

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460402

研究課題名(和文) BRCA1を介した高次クロマチン構造に特異的なDNA損傷修復の解析

研究課題名(英文) The Feature of BRCA1 function on DNA Damage Repair within higher-order chromatin structure

研究代表者

呉 文文 (Wu, Wenwen)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：10434408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： BRCA1-A複合体と拮抗してDNA二本鎖切断の相同組換え修復(HDR)を遂行するBRCA1がBARD1/HP1結合(BRCA1-H複合体)を介して、ヘテロクロマチンDSB局所に集積する。BRCA1-H複合体の形成にはATM依存的で、ヒストンH3Lys9のジメチル化(H3K9me2)も必要。ヒストンメチル基転移酵素阻害剤(HKMTi)によるH3K9me2の阻害は、BRCA1のDSB局所への集積を阻害し、癌細胞のPARP阻害剤に対する感受性を亢進させる。BRCA1-B複合体およびBRCA1-C複合体の形成にもBRCA1-H複合体の形成に依存し、ヘテロクロマチン領域のDNA修復に司る。

研究成果の概要(英文)： Stable retention of the BRCA1/BARD1 complex at sites of DNA damage is required for a proper response to DNA double-strand breaks. In this study, we found that the BRCT domain of BARD1 is also required for the retention of the complex at damaged sites through its interaction with HP1. In response to DNA damage, BARD1 interacts with Lys9-dimethylated histone H3 (H3K9me2) in an ATM-dependent manner. This interaction is mediated by HP1. A conserved HP1-binding motif in the BARD1 BRCT domain directly interacts with the chromoshadow domain of HP1; mutations in this motif disturb the retention of BRCA1/BARD1 at damaged loci. The histone lysine methyltransferase (HKMT) inhibitors abolish this retention and demonstrated synergetic inhibition of clonogenic cell growth with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor olaparib. FANCD1 and CtIP localize at DSB sites through BARD1-HP1 interaction. In conclusion, HP1 regulates HR through retention of FANCD1 and CtIP, mediated by BRCA1/BARD1.

研究分野：病態医化学

キーワード：BRCA1 FANCD1 CtIP HP1 H3K9me2 HKMTi PARPi

### 1. 研究開始当初の背景

BRCA1 は DSB に対する相同組換え修復で必須の役割を果たしており、その機能不全は乳癌および卵巣癌の原因となると同時に PARP 阻害剤等による合成致死性を利用した化学療法の標的としても重要である。精力的な解析により、BRCA1 が DSB 局所に集積するメカニズムは明らかになりつつある。Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体が DSB を検知して ATM を活性化、ATM によって DSB 局所のヒストン H2AX がリン酸化され、これに結合した MDC1 をさらに ATM がリン酸化する。リン酸化した MDC1 にユビキチンリガーゼ (E3) である RNF8 が結合し、RNF8-Ubc13(E2) および RNF168 によりヒストン H2A の Lys(K)13-15 残基がポリユビキチン化される。このポリユビキチン鎖を UIM (ubiquitin interacting motif) を有する RAP80 が認識し、RAP80-ABRA1-BRCA1 複合体がリクルートされる。このように非常に複雑なメカニズムによって BRCA1 がリクルートされると考えられているが、BRCA1 をリクルートするメカニズムはこれだけではない。BRCA1 は N 末端の RING フィンガードドメインを介して BARD1 と RING 二量体型の E3 を形成するとともに C 末端の BRCT ドメインを介してリン酸化特異的に 3 つの異なった蛋白質、すなわち前述の ABRA1 と、BACH および CtIP と結合し BRCA1-A、-B、および -C 複合体を形成する。BRCA1-A 複合体が上述 RAP80-ABRA1-BRCA1 経路に DSB にリクルートされるのに対して BRCA1-B 複合体と -C 複合体が DSB にリクルートされる経路は未だに明らかにされていない。一方、ATM はヘテロクロマチン領域における DSB 修復には必須であるが、ユークロマチン領域の DSB 修復には必要ない。すなわち、損傷後後期に ATM 依存的に集積する BRCA1 複合体はヘテロクロマチンに特化した役割を果たしている可能性が考えられる。申請者は上述の RAP80 とユビキチン鎖の結合に加え、BRCA1-BARD1 が DNA

