

研究報告書

一般課題：A

(平成27年度)

平成29年 4月 5日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 東北大学 加齢医学研究所

住所 宮城県仙台市青葉区星陵町4-1

研究者氏名 吉野 優樹



(研究課題)

BRCA1 の中心体トラフィッキング制御異常による染色体不安定性の誘導機構と発がん

平成28年 3月 1日付助成金交付のあった標記一般課題:Aについて研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【背景と目的】

乳がんは日本人女性において最も罹患率の高い癌腫である。BRCA1は遺伝性乳がん・卵巣がん症候群の原因であるとともに、散発性の難治性乳がんの発がんにも重要な役割をもつ。現在までにBRCA1の多様な機能が示されているが、がん抑制機構には未解明な部分も多い。最近、申請者の所属する研究室で、BRCA1と複合体を形成する新規分子としてOLA1を同定し、これが中心体の複製に関わる事を報告した(Matsuzawa et al. *Mol Cell*, 2014)。中心体は、分裂期に紡錘体極となり娘細胞への均等な染色体分配を担う細胞内小器官である。また、新規OLA1結合分子を同定したところ(未発表のためBRCA1-interacting protein 2, BIP2と表記)、BIP2も中心体に局在し、BRCA1にも直接結合した。これまでの解析により、BRCA1やOLA1のノックダウンにより中心体の過剰複製が起こることが明らかになっている。また、BIP2の過剰発現が、乳がん細胞株においてBRCA1との相互作用依存性に中心体数の異常増加を生じる事も明らかになった。さらに、BIP2との相互作用が消失するがん由来のBRCA1変異体は中心体への局在が減弱し、一方、がん由来のBIP2変異体にはBRCA1との結合能が異常に亢進するものがあつた(未発表)。以上より、中心体制御を司るBRCA1/OLA1複合体の中心体へのトラフィッキングにおいて、BIP2が重要な機能を担っており、この機能破綻が染色体分配の異常の原因となる中心体の異常増加をもたらす、さらに染色体不安定性の誘導による発がんへと繋がるのではないかと考えられた。

本研究では、BIP2によるBRCA1/OLA1複合体の中心体トラフィッキングの制御機構を解析し、BRCA1のがん制御能の新規機構を明らかにすると共に、BRCA1関連乳がんに対して、中心体制御機構への介入という新しい乳がん治療法開発のための分子基盤を築くことを目的とする。

【方法】

- 1) 中心体局在の減弱するBRCA1変異体の中心体制御能を解析するため、MCF7細胞にBIP2およびBRCA1を共発現させ、免疫細胞染色で中心体数に異常のある細胞の割合を評価した。
- 2) BIP2の過剰発現によるBRCA1の中心体局在の変化を調べるため、MCF7およびHeLa細胞にBIP2を過剰発現させ、免疫細胞染色で中心体に局在するBRCA1の輝度の変化を評価した。
- 3) BIP2欠乏状態におけるBRCA1の中心体局在を調べるため、RNAiによってBIP2を発現低下させ、免疫細胞染色にてBRCA1の中心体局在を評価した。
- 4) BIP2変異の発がんにおける意義を調べるため、がんで報告されているBIP2点変異体発現ベクターを作製し、それらの過剰発現による中心体数の変化を免疫細胞染色で評価した。

【結果】

- 1) MCF7細胞において、BIP2単独の過剰発現は中心体増幅を認める細胞の増加を引き起こした。野生型BRCA1をBIP2と共発現させると、中心体増幅を認める細胞の割合はBIP2単独発現の場合と比較して低減した。一方、BIP2との結合能および中心体局在が減弱するBRCA1変異体を共発現させた場合、中心体増幅の抑制効果が減弱した。
- 2) BIP2を過剰発現すると、HeLaおよびMCF7の両細胞において、G2期特異的に中心体のBRCA1局在が増強した。
- 3) siRNAをトランスフェクションし、BIP2をノックダウンしたところ、BRCA1の中心体局在には有意な変化を認めなかった。BIP2をノックダウンした細胞において、全細胞抽出液ではBIP2の発現量の低下を認めたが、中心体画分においてはBIP2の発現量は十分に低下しなかった。
- 4) COSMICデータベースに登録されているBIP2の体細胞変異から11変異を選択し、変異体発現ベクターを作製した。これらをMCF7細胞に導入し、過剰発現させたところ、6変異体では中心体増幅を認める細胞は野生型と比較して低減していた。

【考察】

本研究によってBIP2の過剰発現によって細胞周期特異的にBRCA1の中心体局在が増強することが明らかとなった。既にこれまでの研究でBIP2との相互作用が減弱するBRCA1の点変異

体は中心体局在が減弱する事を明らかにしている。これらから、BIP2がBRCA1の中心体局在を正に制御していると考えられた。また、BRCA1の中心体への局在およびBIP2との相互作用がBRCA1の中心体制御能に重要であることが示唆された。一方、BIP2のノックダウンではBRCA1の中心体局在は変化しなかったが、中心体画分におけるBIP2の十分な発現量の低下が得られなかったことが原因の1つと考えられる。従って、より強力にBIP2の発現を低下させる手段が必要と考えられ、現在Auxin-induced degron(AID)法を用いた内在性BIP2の分解を行える細胞の樹立を試みている。また、がんで報告された複数のBIP2の体細胞変異によって、BIP2の中心体制御能が低下することが明らかとなり、発がんへの関与が示唆された。今後はAID法による内在性BIP2の除去と変異体の強制発現を組み合わせ、BIP2変異による中心体複製系の異常の誘導、およびBRCA1の中心体局在への影響を評価していく予定である。

【学会発表】

1. 吉野優樹、齋匯成、石岡千加史、安井明、千葉奈津子. 中心体制御因子としての新規BRCA1結合因子BIP2の同定. 第75回日本癌学会学術総会 2016/10/8 神奈川・横浜
2. 齋匯成、吉野優樹、石岡千加史、千葉奈津子. 新規中心体タンパク質BIP2はBRCA1の中心体局在と発がん機構に關与する. 第75回日本癌学会学術総会 2016/10/8 神奈川・横浜
3. 吉野優樹、齋匯成、菅股眞美、安井明、千葉奈津子. 新規中心体タンパク質BIP2はBRCA1依存性に中心体数を制御する. 第89回日本生化学大会 2016/9/27 宮城・仙台
4. 新藤一葉、吉野優樹、齋匯成、菅股眞美、早坂美月、千葉奈津子. 新規中心体タンパク質BIP2はBRCA1の中心体局在制御に關与する. 第89回日本生化学大会 2016/9/27 宮城・仙台

【謝辞】

本研究の遂行にあたり多大なるご支援を賜りました、公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。