

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461962

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子BAP1,NPM1複合体の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of tumor suppressor gene BAP1, NPM1 complex

研究代表者

西川 裕之(Nishikawa, Hiroyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・研究技術員

研究者番号：90387077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：BAP1とNPM1の結合部位を同定した。BAP1に対してNPM1の1-122アミノ酸が結合した。NPM1はN末端領域で5量体を形成する事からBAP1に結合するにはNPM1の1-122アミノ酸の領域を介して5量体の形態が必須で有ると考えられる。質量分析法によりBAP1,NPM1複合体のDNA修復時における結合タンパク質の検討を行った。DNA修復時にはHCF1タンパク質のパスウェイを制御する事、クロマチンリモデリングに関与する事が示唆された。また、アポトーシス関連タンパク質との結合が観察された。この事によってBAP1,NPM1複合体はDNA損傷が起こるとアポトーシスを誘導する事も示唆された。

研究成果の概要(英文)：As a result of research, the following was found out.
NPM 1 binds to BAP 1 in the region of 1 - 122
BAP 1, NPM 1 complex controls HCF 1 pathway, controls chromatin remodeling and involved in apoptosis induction.

研究分野：分子生物学

キーワード：癌抑制遺伝子 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

(1) BRCA1, BRCA2 は遺伝性乳癌・卵巣癌症候群の原因遺伝子である。それらのタンパク質は相同組換えによる二本鎖 DNA 損傷修復において重要な役割を持ち、転写制御、細胞質分裂、細胞増殖においても重要な役割を果たしている。BRCA1, BRCA2 に結合するタンパク質としてヌクレオホスミン (NPM1) が報告されている。NPM1 は核と細胞質を往復する多機能の核小体リン酸化蛋白である。それはリボソーム会合、前 r-RNA 処理, mRNA 処理, DNA 複製, 核-細胞質蛋白の輸送, 分子シャペロン, 二本鎖 DNA 損傷修復など多機能に関与している。また、研究代表者らは NPM1 が DNA 損傷修復時に 199 番目のスレオニンがリン酸化され DNA 修復部位に凝集することを報告している。

また、BRCA1 に結合する別のタンパク質として BARD1 や BAP1 が報告されている (Oncogene 1998;16:1097-112)。BRCA1 は BARD1 と RING Finger Domain を介して 2 量体を形成する。研究代表者らは、この RING2 量体形成が BRCA1 の E3 活性に必須であることを 2001 年に報告したが、脱ユビキチン化酵素である BAP1 が BRCA1/BARD1 の E3 活性にあたる影響は不明であった。研究代表者は平成 18~22 年度文部科学省科学研究費補助金での成果として BRCA1/BARD1/BAP1 の関係を明らかにした (Cancer Res. 69:111-9, 2009)。BAP1 は、大きく分けて三つの機能に関わると近年報告されている。

(2) 転写因子調節における BAP1 の役割。BAP1 の主要な結合相手として HCF1 が質量分析により同定されている (Biochim Biophys Acta 2010;1799:257-65)。HCF1 は OCT1、E2F1、Kox20、SP1、および GA-結合タンパク質を含む特定の転写因子と相互作用する事が報告されており、またクロマチンメチルトランスフェラーゼ (Set1、MLL1、MLL5)、クロマチンアセチルトランスフェラーゼ (TMOF)、および脱アセチル化酵素 (HDAC1、HDAC2) との相互作用も報告されている。また HCF1 はヒストン H4、9 番目のリジンを脱メチル化して、ヒストン H3 の 4 番目のリジン 4 のトリメチル化を促進するため LSD1 をリクルートすることが報告されている (Mol Cell Biol 2010;30:5071-85)。これらが相互作用する事によりクロマチン構造が緩み転写が開始される。また YY1 は BAP1 と HCF1 に結合する転写因子であり、YY1 によって BAP1 と HCF1 はプロモーター領域にリクルートされ遺伝子発現を促進すると報告されている。