損傷後後期に集積するために必須な BARD1 とヘテロクロマチンプロテイン 1 (HP1) を介した新規メカニズムを発見した。本研究ではこの新規の結合が、BRCA1 三つの複合体がヘテロクロマチン領域に特化した役割にどう関わっているかを検討する。

### 2. 研究の目的

家族性乳癌および卵巣癌の原因遺伝子産物である BRCA1 は、ATM 依存的に生じる DNA 損傷周囲クロマチンのヒストン H2A のポリユビキチン化を介して DSB 局所へ集積することがよく知られている。ATM はヘテロクロマチン領域での DSB 修復には必須とされる一方、ユークロマチン領域の DSB 修復には必要ないとされている。これに関連して最近申請者らは BRCA1 の DSB 局所への集積にヘテロクロマチン蛋白質が必須の役割を果たしていることを見出した。そこで本研究では、この機能の中で重要な役割を果たしている BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1) を中心に、クロマチンの高次構造に特異的な BRCA1 を介した相同組換え修復メカニズムを解析する。

### 3. 研究の方法

免疫沈降法を用いた BRCA1/BARD1 ユークロマチン領域とヘテロクロマチン領域における DNA 損傷部位集積の検討：クロマチン分画を溶解し、BRCA1/BARD1 抗体を用いた免疫沈降を行い、ユークロマチン領域及びヘテロクロマチン領域における特異的な蛋白質との結合を検討し、DNA 損傷前後のサンプルを比較解析した。

shRNA にて内因性野生型蛋白質の発現を抑制すると変異体を発現させる add-back 実験が行えるよう、BARD1 に対する shRNA 配列が組み込まれる CS-Rfa-ETB ベクターと HP1 と結合しない EGFP タグ付きの BARD1 変異体を組み込んだ CSIV-TRE-Rfa ベクターを構築し、レンチウイルスを作製して、同時に細胞を感染させ、その安定発現細胞株を樹立した。樹立した細胞が doxycyclin 添加により野生型と変異体の発現が入れ替わることを RT-PCR およびウェスタンブロットにて確認し、いずれもコントロールとして野生型も作成した。

上記 BARD1 変異細胞を用いて IR 照射ない

しレーザーマイクロ照射を行い、DSB 後に BACH1 および CtIP が DSB 局所に集積することを蛍光免疫染色にて、BRCA1 と BACH1 および CtIP が結合していることを免疫沈降-ウェスタンブロットにて解析した。ABRA1-RAP80 の集積が阻害されるか否かについても解析を行った。

*invitro* ユビキチン化反応実験系の再構築し、BRCA1/BARD1 に依存するユビキチン反応基質を検討した。

BARD1 変異細胞の PARP 阻害剤や、DNA 架橋剤、放射線およびヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害薬に対する薬剤感受性を Clonogenic survival アッセイにて解析した。

#### 4. 研究成果

BRCA1-A 複合体と拮抗して DNA 二本鎖切断の相同組換え修復(HDR)を遂行する BRCA1 が BARD1/HP1 結合 (BRCA1-H 複合体)を介して、ヘテロクロマチン DSB 局所に集積することを明らかにした。この複合体の集積にはヒストン H3Lys9 ジメチル化 (H3K9me2) が必要であり、ヒストンメチル基転移酵素阻害剤 (HKMTi) による H3K9me2 の阻害は、BRCA1 の DSB 局所への集積を阻害し、癌細胞の PARP 阻害剤に対する感受性を亢進させたことを発見し、癌治療へ新しいアプローチ方法を提示することができた。

また、BRCA1-B 複合体および BRCA1-C 複合体の形成も BRCA1-H 複合体の形成に依存し、ヘテロクロマチン領域の DNA 修復に司っていることを本研究によって明らかにし、今まで明らかにされていなかった BRCA1-B 複合体と -C 複合体の DSB 局所へのリクルートメカニズムに新しい知見を得た。

DNA 損傷後、BRCA1 は BARD1 を介して Lys9 ジメチル化ヒストン H3 (H3K9me2) の結合が誘発され、BRCA1/BARD1/H3K9me2 複合体が形成され、BRCA1/BARD1 がヘテロクロマチン領域の DSB 局所へ集積した。BRCA1/BARD1/H3K9me2 複合体の形成は、BARD1 とヘテロクロマチン蛋白質(HP1)の直接結合に依存しており、BARD1 と H3K9me2 の結合は

