

BRCA1 および BRCA2 による アグリソーム形成制御機構の解析

[1] 組織

代表者：岡田 麻衣子
(東京工科大学応用生物学部)
対応者：千葉 奈津子
(東北大学加齢医学研究所)

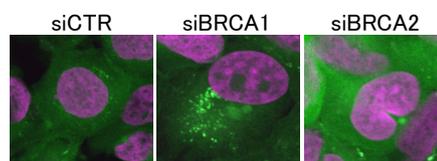
研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

アグリソームはユビキチン陽性のタンパク質凝集体であり、不良タンパク質などが微小管形成中心である中心体に輸送されて蓄積することで形成される。中心体に蓄積したアグリソームはオートファジーより分解されることでクリアランスされるが、老化や神経変性疾患ではこれらの機能が低下しており、アグリソームの著しい蓄積が認められる。しかしながら、中心体の制御異常がアグリソームの形成および神経変性疾患の発症や増悪に与える影響については全くの未知である。

そこで本研究では、中心体制御機構とアグリソーム形成制御機構との関連性を明らかにすることを目的とした。この解明にあたり、本研究ではがん抑制因子である BRCA1 および BRCA2 に着目した。BRCA1 は複数の複合体を形成して、DNA 修復や転写などの核内制御を担う多機能因子である。さらに、2014 年に千葉奈津子教授らにより、OLA1 を主要構成因子とする新たな BRCA1 複合体が同定され、この発見を機に BRCA1 複合体が中心体複製のライセンス機構に寄与することが明らかになりつつある (Matsuzawa A., *et. al.*, *Mol. Cell*, 2014; Yoshino Y., *et. al.*, *Oncogene*, 2019; Yoshino Y., *et. al.*, *Mol. Cancer Res.*, 2018)。また、BRCA2 についても Nucleophosmin や ROCK2 を主要構成因子とする複合体を形成して、中心体のポジショニングや複製に寄与することが報告されている (Wang H. F., *et. al.*, *Cancer Res.*, 2011)。中心体がアグリソーム形成と蓄積の場であることを踏まえると、これらの BRCA1 複合体や BRCA2 複合体の機能不全による

中心体複製異常により、アグリソームの制御異常が引き起こされる可能性が考えられる。実際に、昨年度までの共同研究により、BRCA1 や BRCA2 の発現低下がアグリソームの蓄積を亢進させる可能性について、レポーター細胞株 (Ub^{G76V}-GFP-USOS) を用いた実験により見出している¹⁾ (図 1)。



Green : Ub^{G76V}-GFP, Magenta : Hoechst 33258

図1 アグリソームの蓄積評価

一方、BRCA1 や BRCA2 は多機能因子であるため、これらの発現低下は中心体制御以外の細胞機能も破綻する。このため、アグリソーム蓄積が亢進する要因については不明瞭であった (図 2)。

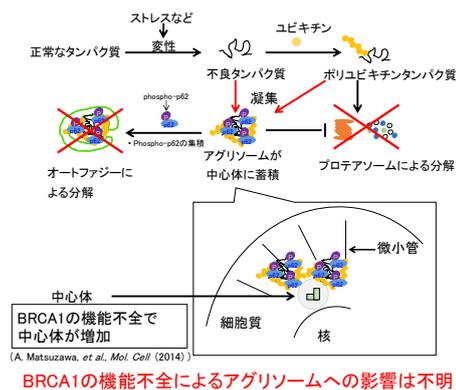


図2 中心体とアグリソーム蓄積の関係

そこで本年度は、中心体数の増加がアグリソームの形成や蓄積に与える影響について評価することを目的とした。まず、U2OS 細胞株において Gatastatin G2 による中心体数増加の誘導を検討した。Gatastatin G2 は、中心体構成因子である g-tubulin に対する強力な阻害剤であり、HeLa 細胞において中心体数の増加を伴う多極性紡錘体が形成

されることが報告されている (Shintani K., *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2011)。そこで、U2OS 細胞において中心体数の増加を誘導する Gatastatin G2 の条件を検討した。次に、Gatastatin G2 存在下におけるアグリソームの蓄積を評価した。さらに、Gatastatin G2 により増加した中心体とアグリソームの共局在について評価した。なお、以上の研究については、メールを主として打ち合わせを行った。

