

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07143

研究課題名(和文) BRCA1複合体の中心体制御機構の解析による組織特異的発がん機序の解明

研究課題名(英文) Tissue-specific carcinogenesis due to dysregulation of centrosome duplication by 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性乳がん関連遺伝子BRCA1の機能障害による組織特異的な発がんの分子メカニズムを解析するため、中心体型BRCA1複合体の構成因子であるRACK1をノックダウンし、中心体複製にどのような異常が生じるかを解析した。その結果、RACK1のノックダウンによって中心体複製の極めて初期の段階で複製が停止することが明らかになった。また、中心体複製を制御する複数のキナーゼからRACK1の制御標的を同定したほか、網羅的質量分析によってRACK1の新規結合タンパク質を同定し、これが中心体複製制御キナーゼの安定性の維持に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRCA1変異キャリア患者では乳がん発症率が80%と高く、かつ若年発症例も多い。乳がん発症を予防するには、現時点では予防的に乳房を切除する他ないが、健常な乳房を切除することは美容的、心理的に侵襲が大きい。したがって、BRCA1変異キャリア患者における乳がんの発症を積極的に抑制する非外科的治療法の開発が望まれている。発がんを抑制するには、細胞ががん化する過程を理解し、がん化に必須のステップを標的とする薬剤を開発する必要がある。本研究はBRCA1複合体の機能障害による乳腺上皮細胞特異的ながん化メカニズムの一端を解明するものであり、将来のがん化抑制薬の開発の基盤的知識を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：BRCA1 is one of the responsible genes for hereditary breast cancer. It has not been well understood why BRCA1 dysfunction causes carcinogenesis in tissue-specific manner. In this study, we investigated the molecular mechanism of centrosome regulation by the centrosomal BRCA1 complex.

To elucidate the function of the centrosomal BRCA1 complex in centrosome regulation, we knocked down RACK1, a component of the centrosomal BRCA1 complex, and investigated abnormalities induced by that. In RACK1-knockdown cells, centrosome duplication was hampered at the very early stage of the duplication. We screened several mitotic kinases which involves centrosome regulation and found one kinase as a regulatory target of RACK1. In addition, we identified a novel interactant of RACK1 and found that the interactant regulated the stability of the kinase in protein level.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：BRCA1 中心体 RACK1

1. 研究開始当初の背景

がんは本邦の死因の **1** 位を占める重要な疾患である。乳がんは女性が最も高頻度に罹患するがんであり、約 **10%** は遺伝性に生じるとされる。その最大の原因遺伝子の一つが、がん抑制遺伝子 **BRCA1** であり、**BRCA1** の変異キャリア患者では乳がんの生涯発症リスクは **80%** にものぼる。その高い発がんリスクのみならず、出産・子育て期における若年発症も多く、社会的にも大きな問題である。

BRCA1 は散発性乳がんにおいてもしばしば発現の低下を認め、中でも組織学的にホルモン受容体と **HER2** が陰性の **Triple-negative subtype** と高い関連がある。**Triple-negative subtype** は悪性度が高く、分子標的治療薬の適応がないことから難治性とされる。これらから、**BRCA1** 機能障害による発がんの分子機構に立脚した、新たながんの治療法、予防法の開発が望まれている。

BRCA1 は DNA 損傷修復能を有し、その異常は変異の蓄積・がん化を促進する。しかし、**BRCA1** の DNA 損傷修復能には組織特異性は認められないことから、**BRCA1** は DNA 損傷修復能に加え、さらに何らかの乳腺特異的ながん抑制機構を有すると考えられるが、**BRCA1** の組織特異的な分子機能は十分に解明されていない。

BRCA1 関連発がんの組織特異性の原因の究明にあたり、申請者は **BRCA1** の中心体制御能に着目した。中心体は図 **1A** に示す構造を持ち、細胞分裂時において染色体の均等な分配に寄与する。正常な細胞分裂のため、中心体は細胞周期において一度だけ複製され、その数が維持される(図 **1B**)。乳腺組織では異形成や上皮内がんなどの前がん病変から中心体の異常な増加(中心体増幅)が見られ、特に **BRCA1** 関連乳がんで顕著である。また、**BRCA1** の異常は乳腺細胞で特異的に中心体増幅を引き起こす。これらから申請者は、**BRCA1** の中心体制御能の乳腺特異性が、**BRCA1** 関連発がんの組織特異性の原因ではないかと考えた(図 **2**)。