(3) クロマチン修飾での BAP1 の役割
ヒストン H3 の 27 番目リジンのトリメチ

ル化は、ヒストンメチルトランスフェラーゼである EZH1/2 とポリコーム複合体 (PRC2) の複合体によって行われる。ヒストン H3 の 27 番目リジンのトリメチル化がおきると PRC1 複合体のサブユニットである CBX がリクルートされ PRC1 複合体の RING1 によってヒストン H2A の 119 番目のリジンをユビキチン化する。また、BAP1 と ASXL1 が複合体を形成しヒストン H2A の 119 番目のリジンを脱ユビキチン化する。この事によりクロマチン上でヒストン H2A ユビキチン化の動的なバランスがとられている事が示唆された。(Nature; 465:243-247)

(4) DNA 修復での BAP1 の役割

BRCA1, BARD1 複合体が Rad51 などと共に二本鎖 DNA 障害時における DNA 修復に必須な事が報告されている。

BAP1 は BARD1 と結合することによって BRCA1/BARD1 の RING ヘテロダイマー形成を阻害し、E3 リガーゼ活性を失活させる。BAP1 はアミノ酸残基 182-365 を介して BARD1 に結合することにより BRCA1/BARD1 複合体の形成を阻害する事を研究代表者らは報告している (業績 12)。また、in vitro において BAP1 はユビキチン化した BRCA1 を脱ユビキチン化することが分かった。また酵素活性を失活させた BAP1 でも BRCA1/BARD1 の E3 活性を阻害することから、BAP1 は E3 活性の直接阻害と脱ユビキチン化の 2 つの機序で BRCA1/BARD1 によるユビキチン化を抑制すると考えられる。E3/DUB 複合体でこのようなメカニズムを持っているものはこれまでに報告が 1 例しかなく、興味深い構造と考えられる。shRNA を用いた BAP1 ノックダウン細胞において細胞周期の S 期進行の遅延、放射線感受性の亢進、という BRCA1 ノックダウンと同様の表現型を示すことから、これらの細胞機能の中で、BAP1 と BRCA1 は協調してユビキチン化の調節を担っているものと考えられる。また、近年 BAP1 の生殖細胞系列変異は黒色細胞腫の素因となる事や (Nat Genet 2011;43:1018-21) BAP1 の生殖細胞系列変異は悪性中皮腫の感受性因子である事が報告されている (Nat Genet 2011;43:1022-5) 以上の事から BAP1 は非常に重要な癌抑制遺伝子で様々なタンパク質を脱ユビキチン化を行い細胞内でのイベントに関わっているものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は癌抑制遺伝子 BAP1 と NPM1 が二本鎖 DNA 損傷修復において複合体を形成する事を予備実験にて新規に発見した。二つの癌抑制遺伝子が相互作用する事によって DNA 損傷応答時にどの様に DNA 修復に関与するか明らかにし、DNA 損傷時

にユビキチン化と脱ユビキチン化が担う役割を解明することで、乳癌での癌化のメカニズムが解明できると考えた。

また、DNA 損傷時の役割を解明すれば DNA を傷つけるタイプの癌化学療法や放射線療法における効果の改善に役立ち抗癌剤の適応の指標となると考え本研究課題をおこなった。

3. 研究の方法

(1) BAP1 と NPM1 の結合部位を同定

pcDNA3-Flag ベクター及び pET-His ベクターを用いてコンストラクトを作成する。BAP1, NPM1 共に既知の酵素活性中心や核移行シグナルなどを考慮してフラグメント化したコンストラクトを作成した。実験に確実性を持たす為に、2通りの方法で検討を行った。培養細胞を用いた共発現、抗体による免疫沈降による検討及び大腸菌を用いた組換えタンパク質を作成後 SPR(BIACOR)による検討を行った。フラグメント化したタンパク質の相互作用を確認できた後、全長タンパク質に対して点突然変異を作成し相互作用部位のさらなる同定を行った。点突然変異は NCBI に公表されている結晶解析(立体構造解析)、癌体細胞変異部位をフラグメントに照らし合わせて作成した。

