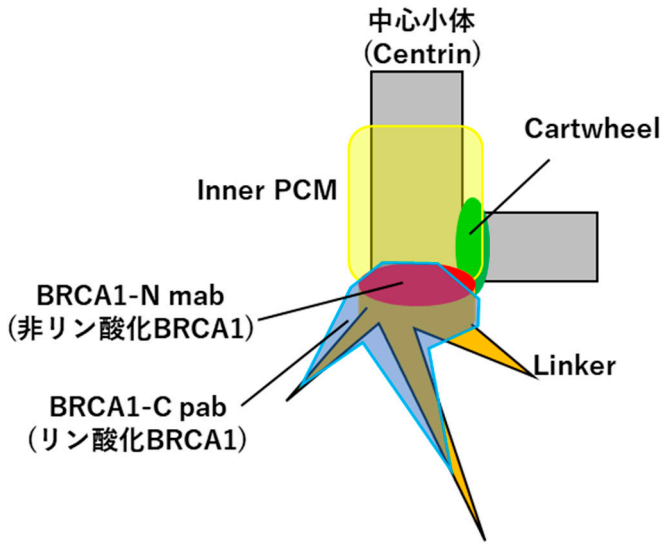
171　BRCA1のリン酸化の時空間的動態の解析	吉野　優樹

【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である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



171. BRCA1 のリン酸化の時空間的動態の解析

吉野　優樹

東北大学 加齢医学研究所 腫瘍生物学分野

Key words：遺伝性乳癌，BRCA1，中心体

緒　言

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。散発性乳癌においても *BRCA1* の変異や欠損が認められることから、BRCA1 は乳腺上皮細胞における癌化の抑制に重要と考えられている。最もよく研究されている BRCA1 の機能の一つに相同組換えによる DNA 損傷修復が挙げられる。相同組換え修復は DNA 二本鎖切断や複製フォーク停止などの重篤な DNA 損傷の修復に寄与する。相同組換え修復の障害は DNA 配列の欠損・挿入や転座など、種々の変異の蓄積を亢進させ、癌化につながると考えられている。しかし、乳癌において様々な相同組換え修復因子の異常が報告されているが、これらの因子に生殖細胞系列の変異を有する症例における乳癌の発症リスクは *BRCA1* 変異キャリアと比較して遥かに低い。また、BRCA1 はほぼすべての組織・臓器で発現しており、*BRCA1* のノックダウンは乳腺上皮細胞以外の細胞においても相同組換え修復障害を引き起こし、そこに組織特異性は認められない。すなわち、BRCA1 の異常が特に乳癌を高率に引き起こす原因は明らかになっていない。

BRCA1 の相同組換え修復以外の機能として、中心体制御機能がある［1］。これまでに、*BRCA1* 変異陽性乳癌で高率に中心体の異常が認められること、および *BRCA1* のノックダウンが乳腺由来の細胞株で特異的に中心体増幅を引き起こすことが報告されている。これらから、我々は BRCA1 による中心体制御機能の組織特異性が BRCA1 関連発癌の組織特異性の原因では無いかと仮説をたて、中心体制御における BRCA1 の相互作用因子の探索を行い、OLA1、および RACK1 を同定した［2〜4］。OLA1 や RACK1 を過剰発現、またはノックダウンすると、乳腺上皮由来の細胞株で特異的に中心体の異常を引き起こした。また、*RACK1* をノックダウンすると BRCA1 が中心体内部から中心体周囲の細胞質に拡散した異常な局在を示した［2］。RACK1 との結合能が低下する *BRCA1* 変異体は、中心体への局在が低下し、かつ中心体制御能が障害されていた［2］ことから、BRCA1／RACK1 相互作用は BRCA1 の中心体内部への局在制御を介して乳腺上皮細胞特異的に中心体制御に寄与すると考えられた。

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である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、RACK1 を介した BRCA1 の中心体局在の制御機構を解明し、BRCA1 による中心体制御の組織特異性の由来を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. 細胞株

MCF7 および HEK293T 細胞は ATCC から購入し、8% FBS を添加した DMEM で培養した。MCF7 に対して CRISPR/Cas9 によって内在性 *Centrin2* 遺伝子の C 末端に GFP をノックインし、樹立した細胞株（MCF7-Centrin2::GFP）を免疫染色に用いた。

2. プラスミドとトランスフェクション

用いたプラスミド、および siRNA は文献 2〜4 に記載されている。MCF7、および HEK293T へのトランスフェクションにはそれぞれ Trans-IT X2（Mirus）、PEI Max（polyscience）を用いた。

3. 抗体

抗 BRCA1 モノクローナル抗体（BRCA1-N mab）は BRCA1 の a.a. 1～304 を抗原とするマウスモノクローナル抗体である。抗 BRCA1 ポリクローナル抗体（BRCA1-C pab）は BRCA1 の a.a. 1,560～1,863 を抗原とするウサギポリクローナル抗体である。抗リン酸化 BRCA1 特異抗体は BRCA1-N mab のエピトープ内の BRCA1 のリン酸化候補残基をリン酸化したペプチドを抗原としたウサギポリクローナル抗体であり、非リン酸化抗原ペプチド固相化カラムによる吸着処理後、リン酸化抗原ペプチド固相化カラムによってアフィニティー精製したものを用いた。未発表データのため、各抗体のエピトープ、抗原ペプチド配列の詳細は記載していない。

4. 免疫沈降

細胞を溶解バッファー（10 mM HEPES（pH 7.6）、250 mM NaCl、1 mM EGTA、1 mM $MgCl_2$、0.5% NP-40、5% Glycerol）に溶解し、不溶性画分を遠心して除いたのち、抗 DYKDDDDK タグ抗体ビーズ（富士フィルム和光純薬）と反応させた。溶解バッファーで十分に洗浄し、Laemmli sample buffer で溶出したものを SDS-PAGE に供した。

5. Western blotting

Laemmli 法に準拠して SDS-PAGE を行い、セミドライ法で PVDF 膜にタンパク質を転写した。0.5% ポリビニルピロリドン／TBST でブロッキングした後、各抗体の希釈液と 4℃で一晩反応させた。洗浄後、HRP 標識二次抗体と室温で 1 時間反応させ、化学発光法で検出を行った。

6. 免疫蛍光染色

細胞を CSK バッファーで 1 分処理し、冷却したメタノールに浸漬し、−20℃で 20 分間固定した。0.5% Fish gelatin／TBST でブロッキングした後、各抗体の希釈液と 4℃で一晩反応させた。洗浄後、蛍光標識二次抗体（AlexaFluor Plus 488、555 or 647、Thermo-Fischer）希釈液と室温で 1 時間反応させ、ProLong Glass（Thermo-Fischer）で封入した。

結果および考察

1. 異なる抗体を用いて観察した BRCA1 の局在パターンの比較

我々のこれまでの解析で、抗 BRCA1 ポリクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色を行った場合、中心体内部、および中心体から細胞質に伸びるシグナルが認められることを複数の抗 BRCA1 ポリクローナル抗体を用いて確認していた。今回、RACK1 との結合部位である BRCA1 a.a. 1～304 を抗原とする複数のモノクローナル抗体による免疫染色を試したところ、一つのモノクローナル抗体（BRCA1-N mab とする）で中心体に明瞭なシグナルが観察された。BRCA1-N mab によるシグナルは BRCA1-C pab によるシグナルよりもより狭い範囲に限局し、中心体から細胞質に伸びる棘状のパターンは見られなかった。異なる抗体による染色パターンをより詳細に比較するため、MCF7-Centrin2::GFP 細胞を用い、共焦点レーザー顕微鏡によって詳細に観察したところ、BRCA1-N mab のシグナルは中心小体マーカーである centrin のシグナルと同程度の広がりであり、centrin よりわずかに偏位した部位に観察された（図 1）。一方、BRCA1-C pab のシグナルは BRCA1-N mab、および centrin のシグナルを包含し、かつ周囲に広がる棘状の分布を伴っていた。この棘状のシグナルはノコダゾール処理によって消失したことから、中心体から萌出する微小管に関連した BRCA1 であることが示唆された。これらから、BRCA1-N mab は中心体およびその周囲における BRCA1 プールのうち中心体内部の BRCA1 を特異的に認識する可能性が考えられ、中心体内部の BRCA1 は BRCA1-N mab のエピトープに特異的な修飾を伴う可能性が考えられた。

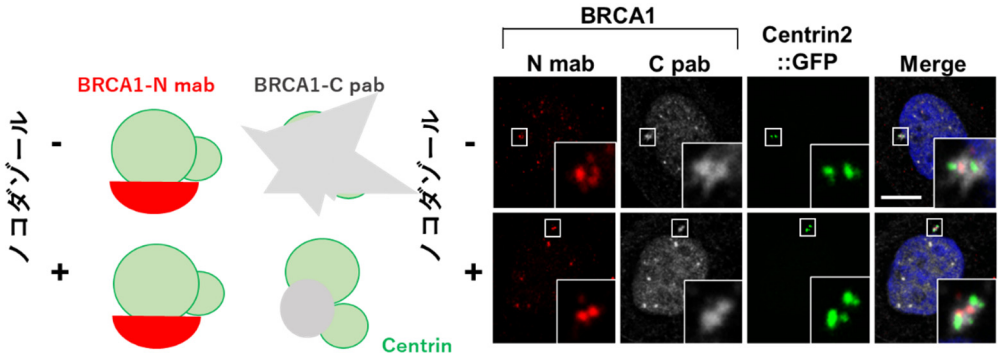


図 1. 異なる抗体による BRCA1 の局在解析

MCF7-Centrin2::GFP 細胞を BRCA1-N mab、および BRCA1-C pab によって二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した（スケールバー：5μm）。

2. BRCA1-N mab のエピトープマッピング

BRCA1-N mab は BRCA1 の N 末端側の a.a. 1～304 を抗原として作製された抗体である。抗原ペプチドを 100 アミノ酸ずつ 3 断片に分割して反応性を調べたところ、BRCA1-N mab は a.a. 200～304 断片と反応することが明らかになった（図 2A）。さらにこの領域の部分欠損変異体を作製し、BRCA1-N mab のエピトープ領域を絞り込んだ（図 2B）。エピトープ領域内のセリン、スレオニンをそれぞれアスパラギン酸に変異させたところ、スレオニン X（未発表データのため詳細は伏せる）をアスパラギン酸に置換すると BRCA1-N mab との反応性を完全に失うことが明らかになり（図 2C）、BRCA1-N mab はスレオニン X が非リン酸化状態にある BRCA1 を特異的に認識する可能性が示唆された。

