

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32713
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：23791504
研究課題名(和文)BRCA1/BAP1複合体の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of BRCA1/BAP1 complex

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内におけるBAP1と結合するタンパク質の同定を行った。複数の細胞株を用意しFLAGタグ付きのBAP1タンパク質が発現するように遺伝子を導入した後に細胞がDNA損傷を起こすように薬剤又は放射線を照射し細胞を溶解しFLAG抗体にて免疫沈降を行い、プロテアーゼ処理をしてBAP1タンパク質に結合している相互作用因子をペプチド化した。このペプチドを2次元HPLCにて陽イオンカラムと逆相カラムを用いて分画してLC-MSにて分析を行った。51種類の相互作用因子を同定する事が出来た。本実験においてBAP1との相互作用因子としてヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング関連のタンパク質が複数見つかった。

研究成果の概要(英文)：I went to the identification of proteins that bind to the BAP1 in the cell. It was possible to identify the interaction factor of 51 types. Histone chaperone protein, the chromatin remodeling association was found as multiple interacting factors and BAP1 in this experiment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般 乳腺外科学

キーワード：癌抑制遺伝子

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が多い。本研究の目的は癌抑制遺伝子 BRCA1 及び BAP1 が DNA 損傷応答時にどのよう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つ抗癌剤の適応の指標となると考え研究を行った。

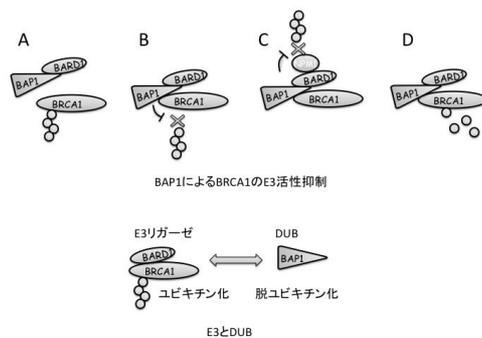
2. 研究の目的

乳癌及び卵巣癌の癌抑制因子 BRCA1 は BARD1 と RING Finger Domain を介して 2 量体を形成する。研究代表者は、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、それより以前の 1998 年に BRCA1 Associated Protein 1 (BAP1) は BRCA1 の RING Finger Domain と結合する UCH (脱ユビキチン化酵素) として同定されていた。しかしながら BAP1 が BRCA1/BARD1 の E3 活性にあたえる影響は不明であった。研究代表者は平成 18~19 年度及び 20~22 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。

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。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。(図 1A) 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。(図 1B,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。(図 1D) また酵素活性を失活させた 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。

図 1



ショウジョウバエを用いた研究では、ヒトの BAP1 をコードする特徴が明らかにされていないショウジョウバエ PcG 遺伝子 *calypso* が生化学的に精製した Calypso は PcG タンパク質 ASX を含む複合体に存在しており、Polycomb 抑制脱ユビキチン化酵素 (PR-DUB) と命名されたこの複合体は、ショウジョウバエの PcG 標的遺伝子に結合する。構成したショウジョウバエとヒトの組み換え PR-DUB 複合体は、ヌクレオソームの H2A からモノユビキチンを除去するが、H2B からはしない。PR-DUB を欠失したショウジョウバエ複合体

では、モノユビキチン化 H2A レベルの強い上昇がみられる。Calypso の触媒活性を破壊する変異や ASX サブユニットの欠失では、*in vitro* で H2A の脱ユビキチン化の消失が、*in vivo* で HOX 遺伝子抑制解除がみられる。したがって Polycomb 遺伝子抑制により、PRC1 と dRAF による H2A ユビキチン化と、PR-DUB による H2A 脱ユビキチン化の間の動的なバランスがとられている事が示唆された。以上の実験結果、論文発表を踏まえて本研究課題では E3/DUB 複合体という特異的な形態が DNA 修復でどの様な役割を担っているか解明する。具体的には

(1) BAP 1 の基質 (脱ユビキチン化する相手) の同定

IP-LC-MS/MS 及び SPR - LC-MS/MS にて網羅的に BAP1 結合タンパクを同定する

(2) DNA 相同組換え修復時の役割を解明

DNA 障害時のコメットアッセイ、感受性試験、蛍光免疫染色にて BAP1 の役割を解明

3 . 研究の方法

(1) DNA 損傷時に BAP 1 が何を脱ユビキチン化するか、又はしなくなるかを検討する。免疫沈降法、又は SPR (分子間相互作用) 法と LC-MS/MS を組み合わせて検討を行った。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う (図 3)。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、DNA 損傷をおこさせた後に細胞を溶解し 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を行

い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) を用いる。

(2) DNA 相同組換え修復における BAP1 の役割を解明する。コメットアッセイ、感受性試験、免疫染色による蛍光観察を行い DNA 修復を観察して BAP1 の役割を解明する。