(2) 免疫沈降-液体クロマトグラフィ-タンデム マス スペクトロメトリー (IP-LC-MS/MS)法を用いて実験を行った。この方法は培養細胞に目的遺伝子(BAP1, NPM1)を導入してタンパク質を発現させる。もしくは、平成 26 年度に作成予定であるコンディショナルノックインノックアウト細胞を用いて、DNA 損傷をおこさせた後に細胞を溶解し BAP1, NPM1 コンプレックスに結合するタンパク質を免疫沈降し直接プロテアーゼ処理して複合体の混合ペプチドを作成する。作成したペプチドを LC-MS/MS にて分析し質量データを得る。この混合ペプチドの質量データを MATRIX Science 社の MASCOT 及び X!Tandem の 2 つのプログラムを用いてデータベース検索し結合タンパクを同定する。混合ペプチドを用いるため検索結果に非特異的な結合タンパク質が混ざるため結果閲覧プログラム、MATRIX Science 社の SCAFFOLD に特異的、非特異的なタンパク質の結合を検討した。タンパク質同士の結合を保ちながら核及びクロマチンタンパク質を可溶化する為に細胞溶解には 150mM 以下の塩濃度に調製した溶解液に低温下で機能するエンドヌクレアーゼ(ベンゾナーゼ)を用いた。

(3) 同定された相互作用因子のパスウェイ解析

相互作用のあったタンパク質を同定した後、SCAFFOLD ソフトウェアにて一覧、数値化して IPA ソフトウェアにて解析を行った。

IPA での解析を行う事により質量分析で得られた大量複合データを、各種パスウェイにてどのようなタンパク質の変動があるかを網羅的に解析した。IPA ソフトウェアを用いる事でパスウェイ上で DSB 後のタンパク質の変化を検出でき、対象とする遺伝子群に統計的に有為に関わる疾病や生物学的機能を同定出来た。また、上流制御因子の活性化状態を遺伝子データセットから予測が可能である為、DSB 後に BAP1 がどのように機能するか上流、下流両方面から検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) BAP1 と NPM1 の結合部位を同定

pET ベクターを用いて全長 BAP1 タンパク質と、NPM1 タンパク質を 3 分割にした組換えタンパク質を作成し、SPR にて分子間相互作用を検討した。NPM1 は 1-122 アミノ酸までと 122-212 アミノ酸までと 212-294 アミノ酸までとした。結果、1-122 アミノ酸までの N 末端領域でのみ結合が見られた。次に結合のあった 1-122 アミノ酸領域に欠損部位を作成しさらなる結合部位の同定を試みた。欠損部位は 1-122 アミノ酸の範囲に 5 カ所作成し、Del1-33, Del134-39, Del140-93, Del194-102, Del103-122 を作成した。また Del1-122 を作成しネガティブコントロールとした。結果、5 カ所の欠損部位のある NPM1 では BAP1 との結合は見られなかった。次に BAP1 タンパク質を 4 分割した組換えタンパク質を作成した。BAP1 のアミノ酸範囲は 1-188 アミノ酸, 182-365 アミノ酸, 358-537 アミノ酸, 529-729 アミノ酸とした。この断片化した BAP1 と全長の NPM1 との分子間相互作用を検討したところ結合は見られなかった。以上の事から BAP1 と NPM1 の相互作用には BAP1 では全長が必須で有る事が分かった。この事は NPM1 との結合には高次構造を取る必要があると考えられる。また、NPM1 では 1-122 アミノ酸の断片化したタンパク質でのみ結合が見られた事から NPM1 もまた結合には高次構造を必須として考えられる。NPM1 は自己タンパク同士で N 末端領域で結合し 5 量体を形成する事が報告されている事から BAP1 との結合には N 末端領域の 5 量体の形を必須とする事が予想された。

(2) 質量分析法を用いた BAP1, NPM1 複合体の結合タンパク質を同定及び結合タンパク質から予測されるパスウェイ解析。

293T 細胞に BAP1 タンパク質を過剰発現させた株。又はこの株へ siRNA を用いて NPM1 タンパク質の発現を抑えた細胞株を作成した。この 2 種類の細胞株へ放射線や抗がん剤などの薬剤を加え DNA 損傷を与え DNA 修復時に結合するタンパク質を質量分析を用いて検討した。BAP1 のみの測定と BAP1, NPM1 複合体の測定で複数のタンパク質の結合に変化

