

【目的】 BRCA1 は癌抑制遺伝子であり、生殖細胞系列の変異は遺伝性乳癌卵巣癌症候群を引き起こす。BRCA1 は相同組換え修復による DNA 損傷修復や中心体制御を介してゲノム安定性の維持に寄与している。DNA 損傷修復系において、BRCA1 は複数のアミノ酸残基が ATM や CHK1 などのキナーゼによってリン酸化されることが機能に必要なことが明らかになっているが、中心体制御系における BRCA1 の機能制御機構は明らかになっていない。本研究では、BRCA1 のリン酸化修飾が BRCA1 の中心体局在制御に及ぼす影響を解析した。

【方法】 乳癌細胞株 MCF7 を遺伝子編集し、中心小体のマーカーである Centrin2 の C 末端部に GFP 配列をノックインすることで、内在性に Centrin2::GFP 融合タンパク質を発現する細胞を作製し、観察に用いた。局在の解析には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。スクリーニングに用いた抗 BRCA1 抗体は市販、および自作の抗体を用いた。モノクローナル抗体のエピトープマッピングは、抗体作製時に用いられた抗原領域を分割したフラグメント、またはその一部を欠損させた変異体を HEK293T 細胞に発現させ、Western blotting によって抗体との反応性を調べることで行った。変異体の作製は PCR-directed mutagenesis によって行った。抗リン酸化 BRCA1 特異抗体はリン酸ペプチドを抗原とし、ウサギに免疫して作製した。

【結果】 抗 BRCA1 抗体によって免疫染色を行うと、多くの抗体で中心小体近傍に加え、中心体周囲の細胞質にもシグナルが認められた。抗体のスクリーニングの結果、BRCA1 の N 末端側を抗原とするモノクローナル抗体 (BRCA1-N mab) は中心小体近傍の BRCA1 とのみ反応することが明らかになった。BRCA1-N mab のエピトープマッピングを行ったところ、BRCA1 の N 末端側の 20 アミノ酸領域までエピトープを絞り込むことができた。さらに、この領域に含まれるスレオニン残基を変異させると抗体との反応性が完全に消失し、同スレオニン残基が BRCA1-N mab のエピトープとして重要であることが明らかになった。同スレオニン残基をリン酸化したペプチドを抗原として抗体を作製したところ、リン酸化 BRCA1 と特異的に反応する抗体が得られた。この抗リン酸化 BRCA1 特異抗体を用いて免疫染色を行ったところ、抗リン酸化 BRCA1 特異抗体は主として中心体周囲の細胞質に局在する BRCA1 と反応することが明らかとなった。これらから、中心体関連 BRCA1 は、中心体周囲の細胞質にリン酸化状態で、中心小体近傍に非リン酸化状態で存在することが示唆された。

中心体における BRCA1 の局在と修飾様態

