

BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御能と発がん

東北大学加齢医学研究所 腫瘍生物学分野

千葉 奈津子

1. 目的

*Breast Cancer gene 1 (BRCA1)*はその生殖細胞系列変異により、遺伝性乳がん・卵巣がん症候群を引き起こすがん抑制遺伝子である。散発性がんでは、BRCA1の発現の減少が報告されており、近年は難治性乳がんであるトリプルネガティブ乳がんとの関連も明らかになっている。BRCA1はBRCA1-associated RING domain 1 (BARD1)とヘテロダイマーを形成し、DNA修復、中心体制御、転写制御、クロマチンリモデリングなど、細胞内の様々な機能に関与する(参考文献1, 2)。

我々がBARD1の結合分子として同定したObg-like ATPase 1 (OLA1)は、間期に細胞質と中心体に、分裂期には紡錘体極に局在し(図1)、BRCA1のN末端、BARD1のC末端、中心体の主要構成因子である γ -tubulinと直接結合し、図2Aのような複合体を形成していることが示された。

OLA1の発現抑制は、中心体の複製異常と断片化を引き起こし、染色体分配の異常によるがんの特徴的なゲノム不安定性の原因となる中心体数の増加を引き起こした(参考文献3, 4, 5)。

本研究では、OLA1と我々が同定したOLA1の新規結合分子BRCA1/OLA1-interacting protein (BIP)の中心体制御能とその機能の破綻による発がんメカニズムを解明することを目的とし、細胞学的、生化学的解析に加えて、ノックアウトマウスで個体レベルでも解析し、さらに臨床検体を用いてOLA1の遺伝子異常の有無についても解析した。

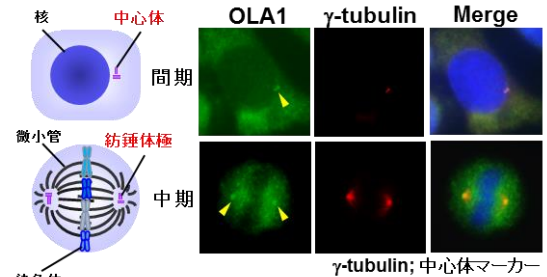


図1 内在性OLA1の細胞内局在

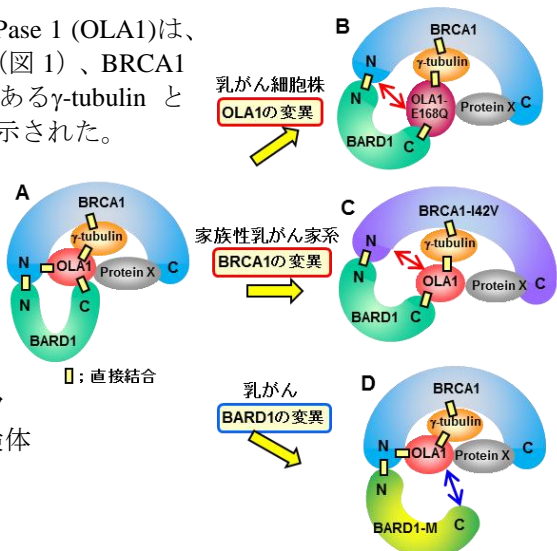


図2 がんで見られる異常による複合体の異常

2. 方法

①BARD1、OLA1、BIP、BRCA1の細胞学的、生化学的解析

BARD1、OLA1、BIP、BRCA1の発現ベクターを作製した。OLA1、BARD1、BRCA1の変異体は、site-directed mutagenesisにて作製した。免疫沈降は、HEK-293T細胞にこれらのベクターを導入し、Protein G ビーズを用いて行った。Pull-down アッセイは、大腸菌でGSTあるいはHis タグを付加した精製タンパク質を調整し、グルタチオンビーズを用いて行った。

OLA1、BARD1の中心体局在や強制発現の影響は、HA タグを付加した発現ベクターをHs578T細胞に導入し、抗HA抗体、抗 γ -tubulin抗体で二重免疫染色を行い、抗HA抗体で染色される細胞で、中心体への共局在や中心体数を解析した。

