

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790939

研究課題名 (和文) 癌抑制遺伝子 BRCA1 の安定化因子 BAP1 の機能解析

研究課題名 (英文) A functional analysis of stabilizing factor BAP1 of cancer-restraining gene BRCA1

研究代表者

西川 裕之 (NISHIKAWA HIROYUKI)

聖マリアンナ医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・研究技術員

研究者番号：90387077

研究成果の概要 (和文) : BAP1 が BARD1 と結合することによって BRCA1/BARD1 の 2 量体形成を阻害し、E3 リガーゼ活性を失活させることを発見した。BAP1 は BARD1 にも結合することが分かった。BAP1 が BARD1 に結合し BRCA1/BARD1 複合体の形成を阻害する事が判明した。BAP1 は BRCA1/BARD1 の自己ユビキチン化を阻害した。また、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。酵素活性を失活させても BRCA1/BARD1 を阻害することから、BAP1 は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事を解明した。

研究成果の概要 (英文) : BAP1 interacts with BARD1.

BAP1 inhibits the E3 ligase activity of BRCA1 by interfering the BRCA1/BARD1 RING heterodimer formation.

BAP1 is capable of deubiquitinating BRCA1 autoubiquitinated.

BAP1 and BRCA1/BARD1 coordinately regulate ubiquitination during the DNA damage response and the cell cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：癌遺伝子

1. 研究開始当初の背景

家族性乳癌の原因遺伝子で癌抑制遺伝子である BRCA1 の機能は近年急速に明らかになりつつある。米国では変異を調べる遺伝子検査が 10 年前から一般に行われている。変異がある人は将来、5～8 割が乳癌になるとされている。同様に日本人でも研究段階ながら遺伝

子検査が有効とされている。しかし、BRCA1 遺伝子がどのようなメカニズムで癌を抑制しているのか、変異が起きることによって癌化する理由について不明な点は多い。

BRCA1 に結合するタンパク質も色々と解明されており、特に N 末端側にある RING Finger モチーフについては BARD1 と結合しヘテロダ

イマー型ユビキチンリガーゼとして機能する事が明らかになっている。同じく RING Finger に結合するタンパク質として BAP1 (BRCA1 associated protein 1) が同定されている (Oncogene Vol16, No9 p1097-1112, 1998)。BAP1 は BRCA1 のリングフィンガーモチーフに結合する事、脱ユビキチン化酵素である事がしかし BRCA1/BARD1 複合体に対して脱ユビキチン化しない事、乳癌細胞 (MCF7) で BRCA1 と共に一過性強発現させると成長抑制効果が 5 倍程度上がる事から癌抑制遺伝子として報告されている。

2. 研究の目的

(1) BAP1 の脱ユビキチン化機能の解明

Nat Struct Mol Biol. 2007 Vol14, N10p41-48 の論文を参考に、BRCA1/BARD1 を Lys-6, 48, 63 を介したポリユビキチン化させ BAP1 の脱ユビキチン化活性を解析する。これにより BAP1 の脱ユビキチン化機構が解明される。

(2) BAP1 の機能部位の解明

BRCA1/BARD1 が関わる細胞内機能について BAP1 がどの様に関わるか解析する。BRCA1 は様々な細胞内機能に関わっているが研究代表者が受けた平成 18 ~ 19 年度、文部科学省科学研究費補助金での結果を元に DNA 修復、細胞周期 (チェックポイント機構) に着目して機能解析を行う。これにより BAP1 の癌抑制遺伝子としての役割が解明される。

(3) BAP1 の BRCA1 に対する安定化の解明

平成 18 ~ 19 年度、文部科学省科学研究費補助金での結果から BAP1 が BRCA1 の安定化に深く関わる事が判明した。この結果を元に BAP1 が与える BRCA1 の安定化機構を解明する。上記実験の結果と合わせて BAP1 の癌抑制遺伝子としての役割が解明される。

