第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Matsuzawa A, Fujita H, Wui X, Saito T, Kanno S, Yasui A, and Chiba N. The novel BRCA1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. The 9th 3R Symposium. November 19 2014, 御殿場高原ホテル（静岡県・御殿場市）

千葉 奈津子、BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の機能破綻と発がん機構、遺伝性腫瘍 基礎と臨床の懸け橋 第 73 回日本がん学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

藤田 拓樹、千葉 奈津子 他、新規 BRCA1 結合分子 OLA1 は中心体の複製機構に関与する、第 73 回日本がん学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

千葉 奈津子、BRCA1 の新規結合分子 OLA1 による中心体制御能とその機能破綻による発がん機構、第 7 回 Symphony、2014 年 9 月 14 日ホテルメトロポリタンエドモント（東京都・千代田区）

高橋 雅信、千葉 奈津子 他、BRCA1/2 遺伝子変異陰性の家系内集積を認める乳がん・卵巣がん患者における OLA1 遺伝子の変異解析、第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2014 年 7 月 19 日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

Chiba N. Functional analysis of the tumor suppressor BRCA1. Symposium on Genome Integrity in Cancer and Aging under Academic Agreement with Center for Healthy Aging (CEHA) University of Copenhagen Denmark、2014 年 3 月 10 日、加齢医学研究所（宮城県・仙台市）

仲山 真弘、千葉 奈津子 他、BRCA1 の新規結合分子 OLA1 のノックアウトマウスの解析 平成 25 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2014 年 2 月 18 日、琵琶湖ホテル（滋賀県・大津市）

⑳ 千葉 奈津子、HBOC 基礎研究 BRCA1 の機能評価法の開発と新規 BRCA1 の結合分子 OLA1 の機能の破綻による発がんメカニズム、第 2 回日本 HBOC コンソーシアム学術集会、2014 年 1 月 18 日、東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂（東京都・文京区）

㉑ 千葉 奈津子、家族性乳がん原因遺伝子 BRCA1 の新規結合分子の同定とそのがん抑制能の解明、乳がんにおける基礎・臨床の最前線、第 72 回日本がん学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

〔図書〕（計 1 件）

吉野 優樹、千葉 奈津子、医薬ジャーナル社 インフォームドコンセントのための図説シリーズ 抗悪性腫瘍薬-分子標的治療薬-改訂版 V. 分子標的治療薬を含む標準的治療 4) 乳がん 2015 p173-174

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/cab/>
<http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/neurogenetics/>
<http://ganshien.umin.jp/research/main/hibanatsuko/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

渡邊 利雄（WATABANE Toshio）
奈良女子大学・大学院人間文化研究科・教授
研究者番号：60201208

(3) 連携研究者

菅野 新一郎（KANNO Shin-ichiro）
東北大学・加齢医学研究所・講師
研究者番号：10400417

杉本 亜砂子（Sugimoto Asako）
東北大学・生命科学研究所・教授
研究者番号：80281715