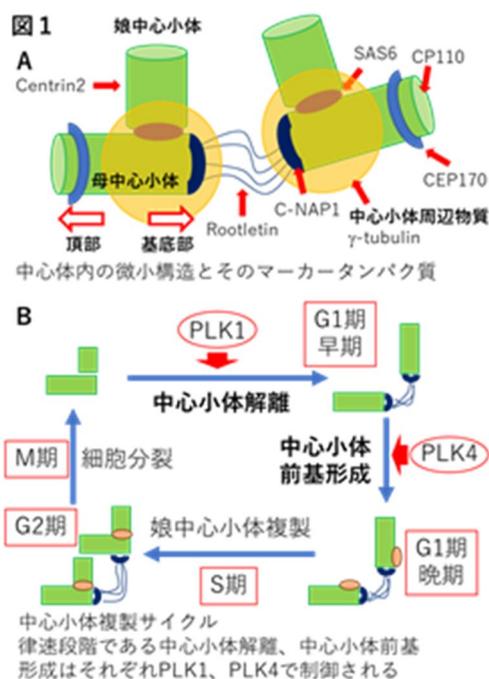
申請者はこれまでにプロテオーム解析で **BRCA1** の新規結合分子として **Obg-like ATP ase (OLA1)** および **Receptor activated protein kinase C (RACK1)** を同定した。**OLA1** は **BRCA1**、**BARD1** とともに複合体を形成し、乳腺由来の細胞において特異的に中心体制御能を発揮する。また、**RACK1** は **BRCA1** と結合し、**BRCA1** を中心体に正常に局在させる役割も持っている。**RACK1** をノックダウンすると **BRCA1** が中心体から周囲の微小管に移動する。**BRCA1** または **RACK1** の変異によって **BRCA1-RACK1** 間の相互作用が障害されると、**BRCA1** の中心体局在に異常をきたし、同時に中心体制御も障害される。これらから申請者は、**BRCA1** が **RACK1** などとともに乳腺組織特異的に中心体複製を制御し、乳腺上皮細胞におけるゲノム安定性の維持に寄与すると考えた。

2. 研究の目的

これまでに **BRCA1** やその結合分子が乳腺上皮細胞における中心体複製制御に必要であることは明らかになっているが、これらの分子による中心体複製制御の具体的な分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では **BRCA1** および **RACK1** に着目し、これらの分子による生理的な中心体複製の制御機構を明らかにするとともに、**BRCA1** 複合体による中心体制御に乳腺組織特異性がもたらされる原因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

乳腺組織由来のがん細胞、および非がん化正常細胞を用いて **BRCA1** や **RACK1** をノックダウンし、中心体の複製状態を免疫染色によって観察することで、**BRCA1** 複合体が中心体複製のどの過程に関与するかを解析した。また、中心体制御能を保持する **RACK1** 変異体を bait として、その相互作用タンパク質を網羅的に解析し、**RACK1** による中心体複製制御のエフェクター



タンパク質の同定を試みた。

4. 研究成果

BRCA1 複合体の中心体複製制御における機能を解析するため、まず **BRCA1** が中心体のどの部位に局在するかを詳細に検討した。**CEP192**、**CEP152**、**g-tubulin**、**C-Nap1**、**centrin** などの中心体・中心小体タンパク質をマーカーとし、超解像顕微鏡 **3D-SIM** で **BRCA1** の局在を解析したところ、**BRCA1** は母中心小体の基部に局在することが明らかになった。また、**BRCA1** の中心体局在に必要とされる **BRCA1** の N 末端領域を部分的に欠損させた変異体を用いて解析したところ、中心体に局在する **BRCA1** は a.a.201-300 の領域に存在する **Ser/Thr** 残基が非リン酸化状態にあることが明らかになった。さらに、**RACK1** をノックダウンすると母中心小体基部の **BRCA1** の局在が減弱する一方、中心体周囲の微小管に関連する **BRCA1** の局在が亢進した。これらから、**BRCA1** は **RACK1** 非依存性に微小管経由で中心体に輸送され、**RACK1** と結合することで中心体内部に局在するものと考えられた。