3. 研究の方法

(1) BRCA1/BARD1/BAP1 の遺伝子を培養細胞内に過剰発現させた後

ウエスタンブローディング

ユビキチンアッセイを行った。

(2) shBAP1 を用いて培養細胞での

細胞周期の解析

IR の感受性試験を行った。

(3) BRCA1/BARD1/BAP1 の組換えタンパク質を作成し

GST プルダウンアッセイ

SPR 解析

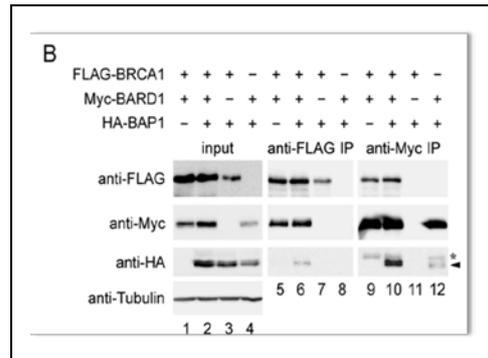
ユビキチンアッセイ

脱ユビキチン化アッセイを行い、BAP1 の機能を検討した。

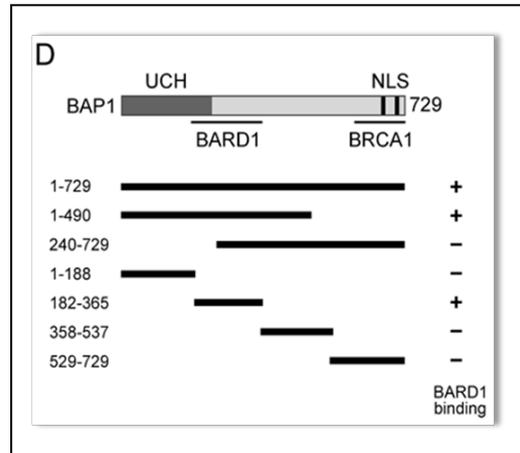
4. 研究成果

(1) BAP1 が BARD1 と結合することによって

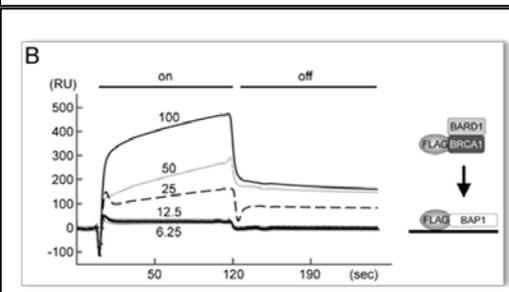
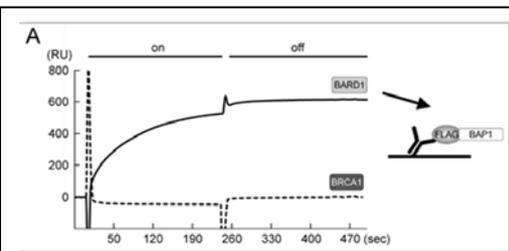
BRCA1/BARD1 の RING ヘテロダイマー形成を阻害し、E3 リガーゼ活性を死活化させることを発見した。

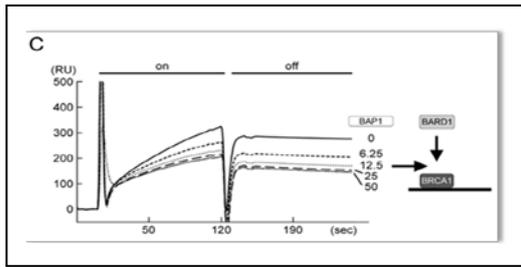


(2) BAP1 は BRCA1 だけでなくアミノ酸残基 182 - 365 を介して BARD1 の Ring Finger にも結合することが分かった。

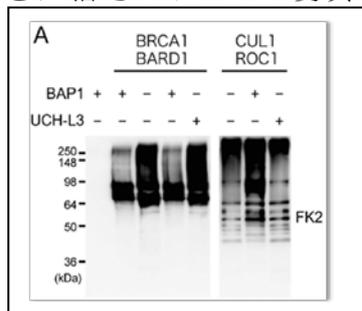


(3) BIAcore 解析、Pull Down 実験から BAP1 が BARD1 に結合することにより BRCA1/BARD1 複合体の形成を阻害する事が解明された。これにより BAP1 は BRCA1/BARD1 の自己ユビキチン化および基質である NPM1 のユビキチン化を阻害した。