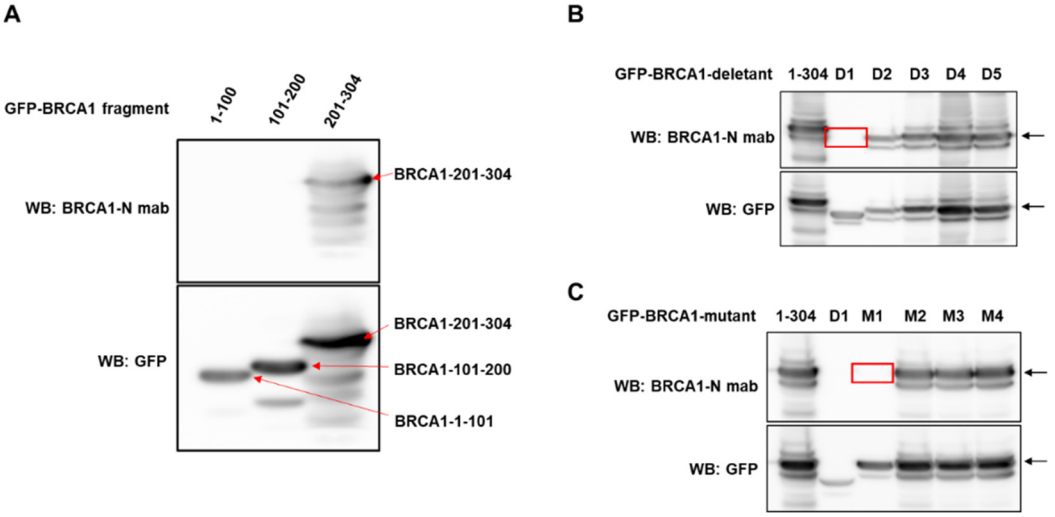


図 2. BRCA1-N mab のエピトープマッピング

A) BRCA1 の N 末端（a.a. 1～304）を 100 アミノ酸ずつ 3 分割した断片と GFP との融合タンパク質を発現させ、BRCA1-N mab、および抗 GFP 抗体で検出した。

B) BRCA1 のN末端から、a.a. 201～304 領域の一部を欠損させた断片とGFPとの融合タンパク質を発現させ、BRCA1-N mab、および抗GFP抗体で検出した。D1～5 はそれぞれの欠損変異体を示す。

C) BRCA1 の N 末端に点変異を導入した断片と GFP との融合タンパク質を発現させ、BRCA1-N mab、および抗 GFP 抗体で検出した。M1～4 はそれぞれの点変異体を示す。

3. 新たな抗リン酸化 BRCA1 特異抗体の作製とバリデーション

中心体内部の BRCA1 が BRCA1-N mab と反応する非リン酸化型である一方、中心体周囲の BRCA1 は BRCA1-N mab で検出されないことから、リン酸化型である可能性が考えられた。これを証明するため、スレオニン X がリン酸化されたリン酸化ペプチドを抗原とし、スレオニン X がリン酸化型である BRCA1 を特異的に認識する抗リン酸化 BRCA1 特異抗体の作製を試みた。2 羽のウサギに免疫し、それぞれから得られた抗血清を二重抗原アフィニティー精製し、精製抗体を得た。HRK293T 細胞で FLAG-BRCA1 を発現させ、抗 FLAG 抗体ビーズで FLAG-BRCA1 を単離し、さらにその一部をλ phosphatase で処理し、脱リン酸化した。これらのタンパク質を用いて Western blotting を行ったところ、ロット 2 の精製抗体は脱リン酸化処理した FLAG-BRCA1 とは全く反応せず、リン酸化 BRCA1 を特異的に認識することが明らかになった（図 3）。

