

## 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・蓄積することでアグリソームが形成される。アグリソームは老化や神経変性疾患で著しく蓄積することから、その形成機構の解明は超高齢化社会における QOL の向上に必要不可欠と言える。しかしながら、アグリソームが中心体に蓄積する意義は不明であり、特に中心体の制御異常がアグリソームの形成にいかなる影響を与えるかは全くの未知である。そこで本共同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検討することを目的とした。具体的には、両機構の仲介因子の候補として、BRCA1 および BRCA2 に着目した。図 1 に本共同研究の概念図を示す。

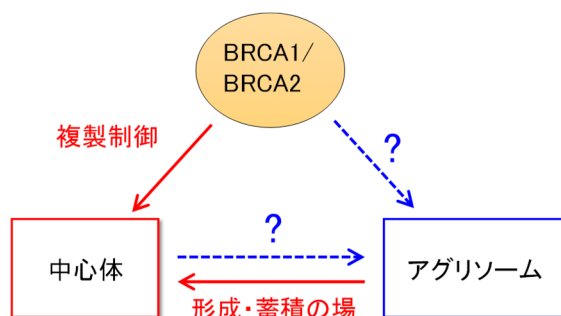


図1 本共同研究の概念図

BRCA1 と BRCA2 はどちらもがん抑制因子であるが、一方で、中心体制御との関連が報告されている BRCA1 については BARD1 および OLA1 を主要構成因子とする複合体を形成しており、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.*, *Molecular Cell*, 2014; Yoshino Y., *et al.*, *Oncogene*, 2019; Yoshino Y., *et al.*, *Molecular Cancer Research*, 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 HF., *et al.*, *Cancer Res.*, 2011)。これらの知見と、中心体がアグリソームの形成・蓄積の場であることを踏まえると、これらの複合体の機能不全による中心体複製異常は、ゲノム不安定性だけではなくアグリソームの形成・蓄積異常を引き起こす可能性が考えられる。

そこで、千葉奈津子教授の有する一連の中心体解析技術を用いて BRCA1 複合体や BRCA2 複合体の構成因子の発現低下がアグリソームの形成・蓄積に与える影響について解析した。以下、研究活動状況の概要を記す。まず、アグリソームの検出が可能なレポーター細胞株において、BRCA1 複合体や BRCA2 複合体の構成因子群を siRNA によりノックダウンし、アグリソームの蓄積に与える影響を評価した。また、これらの細胞において中心体とアグリソームの共局在の検出を試みた。続いて、BRCA1 複合体や BRCA2 複合体によるアグリソーム形成制御機構について解析を試みた。一般的に、細胞内のタンパク質分解機能が低下すると、アグリソームが増加することが知られている。そこで、中心体制御機構とタンパク質分解機構のいずれの機構が、BRCA1 や BRCA2 複合体によるアグリソームの形成制御に重要であるか、検討を試みた。以上の共同研究で得られた成果については、第 93 回日本生化学会大会において報告した。

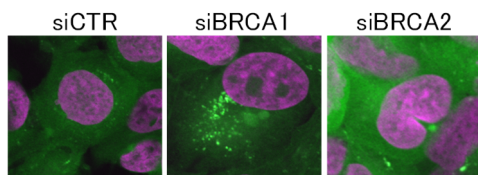
以上の本共同研究の遂行に当たっては、まず千葉奈

津子教授の所属機関である東北大学加齢医学研究所において、研究方針の打ち合わせを直接行った。また、研究遂行に必要な実験材料についてもご供与いただいた。その後は、千葉奈津子教授とメール連絡をすることで、研究の遂行や研究成果の発表について打ち合わせした。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

まず BRCA1 および BRCA2 について、アグリソームとの関係を Ub<sup>G76V</sup>-GFP-U2OS 細胞株を用いて評価した。この細胞株は、ユビキチンの G76V 変異体と GFP との融合タンパク質 (Ub<sup>G76V</sup>-GFP) をレポーターとして発現する U2OS 細胞株である。Ub<sup>G76V</sup>-GFP はプロテアソームの良好な分解基質であるため半減期が非常に短い (Dantuma N. P., *et. al*, *Nature Biotechnology*, 2000)、その一方で中心体にアグリソームに由来するスペckルを形成することが報告されている (Salomons F. A., *et. al*, *Mol. Cell. Biol.*, 2009)。そこで、Ub<sup>G76V</sup>-GFP のスペckルをアグリソームの指標とすることで、siRNA を用いた BRCA1 と BRCA2 の発現低下による影響を検討した。その結果を図 2 に示す。



Green : Ub<sup>G76V</sup>-GFP, Magenta : Hoechst 33258

図2 BRCA1やBRCA2の発現低下によるアグリソームの蓄積評価

siBRCA1 では、細胞質に著しい Ub<sup>G76V</sup>-GFP のスペckルが観察された。興味深いことに、スペckルの量だけでなく数も増加していた。アグリソームは、細胞毒性の高い micro aggregate がモータータンパク質—細胞骨格系により中心体に輸送・集積することで形成される。したがって、siBRCA1 では中心体複製異常によりアグリソームの数が増加した可能性と、アグリソームの形成不全により micro aggregate が増加した可能性が示唆された。

一方、siBRCA2 では Ub<sup>G76V</sup>-GFP のスペckルの輝度やサイズが亢進し、アグリソームの蓄積が認められた。さらに、細胞質全体の Ub<sup>G76V</sup>-GFP の蛍光強度も亢進していたことから、プロテアソームの機能が低下したことが

示唆された。このことから、siBRCA2 によるアグリソームの蓄積は、プロテアソーム不全による不良タンパク質の増加による可能性が示唆された。

以上の結果を踏まえ、BRCA1 に焦点を当ててアグリソーム形成制御との関連を検討した。BRCA1 は多数の複合体を形成し、複合体ごとに異なる細胞内機能を発揮する。そこで、アグリソームの形成制御に、OLA1 を主要構成因子とする BRCA1 複合体が関与するか検討した。すなわち、BRCA1 による中心体複製制御がアグリソームの形成制御に関与するかを検討した。その結果、siBRCA1 と同様に、siOLA1 でも Ub<sup>G76V</sup>-GFP のスペckルが多数蓄積し、アグリソーム形成における中心体制御の重要性が示唆された。現在、BRCA1 の機能不全により検出される Ub<sup>G76V</sup>-GFP のスペckルと中心体との共局在を検討することで、アグリソームや micro aggregate の数と中心体の数との相関性について検討を進めている。また、本共同研究の成果により BRCA1 複合体の機能不全による中心体の過剰複製が、アグリソームの形成異常を引き起こす可能性が示唆されたが、その詳細は不明である。そこで、中心体構成因子である  $\gamma$ -tubulin の阻害剤等を用いて、中心体の形成不全におけるアグリソームへの影響についても現在検証している。

#### (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、そ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。本共同研究での学術的な研究成果や技術開発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、研究成果の社会還元が期待される。

### [4] 成果資料

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)