②OLA1のコンディショナルノックアウトマウスの作製とその解析

OLA1分子は酵母から哺乳類まで保存されており、生命活動に必須で重要な働きをしていることが想定される。また、BRCA1やBARD1の通常のノックアウトマウスは致死となることが既に報告されている。加えて、OLA1の中心体での重要な機能から、通常のノックアウトマウスは致死となる可能性が高いと考え、コンディショナルノックアウトマウスを作成した。全身でOLA1をノックアウトした状態での影響を解析するため、全身でCreを発現するCAG-Creマウスと交配し、その影響を解析した。

③家族性乳がんにおけるOLA1遺伝子変異の解析

24例のBRCA1、BRCA2遺伝子変異のない遺伝性乳がん・卵巣がん患者の白血球由来のgenomic DNAを用いて、OLA1遺伝子のpromoter領域、10個のexon領域並びにflanking intron領域をPCRで増幅し、direct sequencing (Sanger法)を行った。

3. 結果

1. BARD1の異常によるOLA1/BRCA1/BARD1/ γ -tubulin複合体形成と中心体への影響の解明。

乳がん細胞由来のOLA1のE168Q変異体はBRCA1との結合能が消失し(図2B)、中心体の数の制御能に異常を来たした。家族性乳がん由来でDNA修復能は正常だが、中心体の数の制御能に異常を来す

BRCA1 の I42V 変異体(参考文献 6, 7, 8)は、OLA1 との結合能が著しく低下した(図 2C) (参考文献 3, 4, 5)。よって、がん由来の変異による複合体形成の異常が中心体制御に異常を来すと考えられた。

乳がんで同定されている BARD1 の変異体は、OLA1 との直接結合能が消失した(図 2D)。この変異体の中心体への局在を免疫染色で解析したところ、野生型に比べて中心体への局在が著しく減少していた。また、野生型の BARD1 を過剰発現すると中心体が増加したが、この変異体では野生型に比べて中心体の増加する細胞が減少し、中心体制御能に異常があることが示唆された。

さらに BARD1 のアイソフォームは、がんで高発現し、予後不良因子になるとされる。BARD1 のアイソフォームは野生型同様に中心体に局在し、その過剰発現の中心体への影響を解析したところ、野生型同様に中心体が増加した。

2. OLA1 の中心体制御の分子メカニズムの解明。

OLA1 が大腸がんや肺がんで高発現するという報告があり、野生型の OLA1 を過剰発現すると、BRCA1 依存性に中心体数が増加した。しかし、中心体制御能に異常のある乳がん細胞由来の E168Q 変異体ではその程度はわずかであった。正常な OLA1 の過剰発現が中心体増加を引き起こすことを利用して、リン酸化の候補残基、アセチル化部位として報告されている残基、OLA1 の ATPase 活性に重要な ATP の結合残基の変異体を過剰発現したところ、リン酸化の候補残基の 3 つ、ATP の結合残基 1 つ、アセチル化残基 1 つの変異体で、中心体数の増加が E168Q 変異体と同程度に低下した。よって、OLA1 の中心体制御におけるそのリン酸化やアセチル化、ATPase 活性の重要性が示唆された。

E168Q 変異体を含めたこれら 6 つの OLA1 変異体と BRCA1、BARD1、 γ -tubulin との相互作用を免疫沈降法、pull-down アッセイで解析したところ、3 つの変異体で BARD1 との結合能が著しく低下し、この 3 つは BRCA1、 γ -tubulin との直接結合能は低下していないにもかかわらず、免疫沈降では相互作用が低下していた。よって、OLA1 と BARD1 の結合が OLA1/BRCA1/BARD1/ γ -tubulin タンパク質複合体の形成に重要であることが明らかになった。一方、免疫染色で、これらの変異体の中心体局在について検討したが、これらの変異は中心体の局在にはほとんど影響しなかった。

中心体の制御には、Aurora A、Plk1、Plk4 などのキナーゼが重要な働きをすることが知られている。これまでの解析により、OLA1 がこれらのキナーゼと相互作用することが明らかになっており、リン酸化の候補残基の 3 つが BARD1 との結合に異常を来した。よって、OLA1 のこれらの部位のリン酸化が、BARD1 との結合と中心体制御に重要な働きをしていることが考えられた。そのため、疑似リン酸化状態の変異体を作成して、BARD1 との結合と過剰発現による中心体数の増加が回復するかどうかを解析したところ、疑似リン酸化状態の変異体により、BARD1 との結合は野生型より強くなり、過剰発現による中心体数の増加は野生型と同程度に回復した。

