

PLK1 制御を介した中心体型 BRCA1 複合体の がん抑制機構の解明

所属：東北大学 加齢医学研究所 腫瘍生物学分野

助成対象者：吉野 優樹

概要

中心体は細胞分裂時に染色体を娘細胞に等分するために重要な細胞小器官である。乳がんにおいて、発がんの初期段階から中心体数の異常が見られ、乳がんの発がんに関与していると考えられている。*BRCA1* は家族性乳がんの原因遺伝子の一つであり、その機能障害は中心体数の異常を生じることが報告されている。しかし、*BRCA1* による中心体数制御の分子機序は未解明である。本研究では、*BRCA1* の中心体内部での局在部位を超解像顕微鏡によって詳細に解析し、*BRCA1* およびその関連因子の微小局在部位を明らかにした。また、微小局在部位から相互作用タンパク質を推測し、検証した結果、*BRCA1* の中心体における新たな相互作用タンパク質を同定できた。これらから、*BRCA1* による中心体複製制御機構の解明の糸口をつかむことができ、今後、その分子機構の解明を進めていくことが望まれる。

abstract

The centrosome is a major microtubule organizing center and contributes to proper segregation of chromosomes during mitosis. Centrosome amplification is found in many cancers and considered as a cause of carcinogenesis. *BRCA1*, one of the responsible genes for hereditary breast cancer syndrome, participates in the regulation of centrosome duplication. Consequently, *BRCA1* dysfunction induces

centrosome amplification and carcinogenesis. Although, the mechanism is still unknown. In this study, we analyzed the precise localization of BRCA1 in centrosomes using super-resolution microscopy. In addition, we found two novel interaction partners of BRCA1 from the localizing pattern. In the following study, we will investigate how BRCA1 regulates these interaction partners to conduct centrosome duplication.

研究内容

背景と目的

中心体は細胞内の主たる微小管形成起点の一つである。細胞分裂時、中心体から微小管が伸長し、紡錘体を形成する。したがって、正常な双極細胞分裂のためには、細胞分裂の開始時に中心体が正確に2個存在しなければならない。細胞分裂後、娘細胞は母細胞から中心体を1個ずつ受け継ぐ。これが次の細胞分裂までに一回複製され、2個の中心体を有するようになる。正常な細胞分裂のため、細胞周期一回あたり、正確に一回だけ中心体が複製されるよう、中心体複製は厳密に制御されている。

がんではしばしば中心体数の異常増加（中心体増幅）が認められる。中心体増幅細胞では細胞分裂時に偽双極分裂や多極分裂などの異常細胞分裂が生じ、染色体の不均衡分配が生じる。これは、がんのHall-markとされる染色体不安定性、ひいては発がんの原因と考えられている。しかし、がんにおいてなぜ、どのように中心体複製制御が障害されるのかは十分に解明されていない。

乳がんでは、中心体増幅が異形成や上皮内癌などの発がんの初期病変ですでに認められ、発がんに重要な役割を果たすと考えられる。*BRCA1* は家族性乳がんの原因遺伝子として同定されたがん抑制遺伝子であり、中心体制御にも関与することが報告されている。実際、*BRCA1* に変異を有する遺伝性乳がん症例では、中心体増幅を有する頻度が高く、染色体不安定性も高度に認められる。このことから、我々は*BRCA1* が関与するシグナル経路の異常が、乳がんにおける中心体増幅の誘導に重要であると考え、その分子機序の解析を行ってきた。

最近、我々は中心体制御に関与する *BRCA1* の新規相互作用タンパク質として、OLA1^{1, 2}

と RACK1³を同定した。BRCA1 の発現抑制は乳腺細胞特異的に中心体増幅を誘導することがすでに報告されていたが、我々は OLA1 の発現抑制¹や過剰発現²、RACK1 の過剰発現³がいずれも、乳腺細胞特異的に中心体増幅を誘導することを見出した。また、RACK1 が BRCA1 の中心体内での正常な局在のために必要であり、BRCA1 もしくは RACK1 の変異によって BRCA1/RACK1 相互作用に異常を来すと、BRCA1 の中心体局在の異常、および中心体複製障害が生じることを明らかにした³。これらから、BRCA1/RACK1 複合体が乳腺細胞における中心体複製制御に重要であることが示唆されたが、その分子機構はいまだ不明であった。

