

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18409

研究課題名(和文) 中心体型BRCA1複合体：治療標的としての新規BRCA1複合体のがん抑制機構

研究課題名(英文) Centrosomal BRCA1 complex: As a new therapeutic target

研究代表者

吉野 優樹 (Yoshino, Yuki)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60755700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：BRCA1の中心体における新たな相互作用分子としてBIP2を同定した。BIP2の過剰発現は中心体増幅を引き起こし、これにはBIP2のC末端領域が必要であることを明らかにした。また、BIP2の過剰発現は中心体のBRCA1局在を増強し、逆にBIP2との相互作用が減弱するBRCA1変異体は中心体への局在が低下したことから、BIP2がBRCA1の中心体局在の制御に関与すると考えられた。

さらに、がん由来のBIP2変異を解析したところ、C末端側の点変異体では中心体制御活性に異常を認め、そのうち1つはBRCA1との相互作用が低下することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified BIP2 as a new BRCA1-interacting partner in centrosomes. Over-expression of BIP2 induced centrosome amplification. For this activity, C-terminus region of BIP2 was important. Over-expression of BIP2 enhanced BRCA1 localization in centrosomes. In addition, BRCA1 variants with defects in the interaction with BIP2 decreased its localization in centrosomes. Therefore, it was suggested that BIP2 interacted with BRCA1 to regulate BRCA1 localization in centrosomes.

Then, we examined cancer-derived variants of BIP2 about the activity of centrosome regulation. As a result, variants located in C-terminus region lost their centrosome regulating activity, one of which possessed defect in the interaction with BRCA1.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：BRCA1 中心体 乳がん 相同組換え修復

1. 研究開始当初の背景

本邦において乳がんの罹患率は年々上昇し、2010年には長く1位であった胃がんを抜き、がん罹患率の1位となった。また、部位別がん死亡率においても女性のがん死の5位を占める。他のがんと比較して若年で発症する例も多く、社会的にも極めて重要な疾患と言える。乳がんの5~10%は家族性に発症するが、そのうち、高頻度に乳がんと卵巣がんを生じる症候群として、遺伝性乳がん・卵巣がん症候群が知られている。この症候群の原因遺伝子が、がん抑制遺伝子であるBreast Cancer gene 1 (BRCA1)およびBRCA2である。しかし、家族性乳がんのうちBRCA1、2の変異を有する例は40%程度で、いずれにも変異のない症例も多い。BRCA1変異陰性例のなかに、BRCA1結合分子であるBRCA1-associated RING domain 1 (BARD1)等の変異例が報告されていることから(Shiovitz, Ann Oncol. 2015)、BRCA1結合分子も、乳がんの発生に重要な役割を果たす可能性があると考えられる。

BRCA1はBARD1等の分子と複合体を形成し、DNA修復、中心体制御等で機能する。中でもDNA修復機能は詳細に研究されており、DNA二重鎖切断修復系においてBRCA1は重要な因子とされている。従来、BRCA1変異による発がんでは、DNA修復系の異常が主因と考えられていたが、家族性乳がんのBRCA1変異の中にはDNA修復能が正常なものもある。これらの変異による発がんの機序は不明であったが、DNA修復能が正常なBRCA1変異体に、中心体制御能が異常となるものが見いだされ、中心体制御能の異常が発がんに関わる可能性が示唆された(Kais, Oncogene. 2012)。

そこで、申請者の所属する研究室で中心体制御に関わるBRCA1結合因子の探索を試み、BRCA1/BARD1複合体の新規構成因子としてOLA1 (Olg-like ATPase 1)を同定した(Matsuzawa, Mol Cell. 2014)。OLA1はBRCA1およびBARD1の他、中心体の主要構成因子である γ -tubulinと直接結合し、中心体、および分裂期の紡錘体極に局在した。OLA1の発現抑制や過剰発現は、BRCA1依存的に中心体の過剰複製を惹起した。また、OLA1およびBRCA1の乳がん由来の変異体では、OLA1とBRCA1との複合体形成能が低下し、中心体制御能に異常を来すものを認めた。これらから、DNA修復系に働くBRCA1複合体とは構成の異なる、BRCA1/OLA1複合体(中心体型BRCA1複合体)がBRCA1の中心体制御能を担うと考えられた。さらに、Ola1ヘテロノックアウトマウスを作成したところ、脾臓に悪性リンパ腫の自然発生を認めた。

中心体は細胞内小器官の一つであり、細胞分裂時に染色体を娘細胞に分配する紡錘体の形成基点となる(図1)。そのため、中心体の数的、構造的異常は娘細胞への染色体の

不均等分配を引き起こし、染色体不安定性(CIN)を惹起すると考えられる。CINは多くの遺伝子の欠失または過剰をもたらし、がん化を促進すると考えられており、がんの特徴の1つとされている。実際に乳がんをはじめ、様々ながんでCINとともに中心体の数や大きさの異常が認められる。

