

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640061

研究課題名(和文) エンドソーム成熟化機構に関連する新規乳がん発生機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the new mechanism for breast carcinogenesis associated with early endosome.

研究代表者

三木 義男 (MIKI, Yoshio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：10281594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：を追究した。BRCA2は初期エンドソームマーカーRab5とともに初期エンドソームに存在すること、及び初期エンドソームにはSNAREタンパク質ファミリーの1つSyntaxin-19が存在し、BRCA2と結合することを明らかにした。これらの結果は、初期エンドソームにおけるBRCA2の新規機能を示すものであり、重要な成果と考えている。

研究成果の概要(英文)：We already reported that BRCA2 is involved in the abscission between two daughter cells during cytokinesis. The event of membrane abscission also occurs during endosome formation, so we made hypothesis that BRCA2 might have some role in the event of endosome formation through membrane abscission. We isolated endosome lysates from HeLa S3 cells and analyzed the lysates by mass spectrometry or immunoblotting using anti-BRCA2 antibody. The results indicated that the BRCA2 localizes at early endosome. Furthermore, BRCA2 and GFP-Rab5, which was over expressed as a marker of early endosome, were showed the co-localization using immunofluorescence microscopy. However, the interaction of both proteins are still unclear from the immunoblotting data using total whole cell lysates. Then, we tried the mass spectrometry analysis of the anti-BRCA2 immunoprecipitates from endosome lysates. This results suggested the possibility of new BRCA2 function at early endosome.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：乳がん BRCA2 エンドサイトーシ ESCRT複合体

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで、BRCA2 の中心体機能制御を通して生じるゲノム不安定性が乳がんの発症機構に重要性を持つことを明らかにしてきた。最近、細胞質分裂の娘細胞の切断において BRCA2-CEP55 複合体が、Tsg101、ALIX タンパク質をミッドボディにリクルートして、ESCRT 複合体とともにその切断に関与することが報告された (Dev. Cell, 17, 2012)。Tsg101、ALIX、ESCRT 複合体、VPS4 ATPase は、生体膜の切断 (細胞質分裂のミッドボディの切断、ウイルス出芽の切断、エンドソーム内腔小胞の膜からの切断) に重要な共通因子として機能することから、新たにエンドサイトーシスにおいても BRCA2 が生体膜の切断に関与することが考えられる。

2. 研究の目的

ESCRT 複合体、VPS4 ATPase、Tsg101、ALIX が機能する共通の生物学的事象に細胞質分裂のミッドボディの切断、ウイルス出芽の切断、エンドソーム内腔小胞の膜からの切断がある。申請者らは、遺伝性乳がん原因遺伝子産物の BRCA2 が、細胞質分裂のミッドボディの切断に関わることを見出すとともに、最近の報告では、BRCA2 が Tsg101 や ALIX と結合しミッドボディにリクルートすることから、BRCA2 は、エンドサイトーシスにおいても生体膜切断因子という新たな機能をもつ可能性がある。そこで本研究では、エンドサイトーシスと発がん機構の関連は増殖シグナルの下方制御 (増殖因子の不活化) 障害が原因であるのに加え、全く新しく BRCA2 が関与する可能性に焦点をあて、その機能解明と新規乳がん発生メカニズムの同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) BRCA2 のエンドソームにおける局在と内腔小胞の形成への関与

BRCA2 がエンドサイトーシスによって取り込まれることを明らかにするとともに、エンドソームにおける機能解明を行う。

BRCA2 のエンドソーム内の局在を調べる現時点で BRCA2 がエンドサイトーシスによって取り込まれてエンドソームに局在する報告はない。そこで、BRCA2 がエンドソームに局在するかどうか確かめるため、初期エンドソームマーカー (Rab5) と後期エンドソームマーカー (Rab7、EEA1) を用いた免疫染色で BRCA2 との共同在を観察する。

BRCA2 の発現抑制によるエンドソームの内腔小胞の形成に与える効果を観察する siRNA-BRCA2 で BRCA2 の発現を抑制して、初期エンドソームから後期エンドソームの移行が進行するのかを各マーカーの抗体を用いて観察する。

(2) BRCA2 による Tsg101、ALIX のエンドソ

ームへのリクルートに関する検討

BRCA2 は、細胞質分裂のミッドボディに Tsg101 と ALIX をリクルートすることから、エンドソームにも同様にリクルートするのかを調べる。

BRCA2 の発現抑制によるエンドソームへの Tsg101、ALIX のリクルート有無の検討 siRNA-BRCA2 による BRCA2 発現抑制の結果、Tsg101、ALIX がエンドソームにリクルートされるのかを免疫染色で観察する。

BRCA2 の変異導入によるエンドソームへの Tsg101、ALIX のリクルート有無の検討 遺伝性乳癌原因遺伝子 BRCA2 のミスセンス変異によって、554 番目のシステインがトリプトファン、582 番目のスレオニンがプロリン、3002 番目のグルタミン酸がリジン、3005 番目のアルギニンがアラニンに置換された症例が報告されている。この 4 箇所のいずれかに変異が起こると細胞質分裂のミッドボディに Tsg101 と ALIX がリクルートされない (Dev. Cell, 17, 2012) ことから、BRCA2 の変異 (C554W, T582P, E3002K, R3005A) 導入によって、Tsg101、ALIX がエンドソームにリクルートされるのかを免疫染色で観察する。

(3) BRCA2 による VPS4 の ATPase 活性に及ぼす影響を調べる

BRCA2 が、細胞質分裂のミッドボディに局在する II 型ミオシン IIC の ATPase 活性を制御することを見出した (未発表)。この結果を踏まえて、BRCA2 が同じ AAA ファミリーの VPS4 の ATPase 活性にも影響を示すのではないかと考えている。

VPS4 のクローニング

HA もしくは Flag タグと融合したタンパク質発現系 (培養細胞用) および GST 融合タンパク質発現系 (大腸菌用) プラスミドを構築する。

BRCA2 と VPS4 の結合を調べる

VPS4、および BRCA2 抗体を用いて内在性 BRCA2 と VPS4 の結合を免疫沈降法にて検出する。ただし、VPS4 抗体が免疫沈降出来ないことも想定されるので、一過性に高発現させた HA-VPS4 と BRCA2-FLAG で結合を測定する。

BRCA2 による VPS4 の ATPase 活性を測定する

大腸菌で発現させた GST-VPS4 を精製後、ATPase 活性を測定する系を構築する。この系に対して、BRCA2-FLAG を濃度依存的に添加して VPS4 の ATPase 活性の増減を測定する。

(4) 癌細胞と正常細胞の後期エンドソームの量的比較

C 末端欠損型 BRCA2 のみ発現している膀胱由来の CAPAN1 細胞と野生型 BRCA2 を発現している細胞株 MCF7、および正常細胞に対して、抗 Rab7 抗体による免疫染色を行い、蛍光量の測定から後期エンドソームの量的比較を行う。これによって、後期エンドソ

ム形成への BRCA2 の関与、および正常と癌細胞の後期エンドソームの癌化との関連性を検討する。

4. 研究成果

エンドソーム小胞をエンドソーム膜から切断する際に Tsg101、ALIX や ESCRT 複合体が結合した後、VPS4 ATPase が複合体を解体して小胞形成が進行すると考えられていることから、我々は、BRCA2 が Tsg101、ALIX、VPS4 を制御することでエンドソーム形成にかかわる可能性を考えた。

(1) BRCA2 の初期エンドソーム内への局在

BRCA2 のエンドソームの存在有無を検証するため、初期エンドソームと後期エンドソームの分画を 5-20% の iodixanol 密度勾配遠心分離法により行った。分画の確認は、初期エンドソームマーカーに Rab5、後期エンドソームマーカーに Rab7 を用いて行い、期待通り低比重画分に初期エンドソーム、高比重画分に後期エンドソームを検出した。各エンドソームライゼートを抗 BRCA2 抗体によるイムノプロットで解析した結果、初期エンドソームマーカーである Rab5 と同一画分に BRCA2 を検出した (図 1)。

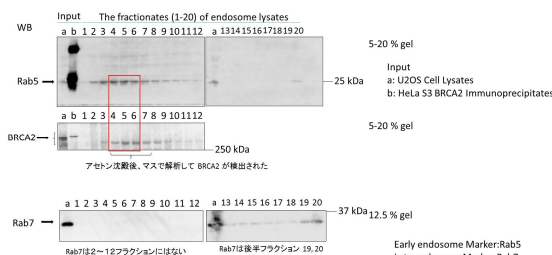


図 1、初期エンドソームマーカー-Rab5 と同じ分画からの BRCA2 の検出

(2) 初期エンドソームにおける BRCA2 結合タンパクの同定

そこで、初期エンドソームライゼートに対して、抗 BRCA2 抗体を用いて免疫沈降を行い、質量分析計で解析した結果、Syntaxin-19 を同定した。さらに、分画したエンドソームライゼートを抗 Syntaxin-19 抗体によるイムノプロットで解析した結果、BRCA2 と同一画分に存在することが確認できた。Syntaxin-19 は、機能未知なタンパク質であるが、小胞と目的細胞内器官との繫留や融合にかかわるとされている SNARE タンパク質ファミリーの 1 つとして報告されており、エンドソームからゴルジ体への輸送経路において働く可能性があると考えられている。同じファミリーの中にはすでにエンドソームで機能することが報告されている Syntaxin-5 や Syntaxin-6 が存在する。

(3) BRCA2 と ESCRT タンパク群との相互作用

これまでのところ、免疫沈降法により、BRCA2 と Tsg101、ALIX との相互作用は検出されていない。また、各タンパク質の抗体を用いた免疫染色サンプルについて共焦点顕微鏡による観察を行った。その結果、初期エンドソームマーカーである Rab5 が局在する領域に、BRCA2 と Tsg101 または ALIX が同様に存在することが確認されたが、領域内の各タンパク質のスポットひとつひとつについて詳細に観察したところ、BRCA2 と Tsg101 または ALIX の局在がわずかにずれている様子が確認された。BRCA2 が ATPase 活性の制御を行うと仮説を立てた分子 VPS4 についても免疫沈降法により相互作用を検討したが、両者の結合は確認されなかった。HA-VPS4 と BRCA2-FLAG を細胞に発現させた系においても免疫沈降法により相互作用を検討したが、両者の結合は検出されなかった。これらの結果から、エンドソーム形成の際に BRCA2 が Tsg101、ALIX および VPS4 と同一の系で働く可能性は低いと考えられた。しかしながら今回の研究成果は、BRCA2 が初期エンドソームに存在し、そのパートナータンパク質の候補を新たに見出すことが出来て、エンドソームにおける BRCA2 の新規機能を解明する手がかりが得られたことから非常に大きいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 9 件)

Wali N, Hosokawa K, Malik S, Saito H, Miyaguchi K, Imajoh-Ohmi S, Miki Y, Nakanishi A: Centrosomal BRCA2 is a target protein of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 443(4):1148-1154. (査読有)

Takaoka M, Saito H, Takenaka K, Miki Y, Nakanishi A: BRCA2 phosphorylated by PLK1 moves to the midbody to regulate cytokinesis mediated by nonmuscle myosin IIC. *Cancer Res* 2014, 74(5):1518-1528. (査読有)

Kimura H, Miki Y, Nakanishi A: Centrosomes at M phase act as a scaffold for the accumulation of intracellular ubiquitinated proteins. *Cell Cycle* 2014, 13(12):1928-1937. (査読有)