コメットアッセイ

培養細胞にて内在性 BAP1 を減少又は消失させた状態で DNA 障害を起こしコメットアッセイにて DNA 切断を修復するのか検討する。siRNA, shRNA 安定発現細胞, BAP1-NuII 細胞を用いて内在性 BAP1 の減少又は消失条件を作成し IR、抗癌剤で DNA 障害を作成する。BAP1 による脱ユビキチン化が DNA 修復に直接作用するか検討する。

DNA 障害感受性試験

培養細胞を用いて上記 1 のコメットアッセイと同様に BAP1 減少又は消失条件下での DNA 障害後の細胞生存率を測定する。測定は BIORAD 社の CellTiter Blue を使用して蛍光測定を行う。

免疫染色

及び と同じく培養細胞を用い、同一条件下で蛍光免疫染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行う。すでに発表のある H2AX, BRCA1, PolyUbiquitin, Rad51 などの DNA 障害に反応のあるタンパク質を染色して DNA 損傷部位での集合を観察する。

ルシフェラーゼアッセイ

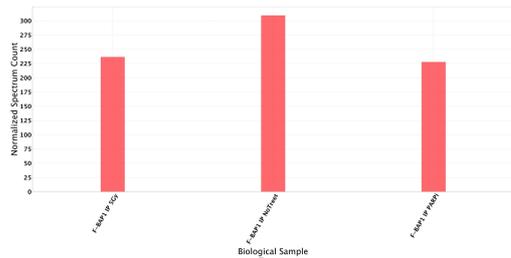
BAP1 が転写に関わるかルシフェラーゼアッセイを用いて検討する。23 年度での BAP1 結合タンパク質が転写関連のタンパク質であ

ればその結合プロモーターを用いる。

4. 研究成果

研究計画に従って、細胞内における BAP1 と結合するタンパク質の同定を行った。複数の細胞株を用意し FLAG タグ付きの BAP1 タンパク質が発現するように遺伝子を導入した後細胞が DNA 損傷を起こすように薬剤又は放射線を照射し細胞を溶解し FLAG 抗体にて免疫沈降を行い、プロテアーゼ処理をして BAP1 タンパク質に結合している相互作用因子をペプチド化した。このペプチドを 2 次元 HPLC にて陽イオンカラムと逆相カラムを用いて、40 分画にして LC-MS にて分析を行った。まず過剰発現した BAP1 の同定率から実験系が正しく機能しているか判断しコントロール、薬剤、放射線の 3 サンプルが正しく測定されている事を確認した。(図 2)

図 2



同定されたタンパク質は 51 種類になり、細胞内局在、生化学的な区分、分子生物学的な区分を行った。(図 3)

結果 DNA 損傷を起こす前後にて BAP1 との結合が変化するタンパク質を複数発見する事が出来た。細胞内では DNA 損傷を認識し損傷部位のクロマチン構造を変換する事により DNA 修復課程を進行させると考えられている。本実験において BAP1 との相互作用因子としてヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング関連のタンパク質が複数見つかった。(図 4) BAP1 が DNA 損傷応答時においてヒストンシャペロンと作用する事において DNA 修復を行っている事が示唆された。

