

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08649

研究課題名(和文) テロメア機能から読み解く遺伝性乳癌におけるゲノム不安定化のメカニズム

研究課題名(英文) Understanding mechanism of genome instability in hereditary breast cancer induced by telomere dysfunction

研究代表者

小西 昭充 (Konishi, Akimitsu)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50381877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌は、現在女性に最も多い癌であり、遺伝性乳癌はその約10%を占める。遺伝性乳癌の主要な原因遺伝子の一つであるBRCA1遺伝子の変異により、ゲノム不安定化を引き起こす。また、染色体末端に存在するテロメアはゲノム安定化に重要な役割を担っている。そこで、本研究では、テロメアに着目してBRCA1異常によるゲノム不安定化のメカニズム解明に取り組んだ。本研究により、BRCA1複合体がテロメア領域におけるクロマチンのユビキチン化を制御し、ゲノム不安定化につながるテロメア機能不全時の染色体末端融合を抑制する詳細な分子機構を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性乳癌は乳癌の中でも治療に難渋するトリプルネガティブ乳癌に含まれ予後不良であり、BRCA 遺伝子に変異が存在すると70%以上という高率で遺伝性乳癌を発症することから、遺伝性乳癌の病態解明は喫緊の課題の一つである。テロメアによる染色体末端融合は、癌で高率で見られるゲノム不安定化を引き起こす原因であり、本研究で明らかになったBRCA1 複合体による染色体末端融合の分子機構に関する知見は、遺伝性乳癌の病態理解と分子標的治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer is currently the most common cancer in women, with hereditary breast cancer accounting for about 10% of the cases. Mutations in the BRCA1 gene, one of the major causative genes in hereditary breast cancer, cause genome instability. Telomeres are localized at the ends of chromosomes to play an important role in genome stabilization. In this study, we focused on telomere function to elucidate the mechanism of genome instability caused by BRCA1 abnormalities.

This study reveals a detailed molecular mechanism by which the BRCA1 complex regulates the ubiquitination of chromatin in the telomere region and represses chromosome end fusion during telomere dysfunction, which leads a genome instability.

研究分野：細胞生物学

キーワード：テロメア 染色体不安定化 DNA損傷反応 細胞周期 乳癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体末端に存在するテロメアはゲノム安定性の維持に重要な役割を果たしており、癌・老化・幹細胞機能異常など様々な疾病に関与している。テロメアの短縮などでテロメア機能が破綻すると、一般的な DNA 損傷とほぼ同じ細胞応答が誘導され、染色体末端は内在性の DNA 修復機構（非相同末端融合：non-homologous end joining(NHEJ)）により他の染色体末端と融合する。異なる染色体同士の融合は、細胞分裂時に染色体断裂を誘導し、著しいゲノムの不安定化の結果、癌化および癌の悪性化につながると考えられている（図1）。

乳癌は、現在女性に最も多い癌であり、遺伝性乳癌はその約 10%を占める。遺伝性乳癌の主要な原因遺伝子の一つである BRCA1 は DNA 修復の制御因子として解析が進められているが、BRCA1 蛋白がテロメアに局在すること、BRCA1 遺伝子の変異・欠失がテロメア DNA の異常短縮や染色体末端融合を誘導することから、BRCA1 変異による乳癌発症へのテロメア機能異常の関与が強く示唆されてきたが、その分子機序は現在のところ不明であった。

申請者らは、これまでにテロメア機能の低下による染色体末端融合は G1 細胞周期特異的に起こり、S~G2 期では CDK1/2 活性によって抑制されていることを見出した（Genes Dev (2008)、図2）。このような制御は X 線照射などによって起こる DNA 損傷では行われず、テロメア特異的な制御機構である。テロメア DNA 複製によって、S~G2 期は一過的にテロメアによる染色体末端保護が解除されていると考えられており、実際に一過的に S/G2 期に染色体末端部に DNA 損傷反応が誘導される。しかし、引き続いて起こるはずの DNA 修復（NHEJ による染色体末端の融合）は起こらない。つまり、テロメアでは本来 DNA 損傷反応によって誘導される DNA 修復（NHEJ）を S/G2 期特異的に抑制する仕組みが存在すると言える。我々の見出した細胞周期特異的な NHEJ 制御機構はテロメア複製時の染色体末端融合を防ぐ為に利用されていると考えられる（図2）。

