

BRCA1 による中心体制御を介した アグリソームクリアランス機構の解析

[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 20 万円

[2] 研究経過

アルツハイマー病などの神経変性疾患では、細胞内の不良タンパク質が凝集したアグリソームが蓄積する。一般に、アグリソームは微小管形成中心である中心体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 (図 1)。

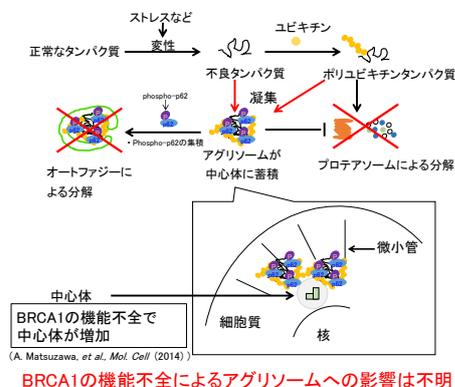


図 1 中心体とアグリソーム蓄積の関係

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、中心体の制御機構の破綻がアグリソームの蓄積異常を引き起こす可能性を検討し、神経変性疾患の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

本研究ではこの解明にあたり、がん抑制因子である BRCA1 に焦点を当てて解析した。BRCA1 は多様なタンパク質群と複数の複合体を形成して、DNA

修復や転写などの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 (BRCA1-OLA1 複合体) が同定され、BRCA1-OLA1 複合体が正常な中心体複製に寄与することが明らかになっている。一方、孤発性アルツハイマー病における BRCA1 の機能不全が報告されているが、BRCA1-OLA1 複合体による中心体制御やアグリソーム形成との関係については解明されていない。

また、千葉奈津子教授らの研究により、細胞周期の G₂ 期特異的に OLA1 が分解されることが、中心体の成熟、ひいては正常な中心体の複製に必要であることが明らかになりつつある。例えば、G₂ 期の OLA1 の T124 のリン酸化はユビキチン修飾依存的な OLA1 の分解のトリガーとなるため、OLA1T124A 変異体は中心体成熟不全、リン酸化を模倣した T124E 変異体は中心体成熟異常亢進を引き起こす。このように、これらの変異体はそれぞれ異なる分子機序で中心体の過剰複製を惹起する。昨年度の共同研究において、各種 OLA1 変異体の過剰発現系では、アグリソームの過剰蓄積や選択的オートファジーに異常が生じる可能性が示唆されているが、定性的な解析にとどまっておき、さらなる解析が課題として残されていた。

そこで本年度は、中心体過剰複製機構のうち、OLA1 による中心体の成熟機構を切口に、BRCA1-OLA1 複合体の中心体制御機能の破綻がアグリソームクリアランス機構の破綻を惹起する可能性を定量的に解析することを目的とした。なお、本研究の研究遂行に際しては、千葉奈津子教授とメールおよび学会において打合せを行った。

[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、中心体過剰複製によるアグリソーム蓄積への影響を、申請者が有するレポーター細胞 (Ub^{G76V}-GFP-U2OS) において定量的に評価した (図 2)。

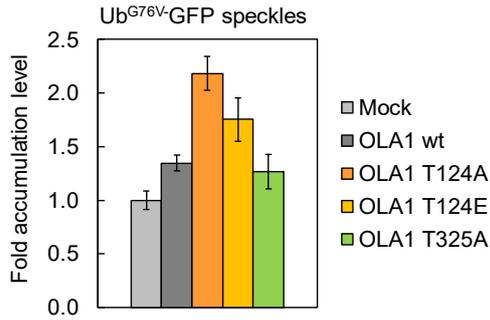


図2 Ub^{G76V}-GFP speckles の蓄積評価

図2より、OLA1T124A 変異体では、WT と比べてUb^{G76V}-GFP speckles が過剰に蓄積することが示された。OLA1T124E 変異体においてもUb^{G76V}-GFP speckle が蓄積していたものの、T124A 変異体と比較するとわずかであった。そこで、中心体成熟の異常亢進と Ub^{G76V}-GFP speckles の蓄積との関連性をより明確にするために、中心体成熟の異常亢進を示す別の変異体として、OLA1T325A 変異体についても定量的に評価した。その結果、この変異体ではUb^{G76V}-GFP speckles の蓄積に変化は認められなかった。

以上の結果から、中心体過剰複製機構において、特に G₂ 期における中心体の成熟不全が、異所性のアグリソーム蓄積の主要因となることが示唆された。一般的に、中心体の成熟には pericentriolar material (PCM) タンパク質群の中心体へのリクルートが必要である。つまり、中心体の成熟不全と成熟の異常亢進では、PCM タンパク質群のリクルートの有無に大きな違いがあると言える。したがって、中心体における PCM タンパク質群が、アグリソームの中心体への適切な集積に寄与する可能性が考えられた。

次に、中心体の成熟と選択的オートファジーとの関連性について検証した。具体的には、上記のOLA1 変異体の過剰発現による中心体過剰複製条件下において、選択的オートファジーのアダプター因子である p62 のスペックル構造 (p62 speckles) を定量的に評価した (図3)。その結果、OLA1T124A 変異体において、p62 speckles の蓄積が亢進することが示された。このことから、中心体成熟不全では、オートファジーによるタンパク質分解機能に異常が生じることで、異所性のアグリソームの蓄積が生じる可能性が示唆された。ただし、p62 はオートファジー形成の際に集積する一方で、オートファジー活性化により p62 自身もオートファジーによる分解を受ける。このため、p62 speckles の蓄積亢進は、オートファジー機能の亢進と減弱の両方の可能性を含んで

いる。したがって、今後はオートファジー阻害剤を用いた autophagy flux assay により、変異体発現条件下におけるオートファジーの活性の詳細を解析する必要がある。

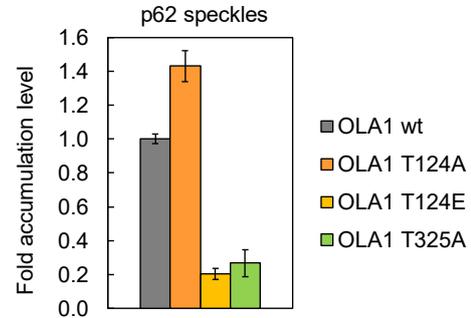


図3 p62 speckles の蓄積評価

また、予想に反して、T124E や T325A では p62 speckles の蓄積が著しく減少していたことから、アグリソームの蓄積とオートファジーの異常は必ずしも相関しないことが示された。今後、オートファジーの活性の詳細を解析する必要があるものの、これらの変異体では、プロテアソームなどの分解系が、オートファジーによるアグリソームのクリアランスを代替している可能性についても検討する必要がある。

以上、本年度は、昨年度に引き続きOLA1 変異体について解析することで、中心体の成熟不全が異所性のアグリソーム蓄積を引き起こす可能性を明らかにした。

今後はスナップショットにおける観察だけではなく、single cell におけるライブ観察を行うことで、中心体成熟、アグリソームの蓄積、オートファジーの活性化の一連の制御機構の時系列を解明することが、中心体におけるアグリソームクリアランス機構の解明に重要であると考えられる。

3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、中心体制御の研究分野とタンパク質分解の研究分野の融合研究であり、新しい研究領域の開拓の推進力となることが期待される。また、医療の観点からも、がん治療だけではなく神経変性疾患における中心体制御機構の重要性が初めて明らかになっており、医療の観点からも本研究分野は大きな可能性を秘めていると言える。今後、さらなる研究分野の発展により、超高齢化社会における難治性疾患増悪の解決への貢献が期待される。

[4] 成果資料

特になし