そこで、本研究では、BRCA1/RACK1 複合体の中心体複製制御機構の解析のため、BRCA1 および RACK1 の中心体内部での局在部位の詳細な解析を試みた。また、局在部位から推測された相互作用タンパク質と BRCA1、および RACK1 の相互作用を解析し、BRCA1 による中心体複製制御のシグナル経路の解明を試みた。

結果

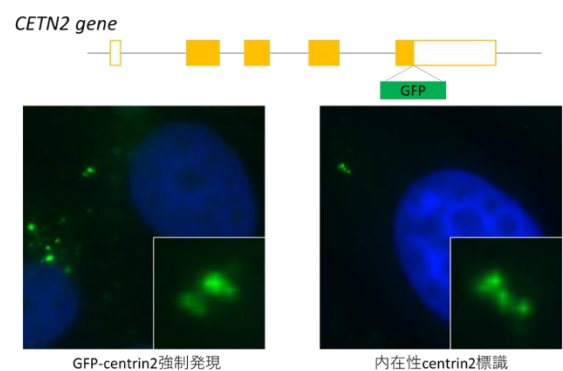
中心体は、微小管などからなる筒状の中心小体と、それを取り巻く中心小体周辺基質 (PCM) からなる。従来の電子顕微鏡による観察では PCM はアモルファスなタンパク質の集塊とされ

ていたが、近年の超解像蛍光顕微鏡による解析によって、放射状に配置するペリセントリンを骨格とし、種々のタンパク質からなる同心円状の層構造が存在することが明らかになった。そこで、我々は超解像顕微鏡の一つである構造化顕微鏡 (SIM) を用い、BRCA1 および RACK1 が中心体内のどの部位に存在するかを解析した。

まず、解析に必要な細胞株を作成した。3 種類のタンパク質による多重蛍光免疫染色を行うため、中心体を同定するマーカーの一つは蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させてマーキングする必要があった。中心小体のマーカーとして頻用されるセントリンと EGFP の融合タンパク質を一過性強制発現させたところ、中心小体のマーキングはできたが、バックグラウンド蛍光が高く、超解像顕微鏡での観察には不適切であった。そこで、CRISPR/Cas9 を利用して、内在性セントリン遺伝子に EGFP をノックインし、セントリン::EGFP 融合タンパク質を内在性プロモーター制御下に発現する細胞株を作成した。これによって、鮮明に中心小体がマーキングされた細胞を得ることができた (図 1)。

次に、本細胞株を用いて、中心小体の基部にある SAS6 および遠位部にあるセントリン

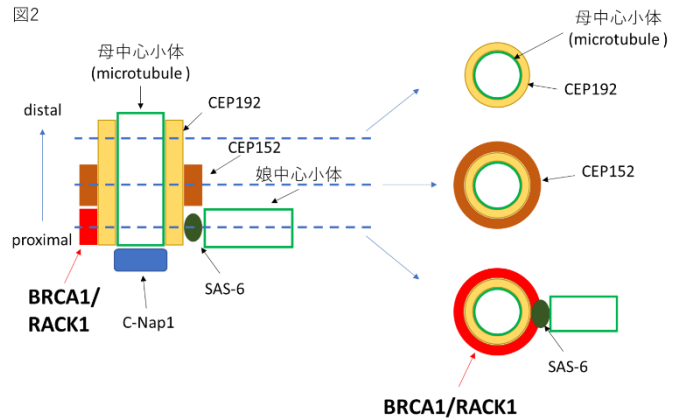
図1



をマーカーとして共染色したところ、BRCA1 および RACK1 はいずれもセントリンより SAS6 の近傍に位置した。しかし、完全な共局在にはなっていなかった。そこで、PCM の各層に対応するマーカー(最内層: CEP192、中間層: CEP152、最外層: γ -tubulin)との共染色を行ったところ、BRCA1 および RACK1 は PCM、とくに CEP152 の存在する中間層に局在する可能性が示唆された(図2)。