次に、乳がん細胞株である **MCF7**、**MDA-MB231**、不死化乳腺上皮細胞である **MCF10A** では、いずれの細胞でも **RACK1** をノックダウンすると中心体複製の初期段階で複製が停止した。一方、乳腺以外の組織に由来する **HeLa** (子宮頸がん細胞株)、**U2OS** (骨肉腫細胞株)、**RPE1** (不死化網膜色素上皮細胞) では、**RACK1** をノックダウンしても中心体複製は障害されなかった。これらから、**RACK1** のノックダウンによる中心体の異常増加のみではなく、生理的な中心体複製にも組織特異性が存在することが明らかになった。

RACK1 のノックダウンによって乳腺上皮由来細胞の中心体複製がその初期段階で停止したことから、中心体複製の開始・進行を制御することが知られている **polo** ファミリーキナーゼとの関連を解析した。その結果、解析したキナーゼは **RACK1** と結合するとともに、**RACK1** を基質としてリン酸化することが明らかになった。さらに、解析したキナーゼによってリン酸化されるアミノ酸残基を変異させた **RACK1** 変異体を作成したところ、非リン酸化 **RACK1** 変異体は中心体複製制御活性を失っていることが明らかになった。これらから、解析したキナーゼによる **RACK1** のリン酸化が、乳腺上皮由来細胞における中心体複製に必要であることが明らかになった。

解析したキナーゼによってリン酸化された **RACK1** によつて中心体複製制御機構を解析するため、非リン酸化 **RACK1** 変異体、および疑似リン酸化 **RACK1** 変異体を細胞に発現させ、これらの変異体を **bait** として免疫沈降を行い、共沈降したタンパク質を質量分析によって網羅的に解析した。検出されたタンパク質に対し、疑似リン酸化 **RACK1** 変異体、および非リン酸化 **RACK1** 変異体それぞれとの共沈降量の比を計算し、疑似リン酸化 **RACK1** 変異体とより強力に相互作用するタンパク質のリストを得た。現在、得られた候補タンパク質が **RACK1** による中心体複製制御に関与するか、機能解析を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Qi Huicheng, Kikuchi Megumi, Yoshino Yuki, Fang Zhenzhou, Ohashi Kazune, Gotoh Takato, Ideta Ryo, Ui Ayako, Endo Shino, Otsuka Kei, Shindo Norihisa, Gonda Kohsuke, Ishioka Chikashi, Miki Yoshio, Iwabuchi Tokuro, Chiba Natsuko	4. 巻 113
2. 論文標題 BRCA1 transports the DNA damage signal for CDDP induced centrosome amplification through the centrosomal Aurora A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4230 ~ 4243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15573	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 該当する

1. 著者名 Yoshino Yuki, Chiba Natsuko	4. 巻 90
2. 論文標題 Roles of RACK1 in centrosome regulation and carcinogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 110207 ~ 110207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2021.110207	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千葉 奈津子, 吉野 優樹, 方 震宙
2. 発表標題 BRCA1とその関連分子の変化による中心体制御異常とゲノム不安定性
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 方 震宙、李 星明、吉野 優樹、石岡 千加史、森 隆弘、千葉 奈津子
2. 発表標題 NEK2はAurora AによるOLA1のコピキチン化を促進して中心体数を制御する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李 星明、方 震宙、吉野 優樹、石岡 千加史、森 隆弘、千葉 奈津子
2. 発表標題 BRCA1はAurora AによるOLA1のコピキチン化に作用して中心体成熟を促進する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉野 優樹、千葉 奈津子
2. 発表標題 中心体におけるBRCA1の局在部位とその制御機構の解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 方 震宙、李 星明、鈴木 萌、吉野 優樹、斉 匯成、森 隆弘、千葉 奈津子
2. 発表標題 Aurora AによるOLA1のコピキチン化はPCMを制御して中心体数をコントロールする
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉 奈津子、菊池 めぐみ、方 震宙、後藤 孝太、吉野 優樹、石岡 千加史、斉 匯成
2. 発表標題 BRCA1はATMによるリン酸化を介してDNA損傷シグナルを中心体に輸送する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野 優樹、方 震宙、千葉 奈津子
2. 発表標題 BRCA1結合分子RACK1による中心体複製制御機構の解析
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
研究分担者	千葉 奈津子 (Chiba Natsuko) (50361192)	東北大学・加齢医学研究所・教授 (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
---------	---------