そこで、我々はテロメアに誘導される DNA 損傷反応の細胞周期による違いについて詳細な解析を行った。その結果、DNA 損傷反応の重要なシグナルであるクロマチンのユビキチン化修飾がテロメア領域では S/G2 期特異的に抑制されており、ユビキチン化修飾依存的に DNA 損傷部位に集積して NHEJ を促進する 53BP1 タンパクの集積も抑制されていることを発見した。さらにこの制御をおこなっているのが、遺伝性乳癌の原因遺伝子である BRCA1 及びその結合蛋白である脱ユビキチン化酵素 BRCC3 であることを見出した。

これらの結果は、テロメア DNA の複製に伴って起きる DNA 損傷反応が誘導する染色体末端融合を、BRCA1 複合体がクロマチンのユビキチン化を抑制して防いでいるという構図を示唆する（図2）。本研究ではこの仮説をもとに、BRCA1 遺伝子変異による遺伝性乳癌のゲノム不安定化の分子病態の解明を目指した。

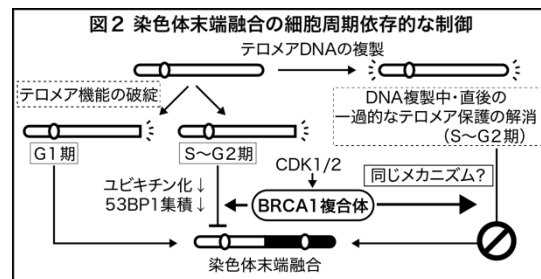
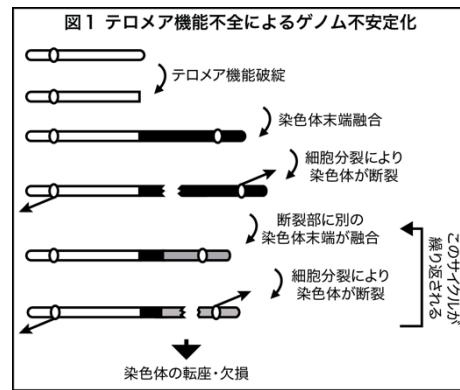
2. 研究の目的

染色体末端に存在するテロメアはゲノム安定性の維持に非常に重要であり、テロメアによる染色体末端保護機能が破綻すると染色体末端同士が融合し、染色体の欠損・転座を引き起こす。我々は、染色体末端融合が遺伝性乳癌原因遺伝子である BRCA1 複合体によって制御されていることを見出した。乳癌は女性で最も多い癌であり、その約 10%が BRCA 遺伝子の異常によって起こる遺伝性乳癌である。本研究では、テロメア機能に着目した解析から遺伝性乳癌におけるゲノム不安定化のメカニズムを明らかにし、癌抑制のための基盤技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

a. 新規テロメア機能不全誘導システムの構築

これまでの研究では、温度感受性変異体を利用したテロメア機能不全の誘導システムを用いていた。しかし、複数の誘導系を用いて解析結果を確認することは、研究の信頼性を高め



るために非常に重要である。そこで、本研究ではテロメア機能不全を簡便・高効率に誘導するための新たなシステムの構築を行い、複数の誘導系を研究に用いることとした。

b. テロメア領域クロマチンのユビキチン化制御機構の解明

ユビキチン化はユビキチン化と脱ユビキチン化のバランスで行われている。これまでに、我々は脱ユビキチン化酵素である BRCC3 が、テロメア機能不全時の染色体安定化に関与することを見出している。また、他のグループからクロマチンのユビキチン化に関与する因子が多数報告されており、これらのユビキチン化修飾関連因子を中心に、テロメア領域クロマチンのユビキチン化制御についての解析を行った。

c. テロメア領域クロマチンのユビキチン化を制御する BRCA1 複合体因子の同定

遺伝性乳がん原因遺伝子の一つである BRCA1 は多数のタンパクと結合・相互作用することが知られている。我々が、テロメア安定化に関与する因子として見出した脱ユビキチン化酵素 BRCC3 もその一つである。そこで、BRCA1 と相互作用する複合体構成因子についてそれぞれ RNAi 法によるノックダウンを行い、テロメア領域クロマチンのユビキチン化修飾・53BP1 集積への関与について調べた。

d. 細胞周期調節キナーゼ CDK1/2 活性によるテロメア領域での BRCA1 複合体機能の調節機構の解明

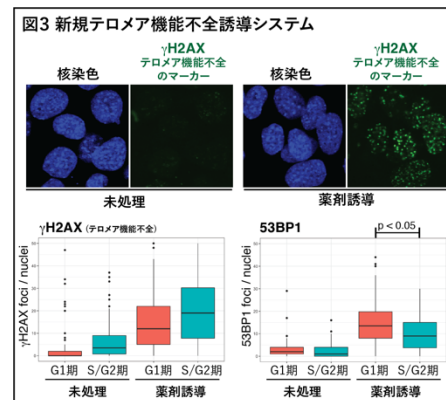
我々はこれまでに、テロメア機能不全による染色体末端の不安定化は細胞周期調節キナーゼ CDK1/2 活性によって厳密な制御を受けていることを報告している。そこで、既存のリン酸化プロテオームに関するデータベースを用いて、CDK1/2 の基質となりうる BRCA1 複合体の候補因子の探索を行った。さらに、リン酸化部位についてそれぞれアミノ酸置換変異体を作成し、テロメア領域クロマチンのユビキチン化修飾・53BP1 集積を調べ、CDK1/2 によるテロメア領域での BRCA1 複合体の機能制御について解析を行った。

4. 研究成果

a. 新規テロメア機能不全誘導システムの構築

薬剤誘導による人為的タンパク分解システム（国立遺伝学研究所、鐘巻将人教授の開発による）をテロメア保護の主要因子である TRF2 分子に応用し、薬剤投与により TRF2 タンパク質が細胞内から分解消失することで、テロメア機能不全が誘導されるシステムを構築した。

このシステムを用いた解析でも、G1 細胞周期特異的なテロメア領域への 53BP1 の集積が観察され、この現象が複数のテロメア機能不全の誘導システムで共通していることが確認できた（図 3）。



b. テロメア領域クロマチンのユビキチン化制御機構の解明

テロメア機能不全により染色体末端には DNA 損傷反応が誘導されることが知られている。そこで、DNA 損傷によるクロマチンのユビキチン化を行っているユビキチンリガーゼ RNF168 の挙動を調べたところ、テロメア機能不全時に RNF168 は S/G2 細胞周期においてもテロメア領域に集積していた。しかし、S/G2 細胞周期にはクロマチンのユビキチン化は抑制されていた。逆に、脱ユビキチン化酵素である BRCC3 を RNAi 法でノックダウンすると、S/G2 細胞周期のテロメア領域クロマチンのユビキチン化は亢進した。これらの結果から、脱ユビキチン化が亢進することで、S/G2 細胞周期ではユビキチン化・53BP1 集積が抑制されていることが明らかとなった。

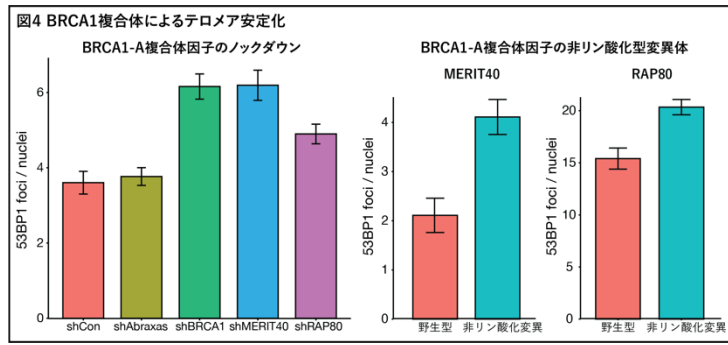
c. テロメア領域クロマチンのユビキチン化を制御する BRCA1 複合体因子の同定

BRCC3 を含んだ BRCA1 複合体は、BRCA1-A 複合体と呼ばれ BRCA1、Abraxas、MERIT40、RAP80、BRCC3 によって構成される。そこで、これらの因子をそれぞれ RNAi 法を用いてノックダウンし、テロメア機能不全による S/G2 期のテロメアへの 53BP1 の集積の多寡を比較した。その結果、MERIT40 と RAP80 をノックダウンするとテロメアへの S/G2 期の 53BP1 集積が増加し、この二つの因子が BRCA1-A 複合体の中でも特にテロメア安定化への寄与が高いことが示された（図 4）。

d. 細胞周期調節キナーゼ CDK1/2 活性によるテロメア領域での BRCA1 複合体機能の調節機構の解明

リン酸化プロテオームに関するデータベースの検索から、MERIT40 と RAP80 には CDK1/2

による複数のリン酸化部位が存在することが明らかとなった。そこで、これらのリン酸化候補部位について、それぞれリン酸化を受けないアラニンへのアミノ酸置換変異体を作成して、テロメア機能不全による S/G2 期のテロメアへの 53BP1 の集積の多寡を比較した。その結果、MERIT40、RAP80 共に 53BP1 のテロメアへの集積に強く関与するリン酸化部位が特定された (図 4)。



以上の結果は、BRCA1 複合体因子が染色体融合に関与するクロマチンユビキチン化制御に強く関与していることを示していた。また、癌ゲノムデータベース検索から、特定されたテロメア安定化に関与する二つの BRCA1 複合体構成因子は、遺伝性乳がんにおいて高頻度の変異が見られており、本研究で明らかとなった BRCA1 複合体による染色体末端融合の分子機構に関する知見は、遺伝性乳癌の病態理解と分子標的治療法の開発につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Yuji, Konishi Akimitsu, Obinata Hideru, Tsuneoka Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Metformin activates KDM2A to reduce rRNA transcription and cell proliferation by dual regulation of AMPK activity and intracellular succinate level	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55075-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagata M, Arakawa S, Yamaguchi H, Torii S, Endo H, Tsujioka M, Honda S, Nishida Y, Konishi A, Shimizu S	4. 巻 2
2. 論文標題 Dram1 regulates DNA damage-induced alternative autophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stress	6. 最初と最後の頁 55-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15698/cst2018.03.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小西昭充、南嶋洋司
2. 発表標題 BRCA1 complex regulates cell cycle-dependent DNA damage response at telomeres to maintain chromosome integrity
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西昭充
2. 発表標題 早期細胞老化誘導時に起こる細胞内代謝変化への理解
3. 学会等名 第8回DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒牧佑磨、小西昭充、南嶋洋司
2. 発表標題 早期細胞老化におけるアミノ酸代謝の変調
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西昭充
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレスによって誘導されるオートファジー
3. 学会等名 第7回DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuichiro Watanabe, Akimitsu Konishi, Shinji Tanaka, Shigeomi Shimizu
2. 発表標題 Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木啓、大嶋紀安、小西昭充、立井一明、佐藤精一、和泉孝志
2. 発表標題 骨芽細胞様細胞MC3T3-E1におけるアクチン細胞骨格再構成を介した炎症性脂質メディエーター誘導性の骨形成制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中祐司、小西昭充、大日方英、南雲美奈代、和泉桃佳、岡本健吾、常岡誠
2. 発表標題 メトホルミンはKDM2A依存的なrRNA転写抑制及び細胞増殖抑制を引き起こす
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小西昭充
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた可視化による内在性p53蛋白ダイナミクスの一細胞解析
3. 学会等名 DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒牧佑磨、小西昭充、和泉孝志
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた蛍光蛋白ラベル法による内在性p53蛋白動態の1細胞解析
3. 学会等名 染色体ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒牧佑磨、小西昭充、和泉孝志
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた蛍光蛋白ラベル法による内在性p53蛋白動態の1細胞解析
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学大学院医学系研究科テニュアトラック普及推進室
<http://tenure.showa.gunma-u.ac.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----