

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15233

研究課題名（和文）中心体型BRCA1複合体の破綻による組織特異的発がんの分子機序の解明

研究課題名（英文）The mechanism of tissue specific carcinogenesis by the deficiency of the centrosomal BRCA1 complex

研究代表者

吉野 優樹 (Yoshino, Yuki)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60755700

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、BRCA1複合体構成因子であるRACK1が、足場タンパク質としてPLK1とAurora Aの相互作用を促進し、PLK1の活性化に寄与することを明らかにした。また、この機構がS期の中心小体複製の維持に必要であることも明らかにした。がんで見られるRACK1の過剰発現は、S期のPLK1活性を異常亢進させ、中心小体の再複製を引き起こすことで中心体増幅を引き起こすことが分かった。さらに、中心体におけるBRCA1の詳細な局在部位を明らかにし、中心体に局在するBRCA1で特異的に修飾されることが疑われるアミノ酸残基を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRCA1は遺伝性乳がん卵巣がん症候群の原因であるが、その組織特異的発がんの分子機構が十分明らかでないため、BRCA1変異キャリアの発がんリスクの正確な評価ができない例がある。本研究でBRCA1複合体による中心体制御機構の一端が明らかになったことは、BRCA1変異が細胞機能に及ぼす影響をより正確な判定に寄与しうる。また、発がん機構が明らかになれば、これに介入し、発がんを抑制する方法の開発につながる可能性があり、新たながん治療法、がん予防法の開発に貢献することができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that RACK1 enhances the interaction between Aurora A and PLK1 as a scaffold to promote activation of PLK1. Previously, PLK1 is reported to act the G2 and M phases. We found PLK1 supported by RACK1 contributed to centriole duplication in the S phase. Excess RACK1 overactivated PLK1 resulting in premature disengagement and centriole reduplication in the S phase. Thus, excess RACK1 may contribute to carcinogenesis via inducing chromosomal instability by centrosome aberration.

Next, we determined the precise localizing position of BRCA1 in centrosomes using structured-illumination microscopy. BRCA1 localized at the base of the centrioles, not in the pericentriolar material. In addition, we identified several amino acid residues of which phosphorylation status was different between cytosol and centrosomes. The role of phosphorylation of these residues in the regulation of BRCA1 localization should be investigated in future studies.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：中心体 BRCA1 乳がん RACK1 PLK1 Aurora A

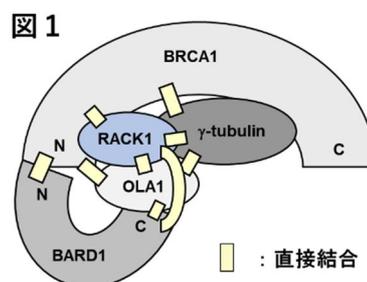
1. 研究開始当初の背景

BRCA1 はがん抑制遺伝子であり、**BRCA1** に生殖細胞系列の変異を有するキャリアでは特に乳がんおよび卵巣がんを高頻度に発症することから、遺伝性乳がん卵巣がん症候群と呼ばれる。

BRCA1 は相同組み換えによる DNA 損傷修復に必須の因子として詳細に研究されており、**BRCA1** の変異は相同組み換え修復障害を引き起こし、ゲノムへの変異の蓄積を亢進させることで、発がんに寄与すると言われてきた。実際、**BRCA1** 変異陽性がん細胞のゲノム DNA には、転座やヘテロ接合性の消失などの特徴的な変異が正常細胞と比較して多く認められることが報告されている。**BRCA1** 以外の相同組み換え修復に関与する因子の異常もまた、遺伝性乳がんなどの原因になることから、相同組み換え修復活性が **BRCA1** のがん制御能に重要であることが示唆される。

一方、相同組み換え修復はあらゆる細胞が有する細胞機能であり、**BRCA1** も乳腺上皮細胞に限らずあらゆる細胞にユニバーサルに発現する。**BRCA1** 変異キャリアのリンパ球や線維芽細胞でも相同組み換え修復障害が認められることが報告されているほか、**BRCA1** のノックダウンは非乳がん細胞でも相同組み換え修復活性の低下を引き起こす。したがって、**BRCA1** の異常による相同組み換え修復障害は組織非特異的な現象であり、**BRCA1** 関連がんがなぜ乳腺上皮細胞特異的に発がんを引き起こすかは明らかになっていなかった。

我々は、**BRCA1** の新規結合分子として **OLA1** および **RACK1** を同定し、これらが **BRCA1** と複合体(図1)を形成して中心体数の制御に寄与することを明らかにした(参考文献1、2)。中心体は細胞分裂時の正常な染色体分配に必要な細胞小器官であり、その数の異常は多極細胞分裂などの異常な細胞分裂から染色体不安定性を引き起こし、発がんにつながるとされている。重要なこととして、**BRCA1**、**OLA1**、および **RACK1** の異常は乳腺上皮細胞および乳がん細胞株では中心体数の異常を引き起こしたが、非乳がん細胞株では異常を引き起こさなかった。これらから、**BRCA1** 複合体が乳腺組織特異的に中心体制御に関与し、その異常が組織特異的な発がんに関与する可能性が考えられた。



中心体は、円筒状の母中心小体、細胞周期のなかで母中心小体の側壁に新たに複製される娘中心小体、そして母中心小体を取り囲む層状の構造をした中心小体周辺物質からなる。G1 期において、細胞は2個の母中心小体を持ち、これらはリンカーと呼ばれる構造で緩やかに連結されている。S 期において母中心小体の側壁に娘中心小体が新たに複製され、G2 期には母・娘中心小体が L 字型に連結した状態となる。1回の細胞周期で複数回の複製が生じないように、娘中心小体が結合した状態では母中心小体からは新たな中心小体の複製が始まらない様に抑制されている。M 期において、母・娘中心小体間の結合が解離し、次の中心小体複製が可能となる。この中心小体複製サイクルの制御に異常をきたすと、中心体数が異常に増加し、細胞分裂障害から発がんにつながるとされる。しかし、**BRCA1** およびその関連タンパク質による中心小体複製サイクルの制御機構は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、**BRCA1** 複合体による乳腺組織特異的な中心体制御機構を明らかにし、**BRCA1** 関連発がんの組織特異性の分子機序を解明することを目標とした。**BRCA1** 複合体による乳腺組織特異的な中心体制御機構の解明のため、**BRCA1** の中心体局在の制御機構、および **BRCA1** 結合分子である **RACK1** による中心体複製制御機構に焦点をあてて解析を行った。

3. 研究の方法

乳がん細胞株および不死化正常乳腺上皮細胞株を用い、野生型または変異型 **RACK1** を強制発現させた上で薬剤によって細胞周期を同調し、 γ -tubulin および centrin に対する免疫染色によってそれぞれ中心体および中心小体を染色し、その数を解析した。また、**PLK1**、リン酸化 **PLK1**、**Aurora A** に対する抗体を用いて免疫染色し、中心体の領域における蛍光輝度を測定することで、中心体での局在量を定量した。

タンパク質間の相互作用の解析は、免疫沈降法および組み換えタンパク質を用いた Pull-down 法によって解析した。

RACK1 の変異作成において、がんで認められる変異は COSMIC データベース (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) から検索した。また、リン酸化等の修飾候補残基は NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) および PhosphositePlus (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>) から検索した。変異型 **RACK1** 発現ベクターは site-directed mutagenesis によって作成した。

タンパク質のリン酸化の検出には **PhosTag** アクリルアミドを含むポリアクリルアミドゲルを用いた **PhosTag SDS-PAGE** を用い、リン酸化アミノ酸残基の同定はかずさゲノムテクノロジーに解析を委託した。

4. 研究成果

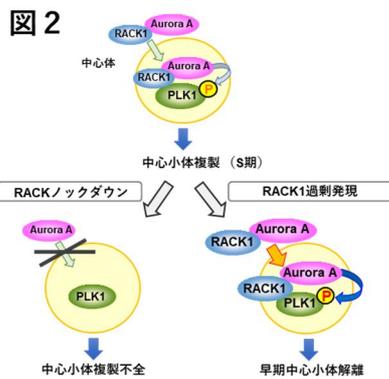
(1) **RACK1** による中心体複製機構の解析

これまでの研究によって **RACK1** の過剰発現は **BRCA1** 依存性に中心小体の過剰複製を、ノックダウンは中心小体複製抑制を引き起こすことを明らかにしていた。**RACK1** による中心小体複製制御機構を解明するため、**RACK1** が中心小体複製サイクルのどの時期に働くのかを細胞周期を同期して解析したところ、**RACK1** の過剰発現による中心体の増加は **S** 期に始まるのが明らかになった。