図 3

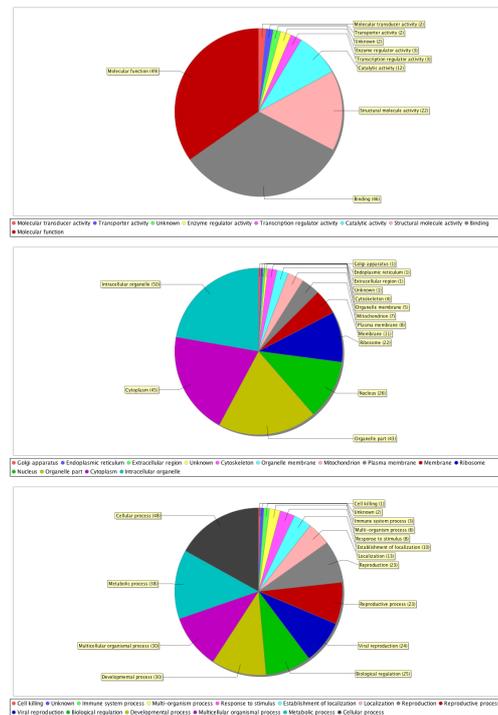


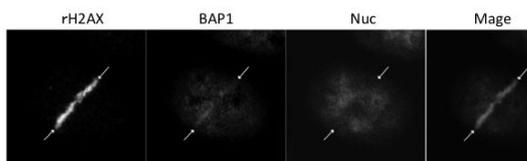
図 4

Accession Number	Protein Name	Molecular Weight	Protein Counting Abundance	P-BAP1 IP-Pre-IR	P-BAP1 IP-Post-IR
BAP1_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1	80 kDa	1310	1228	1228
HPFY1_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1A	70 kDa	882	849	855
HPFY2_HUMAN	Heat shock cognate 70 kDa protein	71 kDa	262	232	235
TBS1_HUMAN	Tubulin beta chain	50 kDa	145	144	143
CIQBP_HUMAN	Complement component 1Q subcomponent-binding protein	31 kDa	140	139	138
UBQ1_HUMAN	Ubiquitin	7 kDa	130	129	127
TUBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	50 kDa	70	70	70
MAP1C_HUMAN	Microtubule-associated protein 1C	45 kDa	397	384	387
CEP350_HUMAN	Centrosomal protein 350 kDa	209 kDa	182	182	181
CRP75_HUMAN	Stress-70 protein	74 kDa	151	151	151
HSPA9A_HUMAN	Heat shock protein 90-alpha class B	85 kDa	51	51	51
FOXP1_HUMAN	Forkhead box protein P1	75 kDa	31	31	31
ADPT2_HUMAN	ADP/ATP translocase 2	33 kDa	27	27	27
CNKB1_HUMAN	Casitin kinase 1	25 kDa	22	22	22
LRB_HUMAN	Lamin-B receptor	71 kDa	22	22	22
ROSL_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	39 kDa	22	22	22
HD2A_HUMAN	Histone H2A type 1-E1	14 kDa	2	2	2
CDKN2A_HUMAN	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	18 kDa	2	2	2
CNK2_HUMAN	Casitin kinase 2	45 kDa	2	2	2
RPS15_HUMAN	40S ribosomal protein S15	17 kDa	2	2	2
MAP1A_HUMAN	Microtubule-associated protein 1A	43 kDa	2	2	2
RS4_HUMAN	40S ribosomal protein S4	16 kDa	1	1	1
RSL1_HUMAN	40S ribosomal protein S18	16 kDa	1	1	1
RSL2_HUMAN	40S ribosomal protein S16	16 kDa	1	1	1
COPA_HUMAN	Coxsackie virus A24 capsid protein	130 kDa	1	1	1
RPL23_HUMAN	Phosphoglycerate kinase	40 kDa	1	1	1
RPS1_HUMAN	40S ribosomal protein S19	27 kDa	1	1	1
RPS14_HUMAN	40S ribosomal protein S18	23 kDa	1	1	1
RPL2_HUMAN	60S ribosomal protein L2	18 kDa	1	1	1
ANKK1_HUMAN	Protein arginine N-methyltransferase 5	73 kDa	1	1	1
RPS12_HUMAN	40S ribosomal protein S12	15 kDa	1	1	1
RPL26_HUMAN	60S ribosomal protein L26	17 kDa	1	1	1
RPS19_HUMAN	40S ribosomal protein S19	18 kDa	1	1	1
RPS23_HUMAN	40S ribosomal protein S23	14 kDa	1	1	1
RPS18_HUMAN	40S ribosomal protein S18	16 kDa	1	1	1
RPS2_HUMAN	40S ribosomal protein S2	31 kDa	1	1	1
CNK22_HUMAN	Casitin kinase 2	41 kDa	1	1	1
RPL21_HUMAN	60S ribosomal protein L21	19 kDa	1	1	1
RPS11_HUMAN	40S ribosomal protein S11	18 kDa	1	1	1
RPL2A_HUMAN	60S ribosomal protein L2A	30 kDa	1	1	1
PCAN5_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase PCAN5	32 kDa	1	1	1
RS24_HUMAN	40S ribosomal protein S24	15 kDa	1	1	1
RPS_HUMAN	40S ribosomal protein S0	24 kDa	1	1	1
RSL_HUMAN	40S ribosomal protein S0	22 kDa	1	1	1
RIL2_HUMAN	Histone H2L2	21 kDa	1	1	1

細胞免疫染色を行い、BAP1 と質量分析にて同定された相互作用因子を染色し変化を観察した。BAP1 タンパク質が複数の因子と共存することが観察された。(図 5)

また、DNA 損傷を与えてから BAP1 タンパク質の集積や共局在の時間が各々違う事からクロマチンリモデリング関連の相互作用因子と結合し様々な役割を担っていると考えられる。

図 5



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 3件)

A DNA-Damage Selective Role for BRCA1 E3 Ligase in Claspin Ubiquitylation, CHK1 Activation, and DNA Repair. Sato K, Sundaramoorthy E, Rajendra E, Hattori H, Jeyasekharan AD, Ayoub N, Schiess R, Aebersold R, Nishikawa H, Sedukhina AS, Wada H, Ohta T, Venkitaraman AR. *Curr Biol*. 22:1659-66, 2012. 査読有り

DNA 相同組換え修復と乳癌 太田智彦、西川裕之
メディカルサイエンスダイジェスト Vol138(1)2012 637-640. 査読有り

HERC2 Interacts with Claspin and regulates DNA origin firing and replication fork progression. Izawa N, Wu W, Sato K, Nishikawa H, Kato A, Boku N, Itoh F, Ohta T. *Cancer Res*. 71:5621-5, 2011. 査読有り

〔学会発表〕(計 1件)

EMBO Workshop・The Interface between the Ubiquitin Family and the DNA Damage Response:「Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates」
Ayaka Koike, Hiroyuki Nishikawa, Wenwen Wu, Yukinori Okada, Ashok R Venkitaraman, Tomohiko Ohta. Sep, 2011. Rovinj, Croatia

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

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

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: