

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07248

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子BAP1、DSB応答の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the tumor suppressor gene BAP1 and DSB response.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制に働いているタンパク質であるBRCA1とBARD1は2量体を形成する。この2量体形成を阻害すると考えられていたBAP1がCK2 /CK2 の存在下においては逆に結合を促しBRCA1/BARD1/BAP1/CK2のタンパク質複合体を形成する事が判明した。BAP1とCK2はDNA損傷時に結合しBAP1のリン酸化を含む翻訳後修飾を行っている事が判明した。本研究課題にて癌抑制に機能しているBRCA1が新規に発見したタンパク質と相互作用する事によってDNA損傷応答時やDNA修復の新たなシグナル経路が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷応答時やDNA修復が機能不全を起こすと癌化が起きる。今回の新たな複合体の発見はBRCA1の癌抑制に関わる新たなメカニズムが解明できると考える。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る。

研究成果の概要(英文)：BRCA1 and BARD1, proteins involved in tumor suppression, form a dimer. BAP1, which was thought to inhibit this dimer formation, was found to bind to BRCA1 in the presence of CK2 /CK2 and form a protein complex of BRCA1/BARD1/BAP1/CK2.

BAP1 and CK2 bind at the time of DNA damage and perform post-translational modifications including phosphorylation of BAP1. This suggests that the newly discovered complex is involved in DNA repair that occurs as a subsequent event after DNA damage.

This research project has elucidated a new signaling pathway for DNA damage response and DNA repair through the interaction of BRCA1, which functions as a tumor suppressor, with the newly discovered protein.

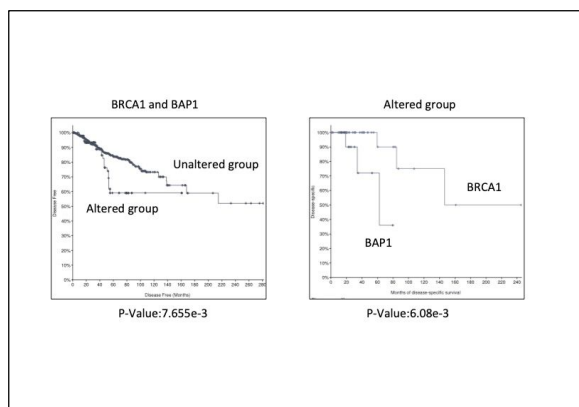
研究分野：癌抑制遺伝子

キーワード：DNA修復

1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子 BAP1 の変異は悪性中皮腫、ブドウ膜および皮膚黒色腫、肺腺癌および腎細胞癌を引き起こすことが報告されている(Nat Genet 2011;43:1018-21)が乳癌、卵巣癌などでは報告が無い。後述の BRCA1 との関係やゲノムの安定性、DNA 修復に働く事など共通の役割が多い事から研究代表者は予備検討を行い cBioPortal にて乳癌患者(データセット:Breast Invasive Carcinoma)の BAP1 遺伝子に変異を有した場合のカプランマイヤー生存曲線を作成し、検討したところ有意差を見いだした。

また、研究代表者の受けた基盤研究(C)2014 年度~2016 年度の研究成果として DSB 時に複数のタンパク質と相互作用する事が確認された。近年、遺伝性乳がんの原因遺伝子 BRCA1 が DNA 損傷修復や転写制御に関ると明らかにされたことから、乳がんの発生に DNA 損傷修復機能の異常が強く関わっていると推測されている。また BAP1 は DSB 後の相同組換え修復に関与している事も報告されている(PNAS 2013;111:285-290) BRCA1 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 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。研究代表者が受けた基盤研究(C)2014 年度~2016 年度の研究成果として DNA の 2 本鎖切断が起こると BAP1 と NPM1 の結合が起こり DNA 修復に関与する事を解明した。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。研究代表者は若手研究(B) 2008 年度~2010 年度での成果として BRCA1/BARD1/BAP1 の関係を明らかにし、BRCA1 と BAP1 の直接相互作用ではなく BARD1 と BAP1 の直接相互作用を解明した(Cancer Res. 69:111-9, 2009)。その後の研究からも BRCA1 と BAP1 の相互作用は直接では無いが互いに共通するタンパク質が見つかった。

2. 研究の目的

本研究課題で機能解明を目指した 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。

(1) 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。

(2) 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)

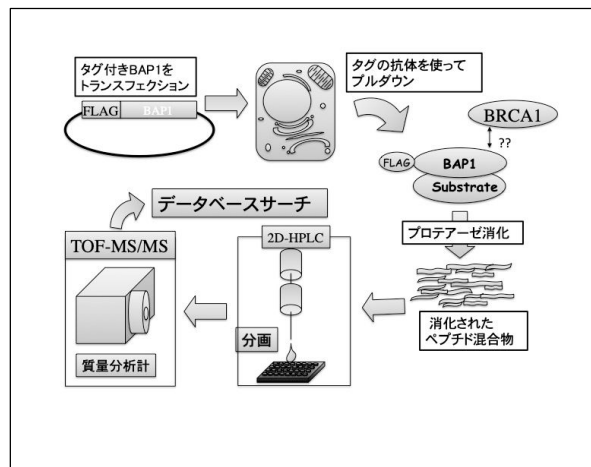
(3)DNA 修復での BAP1 の役割 RCA1,BARD1 複合体が Rad51 などと共に 2 本鎖 DNA 障害時における DNA 修復に必須な事が報告されている。