これらの事から、DNA修復能に加えて、中心体型BRCA1複合体による中心体制御機構も、BRCA1のがん抑制機構として非常に重要であることが示唆される。そこで、中心体において中心体型BRCA1複合体を制御する分子をプロテオミクス解析により探索し、OLA1結合分子として新たにBIP2を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、がん抑制機能としてのBRCA1による中心体制御機構を解明するため、中心体型BRCA1複合体の中心体への局在機序、および中心体内での中心体型BRCA1複合体活性の制御機構を明らかにする。また、臨床的に報告されているRACK1の異常とがんの悪性度との関連の分子機序解明のため、RACK1の発現亢進や変異が中心体型BRCA1複合体の局在、活性に与える影響を、がん細胞株を用いて解析を行う。

3. 研究の方法

BIP2の機能に必要なドメインの決定
BIP2は7つのドメインから構成される。これらのドメインを欠損した変異体発現ベクターを作成し、その過剰発現時の中心体数の変化を免疫染色で観察する。また、中心体型BRCA1複合体構成因子と欠損変異体との相互作用を共免疫沈降法で解析し、中心体制御能との相関を解析する。

中心体制御におけるBIP2とBRCA1の相互作用の受容性

BIP2の過剰発現時の中心体におけるBRCA1の局在を免疫染色によって観察する。また、BRCA1との相互作用が減弱するBIP2変異体の過剰発現時のBRCA1の中心体局在、およびBIP2との相互作用が減弱するBRCA1変異体の中心体局在を免疫染色で評価し、BIP2とBRCA1との相互作用がBRCA1の中心体局在に及ぼす影響を解析する。

がん由来のBIP2変異体の機能解析
BIP2過剰発現時の中心体複製制御因子の解析

公開データベースからがんで報告されているBIP2の変異を探索し、その中からモチーフ予測等で機能的な重要性が疑われる残基における変異を選択し、発現ベクターを作成する。BIP2変異体を過剰発現し、中心体数の変化を観察する。また、中心体型BRCA1複合体構成因子との相互作用を共免疫沈降法でしらべ、がんにおけるBIP2の変異が中心体制御系に及ぼす影響を解析する。

新規 BRCA1 結合分子の DNA 損傷修復能の解析

BRCA1 は DNA 損傷修復、とくに相組換え修復 (HR) に必須の因子の一つである。我々は OLA1 および BIP2 が BRCA1 と複合体を形成し、中心体制御に働くことを示したが、これらの分子の HR における機能は未解明であった。既存の HR 活性測定法 (DR-GFP assay, Ransburgh et al. Cancer Res. 2010) を用いて OLA1 の HR 活性を測定することを試みたが、OLA1 のノックダウンによる HR 活性の変化を検出することはできなかった。そこで、ゲノム編集技術を応用し、HR 活性を直接定量する手法を新たに開発し、これを用いて新規 BRCA1 結合分子の HR における活性の測定を試みた。

4. 研究成果

BIP2 の機能に必要なドメインの決定

BIP2 のドメイン 1、2、ドメイン 3、4、ドメイン 5、6、ドメイン 7 を欠損させた変異体発現ベクター ($\Delta 12$ 、 $\Delta 34$ 、 $\Delta 56$ 、 $\Delta 7$) をそれぞれ作成した。これを MCF-7 細胞および Hs578T 細胞に導入し、中心体数の変化を観察したところ、いずれの細胞においても $\Delta 56$ および $\Delta 7$ の過剰発現では中心体数の増加を認めず、中心体複製制御能にドメイン 5 から 7 が重要であることが示唆された。

また、各欠損変異体を MCF-7 細胞および Hs578T 細胞に導入し、変異体の中心体への局在を評価したところ、MCF-7 細胞においては $\Delta 56$ および $\Delta 7$ の中心体局在が低下する一方、Hs578T 細胞では各変異体間で顕著な差を認めなかった。これらから、ドメイン 5 から 7 は中心体への BIP2 の局在にも関与するが、これらのドメインに依存する中心体局在能は細胞種に依存することが明らかになった。

各欠損変異体と中心体型 BRCA1 複合体構成因子である BRCA1、BARD1、OLA1、g-tubulin との相互作用を免疫沈降法で評価したところ、 $\Delta 56$ および $\Delta 7$ において BRCA1 との相互作用が大きく増強することが明らかになった。また、 $\Delta 12$ は OLA1 との相互作用が减弱していた。

中心体型 BRCA1 複合体構成因子との相互作用を担う BIP2 のドメインを決定するため、ドメイン 1、2、ドメイン 3、4、ドメイン 5、6、ドメイン 7 の GST 融合タンパク質発現ベクターを作成し、大腸菌で各ドメイン-GST 融合タンパク質を発現させ、精製した。これをもちいて中心体型 BRCA1 複合体構成因子との Pull-down アッセイを行ったところ、BRCA1 の N 末端部分、OLA1、g-tubulin との相互作用はドメイン 1 から 4 が、BARD1 との相互作用はドメイン 3 から 7 が関与することが明らかになった。