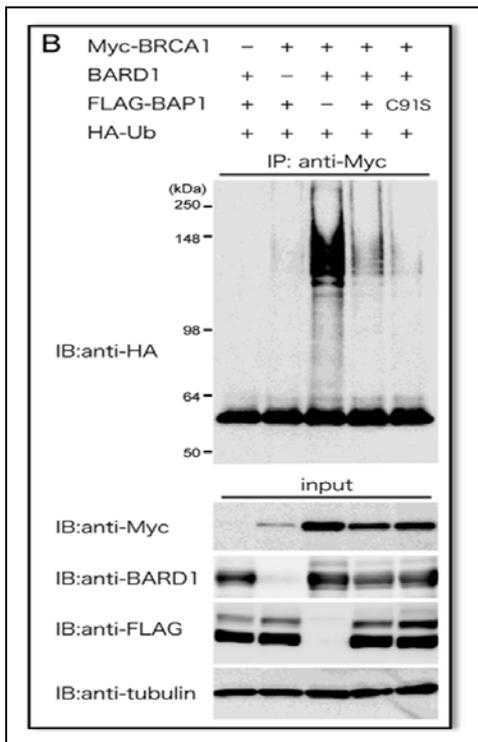
(4) *in vitro*においてBAP1はユビキチン化したBRCA1 (BRCA1/BARD1による自己ユビキチン化)を脱ユビキチン化したが、酵素活性を死滅させたC91S変異のBAP1でも



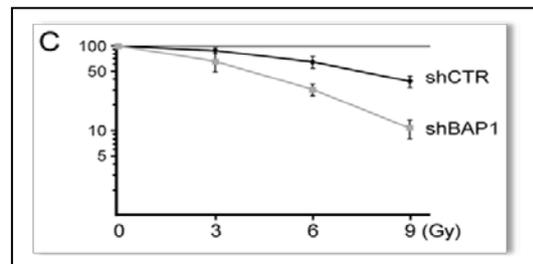
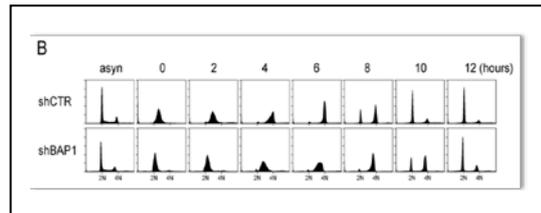
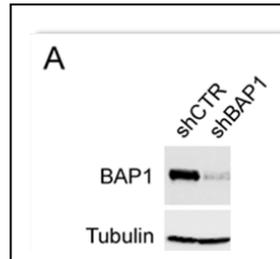
BRCA1/BARD1のE3活性を阻害することから、BAP1はE3活性の直接阻害と脱ユビキチン化の2つの機序で

BRCA1/BARD1によるユビキチン化を抑制する事が解明された。

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なく、新しいタンパク質複合体の発見となった。



(5) 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。

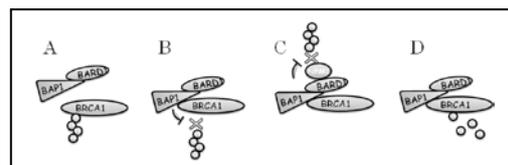


研究成果をまとめるとBAP1がBARD1と結合することによってBRCA1/BARD1のRINGヘテロダイマー形成を阻害し、E3リガーゼ活性を失活させることを発見した(下図-A)。

BAP1はBRCA1だけでなくアミノ酸残基182-365を介してBARD1のRing Fingerにも結合することが分かった。次にBAP1が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が判明した(下図2-A)。

これによりBAP1はBRCA1/BARD1の自己ユビキチン化および基質であるNPM1のユビキチン化を阻害した(下図2-B, C)。

また、*in vitro*においてBAP1はユビキチン化したBRCA1 (BRCA1/BARD1による自己ユビキチン化)を脱ユビキチン化することが分かった(下図2-D)。



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)

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

(1)Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates.

Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman AR, Ohta T.

Cancer Res. 2010 Sep 1;70(17):6746-56. 査読有り

(2)HERC2 is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation.

Wu W, Sato K, Koike A, Nishikawa H, Koizumi H, Venkitaraman AR, Ohta T.

Cancer Res. 2010 Aug 1;70(15):6384-92. Epub 2010 Jul 14. 査読有り

(3)BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity.

Nishikawa H, Wu W, Koike A, Kojima R, Gomi H, Fukuda M, Ohta T. Cancer Res. 2009 Jan 1;69(1):111-9. 査読有り

(4)Overexpression of heat shock protein 27 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a proteomic analysis using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Ono A, Kumai T, Koizumi H, Nishikawa H, Kobayashi S, Tadokoro M.

Hum Pathol. 2009 Jan;40(1):41-9. 査読有り

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 裕之 (NISHIKAWA HIROYUKI)

聖マリアンナ医科大学・医学 (系) 研究科
(研究院)・研究技術員

研究者番号 : 90387077

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