中心小体複製サイクルでは **S** 期に既存の母中心小体の側壁に新たに娘中心小体が複製され、**M** 期に母・娘中心小体間の結合が崩壊する中心小体解離が生じる。解離前の中心小体は新規中心小体複製が抑制された状態にあり、解離するとその抑制が解除されることから、中心小体解離は中心小体複製のライセンス機構とされる。**C-Nap1** を解離後の中心小体のマーカーとして中心小体解離の状態を解析したところ、**RACK1** の過剰発現細胞では正常では **M** 期に生じるはずの中心小体解離が **S** 期で生じており、その後中心小体の再複製が生じることで中心小体数が過剰になることが明らかになった。

中心小体解離は中心小体複製制御因子である **PLK1** に制御されるとされる。そこで **PLK1** と **RACK1** との相互作用を解析したところ、**RACK1** が **PLK1** と直接結合することが明らかになった。また、**PLK1** を活性化する上流キナーゼである **Aurora A** と **RACK1** が相互作用することがすでに報告されていたが、我々は **RACK1** と **Aurora A** が直接結合することを明らかにした。**Aurora A** は **PLK1** の **Thr 210** をリン酸化することで、**PLK1** を活性化するとされる。**RACK1** を過剰発現すると **PLK1** の **Thr 210** のリン酸化が増加し、ノックダウンすると減少したことから、**RACK1** が **Aurora A** による **PLK1** のリン酸化を正に制御すると考えられた。そこで、**Aurora A/PLK1** 間の相互作用に対する **RACK1** の影響を解析したところ、**RACK1** の発現量と **Aurora A/PLK1** 相互作用の強さは正に相関していた。さらに、これらの組み換えタンパク質を作成し、複合体再構成アッセイを行ったところ、**PLK1** 単独よりも **PLK1/RACK1** 複合体の方が **Aurora A** との結合性が高かった。これらから、**RACK1** が **Aurora A/PLK1** 複合体形成の足場として働き、その相互作用を推進することで **PLK1** の活性化を制御することが明らかになった。

これらから、**PLK1** の過剰活性化が **RACK1** 過剰発現細胞における早期中心小体解離の原因と考えられた(図2)。一方、**RACK1** のノックダウンは中心小体複製を阻害することを以前報告しているが、**PLK1** が中心小体複製に関与するかは不明であった。そこで、細胞周期を同調し、中心小体複製が進行する **S** 期に **PLK1** 阻害薬を添加したところ、中心小体複製の進行が抑制された。従来は、**PLK1** は **G2** または **M** 期に主として働くとされていたが、本研究によって、**S** 期における中心小体複製の進行にも **PLK1** が重要であり、**RACK1** は **S** 期の **PLK1** の活性維持に必要であることが明らかになった(図2、参考文献3)。



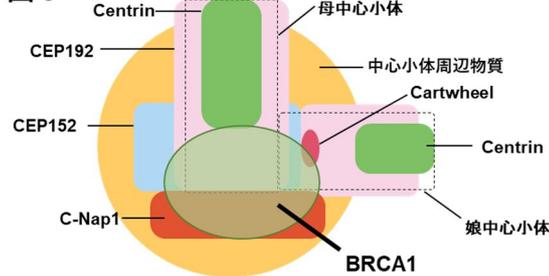
Yoshino et al. J Cell Sci. 2020

(2) **RACK1** による **BRCA1** 中心体局在の制御機構の解析

これまでの研究によって、**BRCA1** が中心体で正常に局在するために **RACK1** が必要であることが明らかになってきたが、**BRCA1** が中心体内のどこに局在するのかわからなかった。そこで、超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡を用いて中心体における **BRCA1** の局在部位を詳細に解析したところ、**BRCA1** は中心小体周辺物質ではなく、中心小体に局在することが確認された(図3)。また、**RACK1** をノックダウンすると **BRCA1** が中心小体から遊離し、その周囲に拡散したが、中心体周辺にはとどまることが明らかになった。これらから、**RACK1** は中心体周辺に輸送された **BRCA1** を中心小体に局在させるために必要であり、**BRCA1** を中心体周辺への輸送には別の機構が関与することが示唆された。