中心体制御における BIP2 と BRCA1 の相互作用の受容性

中心体制御機能を失った欠損変異体は BRCA1 との相互作用が異常亢進していたことから、

BRCA1 と BIP2 との相互作用が中心体制御能に重要であることが示唆された。そこで、BRCA1 の N 末端領域の点変異体をスクリーニングし、BIP2 との相互作用が减弱する変異体として

がん由来の BIP2 変異体の機能解析

がんにおける BIP2 の役割を解析するため、がんでは報告された BIP2 の点変異体およびモチーフ解析による翻訳後修飾予測残基、計 11 変異体を作成した。これらを MCF-7 および MCF-10A 細胞に導入し、中心体数を観察したところ、MCF-7 では 7 変異体、MCF10A では 6 変異体で中心体増幅を認めなかった。内、5 変異体では両細胞ともに中心体増幅を示さなかった。また、中心体増幅を示さなかった変異体は、1 変異体を除いてすべて C 末端側に位置しており、中心体制御能において BIP2 の C 末端側が重要であることが確認された。

新規 BRCA1 結合分子の DNA 損傷修復能の解析

ゲノム編集に用いられる Cas9 エンドヌクレアーゼによってゲノム DNA に二本鎖切断を作成する。そこに HR でマーカーをノックインし、その効率を定量することで HR 活性を測定した (特許出願中)。本測定法を用い、OLA1 および BIP2 のノックダウンによる HR 活性の変化を測定したところ、OLA1 のノックダウンによって HR 活性が低下し、BIP2 のノックダウンでは変化しなかった。このことから、OLA1 は BRCA1 とともに中心体制御と HR の双方に関与し、一方 BIP2 は BRCA1 の中心体制御機能にのみ関与することが示唆された。

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)

[学会発表](計 10 件)

吉野優樹、小林輝大、宮西優太郎、齋匯成、遠藤菜乃、新藤一葉、千葉奈津子. 新規 BRCA1 結合分子 BIP2 と BRCA1 のバランスが正常な中心体複製に重要である. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017/12/7 兵庫・神戸

吉田貴大、吉野優樹、小河 穂波、佐々木伯大、渡邊 利雄、千葉奈津子. BRCA1 の新規結合分子 Ola1 のノックアウトマウスの表現型の解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017/12/7 兵庫・神戸

遠藤菜乃、吉野優樹、小林輝大、齋匯成、千葉奈津子. BRCA1 は乳腺上皮細胞において BIP2 の過剰発現による中心体過剰複製を抑制する. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017/9/28 神奈川・横浜

齋匯成、吉野優樹、方震宙、千葉奈津子. BRCA1 結合分子である OLA1 は中心体の DNA 損傷応答を制御する. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017/9/28 神奈川・横浜

吉野優樹、齋匯成、石岡千加史、安井明、千葉奈津子. 中心体制御因子としての新規 BRCA1 結合因子 BIP2 の同定. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016/10/8 神奈川・横浜

齋匯成、吉野優樹、石岡千加史、千葉奈津子. 新規中心体タンパク質 BIP2 は BRCA1 の中心体局在と発がん機構に關与する. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016/10/8 神奈川・横浜

吉野優樹、齋匯成、菅股眞美、安井明、千葉奈津子. 新規中心体タンパク質 BIP2 は BRCA1 依存性に中心体数を制御する. 第 89 回日本生化学大会 2016/9/27 宮城・仙台

新藤一葉、吉野優樹、齋匯成、菅股眞美、早坂美月、千葉奈津子. 新規中心体タンパク質 BIP2 は BRCA1 の中心体局在制御に關与する. 第 89 回日本生化学大会 2016/9/27 宮城・仙台

飯地雄大、吉野優樹、中村保宏、小河穂波、二口充、藤田拓樹、渡邊利雄、千葉奈津子. 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 千葉・木更津

吉野優樹、鈴木健太、菅股眞美、齋匯成、千葉奈津子. 新規 BRCA1 結合因子 BIP2 による中心体数制御の分子機構. 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 宮城・松島

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：相同組み換え修復活性の定量法
発明者：吉野優樹、千葉奈津子、遠藤菜乃
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2017-250777 号
出願年月日：2017 年 12 月 27 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/cab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 優樹 (YOSHINO, Yuki)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号：60755700

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

小林 輝大 (KOBAYASHI, Akihiro)
鈴木 健太 (SUZUKI, Kenta)
菅股 眞美 (SUGAMATA, Mami)
遠藤 菜乃 (ENDO, Shino)