HP1 を介したものであった。

BARD1/HP1 の結合は、BARD1 の BRCT ドメインに存在する PxVxL モチーフと HP1 の Chromoshadow ドメイン間で起き、PxVxL モチーフの変異体である PEELI 及び PAALI では BARD1/HP1 の結合が阻害された。PEELI と PAALI 変異体は DSB 局所への集積も阻害された。

Doxycyclin 誘導 shRNA による内因性 BARD1 の抑制と同時に BARD1 のミスセンス変異体の安定発現細胞株を用いて解析では、BRCA1 の DSB 局所への集積も BARD1/HP1 の結合に依存していた。

BARD1/HP1 の結合は ATM に依存し、RNF8/RNF168 ユビキチン化パスウェイに依存せず、非相同末端連結 DNA 修復(NHEJ)を抑止すると同時に HDR を促進した。

BARD1/HP1 の結合阻害や、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 UCN0638 による H3K9me2 の抑制で、BRCA1/BARD1 の DSB 局所への集積が阻害され、癌細胞の PARP 阻害剤に対する感受性を亢進させた。

BACH1 は BARD1/HP1 の結合に依存的に HP1 と結合し、DSB 局所へ集積した。CtIP の DSB 局所への集積は BARD1/HP1 の結合に依存的であった。

ヘテロクロマチン蛋白質 (HP1) は BRCA1/BARD1 によってユビキチン化された。

#### 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)

[雑誌論文](計 6件)

1. HP1 regulates the localization of FANCD1 at sites of DNA double-strand breaks. Wu W, Togashi Y, Johmura Y, Miyoshi Y, Nobuoka S, Nakanishi M, Ohta T. Cancer Sci. 107:1406-1415, 2016(査読あり)
2. Liganded ERα stimulates the E3 ubiquitin ligase activity of UBE3C to facilitate cell

- proliferation. Okada M, Ohtake F, Nishikawa H, Wu W, Saeki Y, Takana K, Ohta T. Mol Endocrinol. 29:1646-1657, 2015(査読あり)
3. The BARD1/HP1 interaction: another clue about heterochromatin involvement in homologous recombination. Fukuda T, Tsuruga T, Kuroda T, Takeuchi J, Wu W, Ohta T. Molecular & Cellular Oncology. 2:e1-e7, 2015(査読あり)
  4. Interaction of BARD1 and HP1 Is Required for BRCA1 Retention at Sites of DNA Damage. Wu W, Nishikawa H, Fukuda T, Vittal V, Asano M, Miyoshi Y, Klevit RE, Ohta T. Cancer Res. 75:1311-1321, 2015(査読あり)
  5. Class I histone deacetylase inhibitors inhibit the retention of BRCA1 and 53BP1 at the site of DNA damage. Fukuda T, Wu W, Okada M, Maeda I, Kojima Y, Hayami R, Miyoshi Y, Tsugawa K, Ohta T. Cancer Sci. 106:1050-1056, 2015(査読あり)
  6. MED12 exon 2 mutations in phyllodes tumors of the breast. Nagasawa S, Maeda I, Fukuda T, Wu W, Hayami R, Kojima Y, Tsugawa KI, Ohta T. Cancer Med. 4:1117-1121, 2015(査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

1. 呉 文文 HERC2 による姉妹染色分体交換とグアニン四量体の抑制 2016年11月16日平成28年度「ユビキチン制御」班会議 札幌
2. 呉 文文 ユビキチンリガーゼ HERC2 と RecQ ヘリガーゼ BLM の相互作用 2015年11月16日平成27年度「ユビキチン制御」班会議 南房総
3. 呉 文文 ヒストンメチル化を介した BRCA1 による相同組換え修復機構 2015年7月2日 第二十三回日本乳癌学術総会 東京
4. 呉 文文 ヒストン H3 ジメチル化を

介して DNA 損傷部位へ集積する BRCA1 は RNF168 ユビキチン経路と拮抗する 2014年12月3日平成26年度「ユビキチン制御」班会議 蒲郡

5. Wu Wenwen BRCA1/BARD1 retention at sites of DNA damage through HP1 gamma interaction with BRCT domain of BARD1 2014年8月30日 FEBSEMBO 2014 Pairs

〔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

<http://www.marianna-u.ac.jp/t-oncology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉 文文 (WU WENWEN)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師  
 研究者番号：10434408