RACK1 による **BRCA1** の局在制御機構を解析するため、中心体制御因子による **RACK1**、**BRCA1** の翻訳後修飾を解析した。リン酸化と結合することでリン酸化タンパク質を分離することができる **PhosTag** を用いた **SDS-PAGE (PhosTag-PAGE)** 解析した結果、**RACK1** が中心体制御因子によってリン酸化されることが明らかになったため、網羅的质量分析を用いてリン酸

図3



化残基の同定を試みた。8ヶ所のリン酸化アミノ酸残基が同定されたが、そのうち種間で共通する5残基を選択し、**PhosTag-PAGE** で解析した結果、中心体制御因子によるリン酸化残基を同定することができた。また、中心体に局在する **BRCA1** を特異的に認識するモノクローナル抗体のエピトープマッピングを行い、同抗体が **N** 末端が非リン酸化状態にある **BRCA1** を特異的に認識することを明らかにした。今後、同定した残基のリン酸化が **BRCA1** の局在制御、および中心体複製制御に及ぼす影響を解析する予定である。

参考文献

- 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. 53:101-104, 2014.**
- 2) **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**
- 3) **Yoshino Y, Kobayashi A, Qi H, Endo S, Fang Z, Shindo K, Kanazawa R, Chiba N. RACK1 regulates centriole duplication through promoting the activation of polo-like kinase 1 by Aurora A. J Cell Sci. 2020 Sep 133(17):jcs238931.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshino Yuki, Kobayashi Akihiro, Qi Huicheng, Endo Shino, Fang Zhenzhou, Shindo Kazuha, Kanazawa Ryo, Chiba Natsuko	4. 巻 133
2. 論文標題 RACK1 regulates centriole duplication through promoting the activation of polo-like kinase 1 by Aurora A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 238931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.238931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshino Yuki, Fang Zhenzhou, Qi Huicheng, Kobayashi Akihiro, Chiba Natsuko	4. 巻 112
2. 論文標題 Dysregulation of the centrosome induced by BRCA1 deficiency contributes to tissue specific carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1679 ~ 1687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉野 優樹、遠藤 菜乃、渡部 剛、千葉奈津子
2. 発表標題 BRCA1関連乳がんの新たな診断法の開発と 発がん機構の解析
3. 学会等名 第8回HBOCコンソーシアム学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Yoshino, Huicheng Qi, Shino Endo, Zhenzhou Fang, Kei Otsuka, Natsuko Chiba
2. 発表標題 Centrosome regulation by a novel BRCA1 complex: insight into tissue-specific carcinogenesis
3. 学会等名 The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉奈津子、吉野優樹、齋匯成、遠藤菜乃、方震宙、石岡千加史、安井明
2. 発表標題 新規BRCA1結合分子であるOLA1とRACK1は中心体複製を制御してゲノム安定性に寄与する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Yoshino, Akihiro Kobayashi, Huicheng Qi, Shino Endo, Zhenzhou Fang, Natsuko Chiba
2. 発表標題 A novel BRCA1-interacting protein, RACK1, contributes centriole duplication in mammary cells via regulation of PLK1
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉野優樹、齋匯成、藤田拓樹、小林輝大、千葉奈津子.
2. 発表標題 中心体制御における新規BRCA1結合因子OLA1とBARD1の相互作用の重要性.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林輝大、吉野優樹、千葉奈津子
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学 加齢医学研究所 腫瘍生物学分野
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/cab/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 輝大 (Kobayashi Akihiro)	東北大学・加齢医学研究所腫瘍生物学分野・大学院生 (11301)	
研究協力者	遠藤 菜乃 (Endo Shino)	加齢医学研究所腫瘍生物学分野・大学院生 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------