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 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。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。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。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。

予備実験結果、論文発表をふまえて本研究課題では BAP1 が DSB 後の DNA 修復でどのような役割を担っているか解明するのが目的である。

3. 研究の方法

BAP1 に結合する相互作用因子の同定 免疫沈降-液体クロマトグラフィ-タンデムマ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)を導入してタンパク質を発現させる。もしくは、研究代表者が受けた基盤研究(C)2014 年度～



2016 年度の研究成果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、放射線照射又は薬剤にて DSB をおこさせ又はコントロールとして DSB させていない細胞を溶解し BAP1 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した。作成したペプチドを LC-MS/MS にて分析し質量データを取得した。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した。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

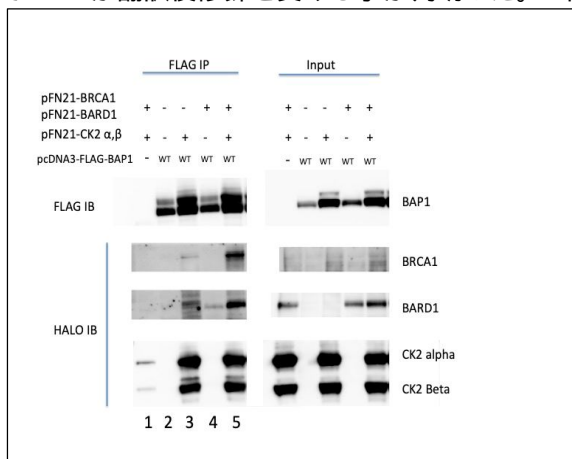
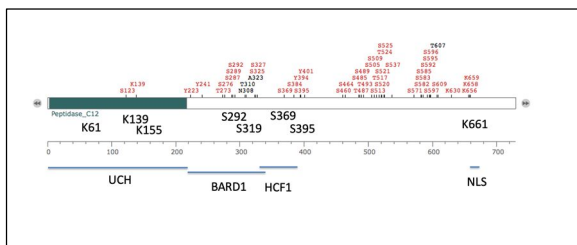
社の SCAFFOLD ソフトウェアにて特異的、非特異的なタンパク質の結合を見極める。タンパク質同士の結合を保ちながら核及び クロマチンタンパク質を可溶化する為に細胞溶解には 150mM 以下の塩濃度に調製した溶解液に低温下で機能するエンドヌクレアーゼ(ベンゾナーゼ)を用いた。同定された相互作用因子のパスウェイ解析相互作用のあったタンパク質を同定した後、SCAFFOLD ソフトウェアにて一覧、数値化して IPA ソフトウェアにて解析を行う。IPA での解析を行う事により質量分析で得られた大量複合データを、各種パスウェイにてどのようなタンパク質の変動があるかを網羅的に解析をこころみた。IPA ソ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検討した。

BAP1 に相互作用するタンパク質の機能を考慮し研究代表者が受けた基盤研究(C)2014 年度～2016 年度の研究成果である BAP1 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検討を行った。

また予備実験で DSB 後に BAP1 が集積する事を確認している為、細胞免疫染色法にて検討もおこなった。具体的には上流での BAP1 に対する相互作用因子の場合 siRNA や shRNA をトランスフェクションし、BAP1 の集積の変動を検討した。また、関わるパスウェイの阻害剤を用いて検討した。下流での相互作用因子の場合 BAP1 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相互作用因子や DSB の指標に用いられるヒストンのリン酸化 H2A.X や Rad51 の集積を検討した。

4. 研究成果

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)法を用いて様々な条件下で結合タンパク質の同定を試みた。BAP1 が DSB 時に複数のタンパク質と相互作用する事を解明した。BAP1 の上流で働く相互作用因子が同定された。BAP1 に対する翻訳後修飾に関わると予想されるのでDSB後の細胞溶解液をウエスタンブロッティング法にて検討、質量分析をこころみた。下流で働く相互作用因子であれば BAP1 の酵素活性が脱ユビキチン化である事からウエスタンブロッティング法にてユビキチン化の有無を検討した。また質量分析を行い、修飾部位の同定もこころみた。その中でも DNA ダメージ後に casein kinase 2(CK2)と結合する事で BAP1 が翻訳後修飾を受ける事が判明した。本研究課題ではこの点に注目して研究を進めた。



これまで研究及び解明してきた3点の蛋白質複合体が、どのように相互作用するか検討してみた。1. BRCA1, BARD1 複合体。2. BAP1。3. CK2A1alpha, CK2Beta 複合体。これらを培養細胞にて過剰発現させ免疫沈降をおこなった。CK2、非存在下では(レーン 4)BAP1、BARD1 複合体を形成し BRCA1、BARD1 複合体を阻害しているがCK2 を発現させる事で(レーン 5)発現させた全ての蛋白質が複合体を形成している事が観察された。CK2 を加える事で新たな複合体を観察出来たがキナーゼによるリン酸化が結合のシグナルなのか分子間相互作用にて BRCA1 と BAP1 を橋渡ししているのかは今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------