3. OLA1 の新規結合分子の機能解析。

我々がプロテオミクス解析で新規 OLA1 結合分子として同定した BIP は OLA1 と同様に中心体に局在し、OLA1、BRCA1 の N 末端と直接結合することが明らかになった。本分子は乳がんで発現量が高いほど患者の生存率が低いとされている。そのため、乳がん細胞株で本分子を過剰発現したところ、中心体数が増加した。BRCA1 の N 末端領域の家族性乳がん由来の多数の変異体との相互作用について、免疫沈降法で解析したところ、BIP との相互作用が BRCA1 の 2 つの変異体で著しく低下していた。さらに、pull-down アッセイによって直接結合についても解析したところ、直接結合も低下していた。興味深いことに、これらの BRCA1 変異体は、中心体への局在が野生型に比較して低下しており、本分子が BRCA1 の中心体局在に関与することが示唆された。

4. *Ola1* ノックアウトマウスの表現型の解析。

OLA1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。まず、全身で Cre を発現する CAG-Cre マウスと交配し、全身でのノックアウトの影響を解析したところ、産まれてくる *Ola1* ホモノックアウトマウス数が少なく、一部が胎生致死である可能性が示され、また、生直後に死亡する個体も見られた。よって、ホモノックアウトマウスは胎生期、生後も体長が小さく短命で、発育異常が起こることが明らかになった。

Ola1 ヘテロノックアウトマウスは、野生型と同様の外観であったが、脾臓と肝臓の腫大し、脾臓では異型性のある細胞が増加し、脾臓の構造を破壊していた。さらに、14 月齢の老齢マウスでは、肝臓、リンパ節に転移巣が見られた。病理形態学的に血球系の腫瘍であることが示唆された。

5. BRCA1、BRCA2 に変異のない家族性乳がんの検体における OLA1 遺伝子変異の解析。

OLA1 の遺伝子変異が家族性乳がんの原因となるかどうかを検討するため、24 検体の BRCA1、BRCA2 に変異のない家族性乳がんの genomic DNA で OLA1 遺伝子の変異の有無を解析した。本解析では、OLA1 遺伝子の変異は認められなかった。

4. 考察

近年は個々の患者で最大の治療効果を得るための個別化医療の確立が望まれている。現在、乳がんの化学療法では、エストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター(PgR)が内分泌療法の、HER2 が増殖因子受容体に対する抗体薬のトラスツズマブのバイオマーカーになり、効果をあげているが、ER、PgR、HER2 陰性のトリプルネガティブ乳がんは治療抵抗性で、乳がん治療の大きな課題である。トリプルネガティブ乳がんに関連の深い basai-like 乳がんは BRCA1 変異による家族性乳がんの遺伝子発現プロファイルが酷似することも明らかになっている。よって、BRCA1 とその関連分子の機能解明は、トリプルネガティブ乳がんの治療法開発に貢献する可能性があり、OLA1 やその関連分子は治療のバイオマーカー

一や標的分子として有望である。

これまで、BRCA1のDNA修復経路での機能が精力的に解析されたことから、BRCA1のDNA修復経路での機能破綻が遺伝性乳がん・卵巣がん症候群を引き起こすと考えられてきた。しかし、OLA1がBRCA1とともに中心体を制御し、がん由来の変異でこれらの結合能が消失または低下することから(図2A, B, C)、BRCA1の中心体制御能も、BRCA1のがん抑制能に重要であることが示唆された。

本研究によりOLA1との直接結合能が消失するBARD1変異体は、中心体への局在が著しく減少し、中心体制御に異常を来し、また、BARD1のアイソフォームは、過剰発現により中心体の増加を引き起こした。このアイソフォームの高発現は、予後不良因子になるとされているが、これは高発現による中心体増加が染色体不安定性をもたらすことによる可能性が示された。