Ishiba T, Nagahara M, Nakagawa T, Sato T, Ishikawa T, Uetake H, Sugihara K, Miki Y, Nakanishi A: Periostin suppression induces decorin secretion leading to reduced breast cancer cell motility and invasion. *Sci Rep*

2014, 4:7069. (査読有)

Nakamura S, Takahashi M, Tozaki M, Nakayama T, Nomizu T, Miki Y, Murakami Y, Aoki D, Iwase T, Nishimura S *et al*: Prevalence and differentiation of hereditary breast and ovarian cancers in Japan. *Breast Cancer* 2013. (査読有)

[学会発表](計29件)

中西 啓, 三木 義男; BRCA2 の新規機能解明に基づく診断・治療法の開発. 第73回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市, 2014年9月25日 27日

高岡 美帆, ナディラ ワリ, 齋藤 広子, 中西 啓, 三木 義男; M期中心体におけるMT1-MMPのBRCA2タンパク分解. 第73回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市, 2014年9月25日 27日

宮口 健, 井元 清哉, 牛嶋 大, 松浦 正明, 玉田 嘉紀, 山口 類, 宮野 悟, 三木 義男; 乳がん患者のパクリタキセル応答性に関わる遺伝子ネットワーク解析. 第73回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市, 2014年9月25日 27日

三木 義男; 遺伝性乳がん卵巣がん症候群(HBOC)と遺伝カウンセリング 遺伝性乳がん原因遺伝子の発見から新しい治療開発への展望. 第38回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 大阪府東大阪市, 2014年6月26日 29日

大石 陽子, 黒田 一, 川村 雄大, 齋藤賢将, 野谷 啓之, 川村 徹, 佐藤 康, 密田 亜希, 中嶋 昭, 三木 義男; 機能ネットワークからみた乳癌予測因子の探索. 第22回日本乳癌学会学術総会, 大阪府大阪市, 2014年7月10日 12日

石場 俊之, 中西 啓, 永原 誠, 中川 剛士, 佐藤 隆宣, 円城寺 恩, 大野 玲, 飯田 聡, 植竹 宏之, 杉原 健一, 三木 義男; 葉状腫瘍のプロテオーム解析から導いたperiostin欠乏によるdecorinの細胞外放出. 第114回日本外科学会定期学術集会, 京都府京都市, 2014年4月3日 5日

三木 義男; 新規BRCA機能とそれに基づく合成致死療法の開発. 第51回日本癌治療学会学術集会, 京都府京都市, 2013年10月24日 26日

高岡美帆, 齋藤広子, 中西 啓, 三木 義男; Identification of the clinical significance of a hereditary breast cancer-associated missense mutation (T77A) of BRCA2. 遺伝性乳癌患者でみられるBRCA2 遺伝子

内の変異が細胞質分裂に与える影響. 第72回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市, 2013年10月3日 5日

中西 啓, 木村仁美, 三木 義男; The relevance of centrosomal maturation and genome stability. 中心体の成熟化とゲノム安定性との関連性. 第72回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市, 2013年10月3日 5日

石場俊之, 中西 啓, 高木洋子, 永原誠, 中川剛士, 佐藤隆宣, 杉原健一, 三木 義男; Decorin secretion from cancer cells with periostin deficiency significantly decreased the cancer migration and invasion. ペリオスチン欠損によるデコリンの分泌は癌細胞の遊走・浸潤を抑制する. 第72回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市, 2013年10月3日 5日

三木 義男; DNA repair and synthetic lethal approaches to cancer therapy. DNA修復機能不全と合成致死療法. 第72回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市, 2013年10月3日 5日

三木 義男, 高岡 美穂, 中西 啓; 新規BRCA機能とその合成致死療法への展開. 第19回日本家族性腫瘍学会学術集会, 大分県別府市, 2013年7月26日・27日

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/section/genomics/mg/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三木 義男 (MIKI, Yoshio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 10281594

(2)研究分担者

中西 啓 (NAKANISHI Akira)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号: 50321790