1) 岡田麻衣子、佐藤華澄、赤澤竜太、千葉奈津子、矢野和義：アグリソーム形成における BRCA1-OLA1 複合体の機能解析 第 93 回日本生化学会大会 (2020.9.14~9.16、web 開催)

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。まず、U2OS 細胞株において中心体数が増加する Gatastatin G2 の添加条件を免疫染色法により検討した。これにより、3 mM、24 時間の条件において、間期および分裂期における中心体数の増加を確認することができた (図 3A)。そこで、この条件下におけるアグリソームの蓄積について評価したところ、Gatastatin G2 によりアグリソームの大きさと数が増加しており、中心体数の増加はアグリソームの蓄積亢進を引き起こすことが示唆された (図 3B)。

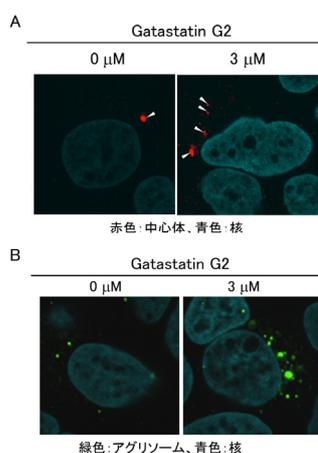


図 3 中心体数とアグリソーム蓄積の評価

Gatastatin G2 の阻害標的である g-tubulin は、BRCA1 複合体が中心体局在のアダプターとしても機能する。Gatastatin G2 の添加と BRCA1 の発現低下のどちらにおいてもアグリソームの蓄積が亢進したことから、Gatastatin G2 により BRCA1 複合体の中心体の機能のみが阻害されている可能性が考えられた。今後、BRCA1 複合体の中心体へのリクルートや DNA 修復機能に対する、Gatastatin G2 の影響を評価する必要性が示唆された。

これらの結果を踏まえて、中心体とアグリソームの共局在に着目した。中心体はアグリソームの蓄積の場であるため、Gatastatin G2 存在下における中心体とアグリソームの共局在について評価した。興味深いことに、アグリソームは中心体に局在しておらず、中心体以外の場所に異所的に局在することが示唆された (図 4)。

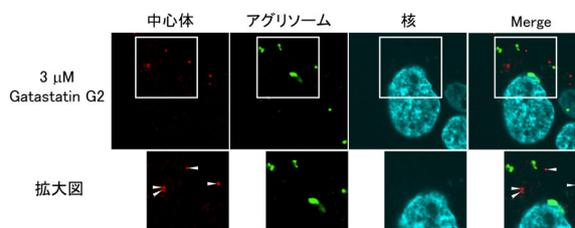


図 4 中心体とアグリソームの共局在の評価

以上の結果から、中心体数の増加により、アグリソームの中心体への集積機構が破綻する可能性が示唆された。一般に、アグリソームは微小管形成中心に輸送されて集積することで、オートファジーにより分解される。この知見を踏まえると、中心体数が増加した細胞ではアグリソームが異所的に細胞質に局在するため、中心体における分解を免れて著しく蓄積する可能性が考えられた。以上、本研究では BRCA1 による中心体制御機構がアグリソームのクリアランスに必要である可能性を見出した。

(3-2) 波及効果と発展性など

神経変性疾患は加齢に伴い増加するため、この分子機構の解明は超高齢化社会の我が国において急務である。本共同研究における学術的な成果は、これらの問題解決の切り口となる可能性を秘めており、OQL 向上への貢献が期待される。

また、中心体の過剰複製は発がんやがんの増悪にも密接に関係する。このことから、本研究成果は神経変性疾患の研究分野だけではなく、がん領域の基盤研究としても意義深いと言える。また、本研究で着目している BRCA1 および BRCA2 は DNA 修復能を有するが、これらをコードする遺伝子の生殖系列変異は難治性疾患である遺伝性の乳がんや卵巣がんを惹起することが知られている。このため、近年、DNA 修復不全細胞に対して合成致死性を示す抗がん剤が着目されている。本研究成果とがんの発症や増悪との関連が明らかになれば、アグリソーム蓄積制御の破綻において合成致死性を示す新たな抗がん剤の発見への貢献が期待される。

[4] 成果資料

特になし