また、OLA1の強制発現により中心体が増加するが、乳がん由来の変異体でBRCA1との結合能が低下し、中心体制御能に異常を来すOLA1変異体では中心体数の増加が減弱することを利用して、OLA1変異体の機能を解析し、中心体制御能に異常を来すOLA1変異体を5つ同定した。そのうちの3つは、BARD1との結合能が消失することが明らかになり、OLA1/BRCA1/BARD1/ γ -tubulin複合体形成による中心体制御におけるBARD1の重要性が示された。中心体はDNA同様、1回の細胞周期のS期に一度だけ複製される(参考文献9)。OLA1、BRCA1の異常によりこの複製が過剰に起こることを既に明らかにしており、BRCA1/BARD1は γ -tubulinをモノユビキチン化し、過剰な中心体の複製を抑制することが報告されていることから、このユビキチン化へのOLA1の関与について今後さらに解析を進めることがさらに詳細なメカニズムが明らかになると考えられる。

我々が同定した新規OLA1結合分子BIPは、BRCA1に直接結合して、BRCA1の中心体に局在に重要で、BRCA1のがん抑制能に関与することが示唆された。本分子の過剰発現は中心体数の増加をもたらす、本分子の高発現が乳がんの悪性度と関与することから、高発現による中心体増加が染色体不安定性をもたらす、がん化やその悪性度の上昇に関与する可能性がある。

Ola1のノックアウトマウスの解析では、ホモノックアウトマウスでは胎生致死や発育異常が起こることが明らかになった。Ola1のノックアウトマウスの解析では、脾臓に血球系の腫瘍を形成することから、その発がんへの影響が明らかになった。今後はこれらの腫瘍での中心体異常について解析をさらに進め、さらには乳腺組織特異的にOLA1をノックアウトし、発がん感受性変化について解析し、乳腺組織特異的なBRCA1やBARD1のノックアウトにより生じる乳がんと比較検討することにより、個体レベルでのOLA1の異常による発がんメカニズムを明らかにすることができると考えられる。

OLA1の機能の破綻が発がんを引き起こすことが示唆されたことより、OLA1もまた家族性乳がんの原因遺伝子である可能性があると考えた。その場合は、遺伝子診断によるがんの早期発見が可能になると考えた。そこで、BRCA1、BRCA2に変異のない家族性乳がんの検体を用いて、変異の有無を解析したが、OLA1の遺伝子変異は見られなかった。しかし、データベースではその他のがんで、遺伝子増幅、欠失、変異が同定されている。よって、今後さらにその機能を解析することで、中心体制御能の異常と発がんとの関連が解明されることが期待される。

5. 参考文献

1. Wei L, Lan L, Hong Z, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28(24):7380-93
2. Wei L, Lan L, Yasui A, Tanaka K, Saijo M, Matsuzawa A, Kashiwagi R, Maseki E, Hu Y, Parvin J D, Ishioka C and Chiba N. BRCA1 contributes to transcription-coupled repair of DNA damage through polyubiquitination and degradation of Cockayne syndrome B protein. *Cancer Science* 2011; 102(10):1840-7
3. Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*, 53(1):101-114, 2014
4. 千葉奈津子 BRCA1とその新規結合分子OLA1による中心体制御能と乳がん発症機構 実験医学 2014;Vol.32, No.6: 908-910
5. 松澤綾子、千葉奈津子 家族性乳がん原因遺伝子産物BRCA1の新規結合分子OLA1の中心体制御機構 細胞工学 2014;Vol.33, No.4:432-433
6. Towler W I, Zhang J, Ransburgh D, Toland A, Ishioka C, Chiba N, and Parvin J D. Analysis of BRCA1 variants in double strand break repair by homologous recombination and single strand annealing. *Human Mutation* 2013;34(3): 439-445,
7. Kais Z, Chiba N, Ishioka C, Parvin J D. Functional differences among BRCA1 missense mutations in the control of centrosome duplication. *Oncogene* 2012;31(6):799-804
8. Ransburgh D*, Chiba N*, Ishioka C, Toland A, and Parvin J D. (*co-first author) The effect of BRCA1 missense mutations on homology directed recombination. *Cancer Res.* 2010;70(3):988-95
9. Fujita H, Yoshino Y, and Chiba N. Regulation of centrosome cycle. *Molecular & Cellular Oncology in press*