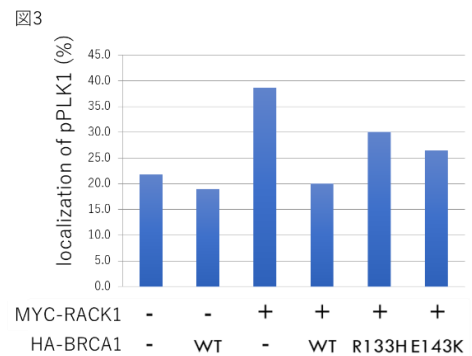
PCM 内層および中間層には複数の足場タンパク質や中心体複製制御因子が局在する。そこで、この部位に局在する足場タンパク質 A(未発表データのため、仮称)、および中心体複製制御キナーゼである PLK1 との相互作用を解析したところ、

足場タンパク質 A は BRCA1 と、PLK1 は BRCA1 と RACK1 の双方と相互作用した。また、RACK1 を過剰発現すると PLK1 の活性化が亢進し、BRCA1 の共発現によってこれが抑制されることが明らかになった(図3)。一方、RACK1 との結合能を失う BRCA1 変異体を共発現しても、PLK1 の活性化を抑制できなかった。また、RACK1 の過剰発現による PLK1 の活性化の亢進は、S 期における中心小体の乖離を引き起こしていた。中心小体乖離は、正常な細胞では M 期に生じ、中心体複製の開始を許可するための機構である。したがって、BRCA1/RACK1 制御系の破綻によって、1 回の細胞周期において複数回の中心体複製が生じることが示された。



今後の進展

本研究によって、これまで未解明であった BRCA1 およびその関連タンパク質の中心体内の微小局在部位が明らかになった。また、これを糸口として BRCA1 および RACK1 の新たな相互作用タンパク質を同定することができた。今後、これらの新規相互作用タンパク質の制御機構や活性が、BRCA1/RACK1 シグナル系の破綻によってどのように障害されるのか、その結果いかにして中心体増幅が生じるかを解析していく予定である。また、これによって乳がんの発がん初期に生じるシグナル経路の異常を明らかにし、薬物による発がん予防のための新規作用標的分子の同定を目指したい。



引用文献

1. Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*. 2014 53:101-104.
2. Yoshino Y, H Qi, Fujita H, Shiota M, Abe S, Komiyama Y, Shindo K, Nakayama M, Matsuzawa A, Kobayashi A, Ogoh H, Watanabe T, Ishioka C and Chiba N. BRCA1-interacting protein OLA1 requires interaction with BARD1 to regulate centrosome number. *Mol Cancer Res*. 2018 16(10):1499-1511.
3. Yoshino Y, Qi H, Kanazawa R, Sugamata M, Suzuki K, Kobayashi A, Shindo K, Matsuzawa A, Shibata S, Endo S, Miyanishi Y, Shimaoka T, Ishioka C, Kanno S, Yasui A, Chiba N. RACK1 regulates centriole duplication by controlling localization of BRCA1 to the centrosome in mammary tissue-derived cells. *Oncogene*. 2019 38(16):3077-3092.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

・ Kobayashi A, Yoshino Y, Qi H, Endo S, Fang Z, Kanazawa R, Chiba N. RACK1 regulates centriole duplication through the activation of polo-like kinase 1 by Aurora A. under review

・ 小林輝大 (2019) BRCA1 結合分子 RACK1 による Aurora A/PLK1 経路を介した中心小体複製制御機構の解明. 博士論文. 東北大学大学院医学系研究科医科学専攻. 仙台市・宮城県

[口頭発表]

[ポスター発表]

・ 小林輝大、吉野優樹、千葉奈津子. BRCA1 結合分子 BIP2 の過剰発現は PLK1 と Aurora A の活性化により中心体過剰複製を引き起こす. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018/9/27 大阪市・大阪府

[その他]