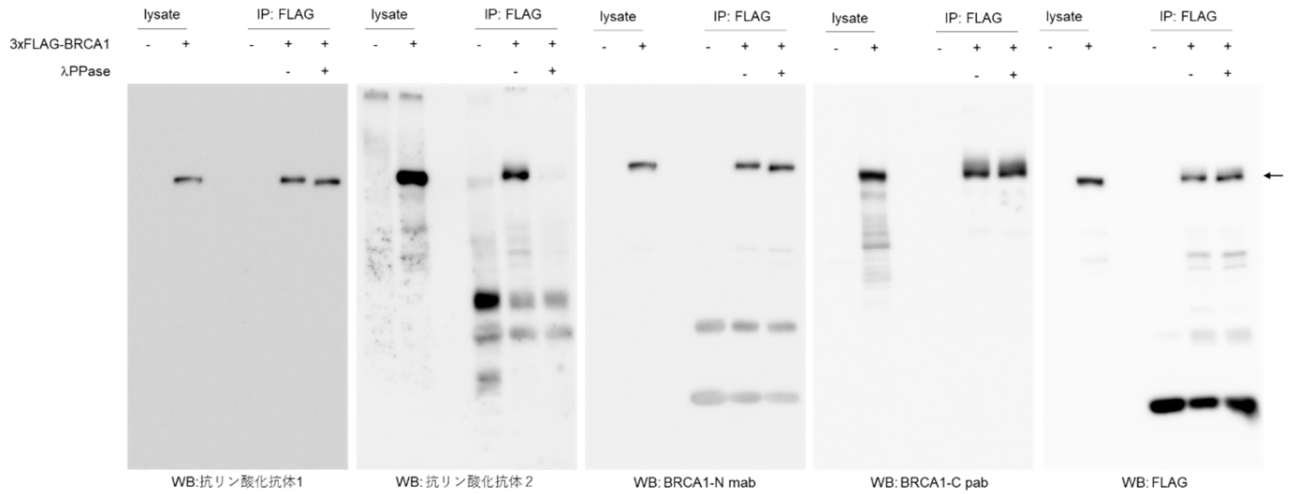


図 3. 抗リン酸化 BRCA1 抗体のバリデーション

HEK293T 細胞に 3×FLAG-BRCA1 発現ベクターを導入し、48 時間後に回収した。細胞からタンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体ビーズで免疫沈降を行って 3×FLAG - BRCA1 タンパク質を単離した。その一部をλ phosphatase で脱リン酸化処理した。Input、未処理サンプル、脱リン酸化処理サンプルを SDS-PAGE で分離し、各抗体で検出した。矢印が 3×FLAG - BRCA1 を示す。

4. 抗リン酸化特異抗体を用いた免疫蛍光染色パターン

作製した抗リン酸化 BRCA1 特異抗体を用いて免疫染色を行った。MCF7-Centrin2::GFP 細胞を抗リン酸化 BRCA1 特異抗体と BRCA1-N mab で二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した（図 4）。その結果、抗リン酸化 BRCA1 特異抗体のシグナルは BRCA1-N mab のシグナルよりもやや Centrin から離れており、周囲の細胞質により広く分布していた。これらから、中心体内部の BRCA1 は非リン酸化型であり、中心体周辺部の BRCA1 がリン酸化型を取っている可能性が示唆された。

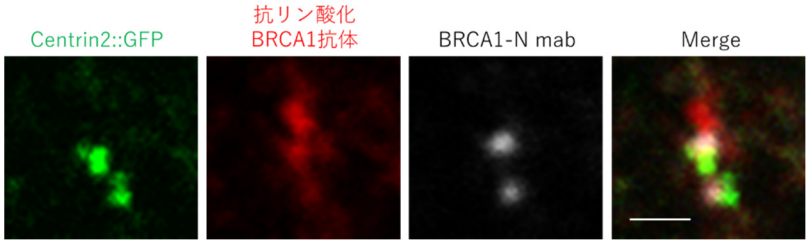


図 4. 抗リン酸化 BRCA1 抗体による BRCA1 局在解析

MCF7-Centrin2::GFP 細胞を BRCA1-N mab、および抗リン酸化 BRCA1 特異抗体（Lot2）によって二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。スケールバー：1μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学加齢医学研究所腫瘍生物学分野の千葉奈津子教授である。

文　献

1) Yoshino Y, Fang Z, Qi H, Kobayashi A, Chiba N. Dysregulation of the centrosome induced by BRCA1 deficiency contributes to tissue-specific carcinogenesis. Cancer Sci. 2021 May;112(5):1679-1687. doi: 10.1111/cas.14859. Epub 2021 Mar 16. PMID: 33606355; PMCID: PMC8088922.

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 SI, Yasui A, Chiba N. RACK1 regulates centriole duplication by controlling localization of BRCA1 to the centrosome in mammary tissue-derived cells. Oncogene. 2019 Apr;38(16):3077-3092. doi: 10.1038/s41388-018-0647-8. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30617304.

3) Yoshino Y, Qi H, Fujita H, Shirota M, Abe S, Komiyama Y, Shindo K, Nakayama M, Matsuzawa A, Kobayashi A, Ogoh H, Watanabe T, Ishioka C, Chiba N. BRCA1-Interacting Protein OLA1 Requires Interaction with BARD1 to Regulate Centrosome Number. Mol Cancer Res. 2018 Oct;16(10):1499-1511. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0269. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29858377.

4) 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 1;133(17):jcs238931. doi: 10.1242/jcs.238931. PMID: 32788231.