

## 新規乳癌関連分子のノックアウトマウスの作成と その解析による新たな発癌機構の解明

### [1] 組織

代表者：渡邊 利雄

(奈良女子大学大学院人間文化研究科)

対応者：千葉 奈津子

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：松澤 綾子

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費42万円，旅費8万円

### [2] 研究経過

家族性乳癌原因遺伝子 BRCA1 は、その生殖細胞系列変異により乳癌、卵巣癌を引き起こす癌抑制遺伝子である。一方、散発性癌では BRCA1 遺伝子変異をほとんど認めないが、散発性乳癌の 30~40%、卵巣癌のほとんどで BRCA1 の発現が減少している。また、近年、散発性乳癌の中の Basal-like 乳癌と言われる予後不良なサブグループの遺伝子発現プロファイルが BRCA1 変異による家族性乳癌のものと酷似していることや BRCA1 の発現量により、抗癌剤感受性が異なることなどが報告され、BRCA1 が散発性癌の発症や薬剤感受性にも関与することが示唆された。

BARD1 は BRCA1 とヘテロダイマーを形成し、DNA 修復、中心体制御、細胞周期チェックポイント、転写制御に関与する。BRCA1 の腫瘍由来の点突然変異で BARD1 との結合能とそのユビキチン化能は阻害され、BARD1 は BRCA1 の癌抑制機能を制御すると考えられる。

千葉は、プロテオミクス解析により BARD1 に結合する新規分子として BARD1-interacting protein(BIP)の同定に成功した。これまでの解析により、BIP が中心体、紡錘体極、ミッドボディーに局在していた (図1)。BRCA1 は中心体、紡錘体極には局在するが、ミッドボディーには局在を認めない。一方 BARD1 は、中心体や紡錘体極には全長の BARD1 が局在し、ミッドボディーでは N 末端を欠き BRCA1 に結合しないアイソフォームの BARD1 $\beta$ が第2の家族性乳癌原因遺伝子の産物である BRCA2 や分裂期キナーゼである Aurora B と複

合体を形成し、細胞質分裂に関与する。よって BIP は、中心体や紡錘体極とミッドボディーで異なった複合体を形成すると考えられる (図2)。

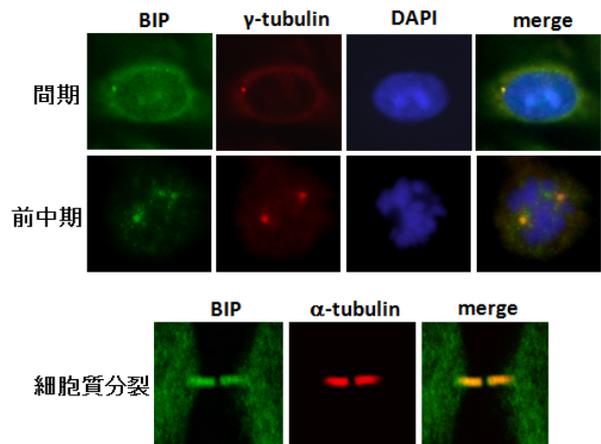


図1 内在性BIPの細胞内局在

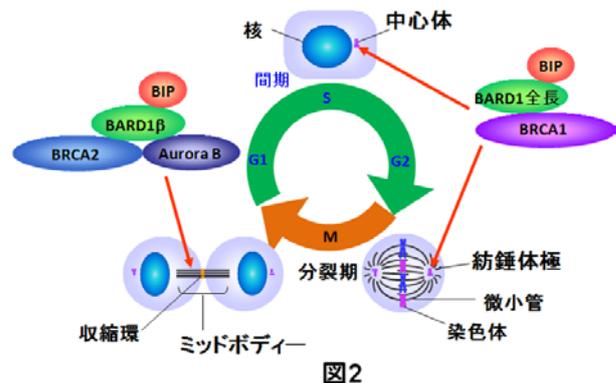


図2

siRNA による BIP の発現抑制では、中心体数の増加や多核細胞の増加が引き起こされ、BIP が中心体制御や細胞質分裂において重要な働きをすることが明らかになった。加えて BIP は、乳癌細胞株で既に遺伝子変異が報告されており、その機能の破綻が発癌メカニズムに関与することが示唆された。

本研究では、BIP のノックアウトマウスを作成し、BIP のノックアウトによる影響を *in vivo* にて解析し、その破綻による乳癌、卵巣癌の個体レベルでの新たな発癌メカニズムを解明することと、ノックア

ウトマウスから樹立した細胞を用いた細胞生物学的・生化学的解析により分子メカニズムを解明することを目的とした。

渡邊と千葉は、10年ほど前に共同でノックアウトマウスと胚の器官培養系を用い、造血幹細胞の発生を支配する転写因子 AML1 に関する研究を行い、多数の成果を上げている。

数年ほど前から、両者の共通の興味の対象である癌細胞における細胞分裂に関する研究に関して研究上の相談を行っている。申請前年度の話し合いで、千葉が BRCA1 と結合する BARD1 の解析から発見した BIP の新たな発癌メカニズム解析に関して、マウスの系を用いた解析の必要性を認識し、今回の共同研究を実施することを立案した。連絡は、メール・電話等で緊密に常時行った。

また、H23年10月に千葉が渡邊の在籍する、奈良女子大学を訪問し、また、H24年2月には渡邊が加齢医学研究所を訪問し、研究の打ち合わせを行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

(1) 千葉らにより明らかにされた情報を基に、BIP の機能ドメインの上流にある Exon3 を挟んだコンディショナルノックアウトマウスを作成するために必要な、遺伝子破壊用組み換え体 DNA を完成させた。

この計画では、万が一 Exon3 が読み飛ばされても、Exon3 を欠損するとフレームシフトにより直ちに STOP コドンが生じ、前述の BIP の機能に重要な領域は翻訳されない。

加えて、相同組み換え体 ES 細胞取得のために、PCR による遺伝子改変 ES 細胞の選別条件（1次スクリーニング）とサザン法による確認条件の検討を

行った。PCR 条件に関しては、条件検討用に組換え体 DNA を作製し最適条件を決定した。また、サザン法による確認のために必要なプローブに関しては、標的とする遺伝子領域に反復配列が多く困難を極めたが、確認用の制限酵素を変更することで、10か所目のプローブの候補で良好な結果を得ることに成功した。

これらの条件の決定により、目的とする BIP 遺伝子改変 ES 細胞の取得にめどがついた。

(2) これまでの研究により、BIP の発現抑制により、BIP が中心体制御と細胞質分裂に関与することが明らかになってきたが、その後の研究の進行により、BIP の中心体制御機構の分子メカニズムが明らかになってきた。

BIP は BARD1 と直接結合することが分かっていたが、BRCA1 とともに BARD1 非依存性に相互作用することも明らかになった。また、BIP は  $\gamma$ -tubulin と直接結合し、BRCA1 とともに  $\gamma$ -tubulin を安定化する機能があることが分かった。また、興味深いことに、BIP の癌細胞由来の変異で、この  $\gamma$ -tubulin を安定化する機能が消失した。さらに、野生型の BIP を発現抑制して、この BIP の変異体を導入した細胞では、中心体数が著しく増加した。よって、BIP が BRCA1 と関連した癌抑制効果を持つ可能性がさらに高まった。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

千葉、渡邊は、この共同研究により、JST 震災地域を対象とした「研究シーズ探索プログラム」新規癌抑制分子の機能解析による癌治療法の開発（390万円）の研究資金を獲得した。

### [4] 成果資料

現在、論文作成のためにさらに研究を進めている。