

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体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)。

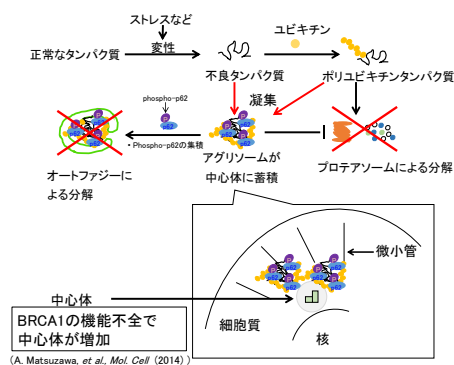


図1 中心体とアグリソーム蓄積の関係

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を行った。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りつつある。一方、孤発性アルツハイマー病において 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。昨年度までの共同研究において、BRCA1 複合体構成因子群の発現低下や γ -tubulin 阻害剤により、中心体数が増加した条件ではアグリソームの過剰蓄積が生じる可能性を見出している。

そこで本年度は、BRCA1-OLA1 複合体の機能不全による中心体数の増加により、アグリソームのクリアランス機構が破綻する可能性について解析した。まず、U2OS 細胞において、BRCA1 のノックダウン条件下におけるアグリソームと中心体との共局在について検討した。これにより、中心体制御異常によりアグリソームの中心体への輸送に異常が生じる可能性について検討した。続いて、千葉奈津子教授が有する OLA1 発現プラスミドを用いて、各種 OLA1 変異体の過剰発現における、アグリソームのクリアランスへの影響を評価した。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国内外の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、U2OS 細胞において siRNA により BRCA1 をノックダウン後、蛍光免疫染色法により中心体とアグリソームとの共局在を検討した。その結果、アグリソームが中心体とは異なる場所に集積する可能性が示唆された。昨年度までに γ -tubulin 阻害剤 Gatastatin G2 による中心体数の増加において同様の表現型を得ており、BRCA1 による中心体制御機構の破綻がアグリソームの異所性の蓄積を引き起こす可能性が考えられた。ただし、定量解析に向けた実験条件の最適化が今後の課

題として挙げられた。また、BRCA1 は多機能因子であるため、アグリソーム蓄積制御を担う BRCA1 の機能を特定する必要が課題として挙げられた。

そこで、BRCA1 が各機能に固有の複合体を形成することに着眼し、BRCA1 複合体の中心体制御機能を規定する OLA1 についてアグリソーム蓄積制御との関連性を検証した。具体的には、千葉奈津子教授の有する各種 OLA1 変異体発現プラスミドを用いて、BRCA1-OLA1 複合体の機能不全におけるアグリソーム蓄積への影響をレポーター細胞 (Ub^{G76V}-GFP-U2OS) において評価した。その結果、OLA1 の T124A 変異体および T325A 変異体において、アグリソーム様の Ub^{G76V}-GFP の過剰蓄積が認められた (図 2)。

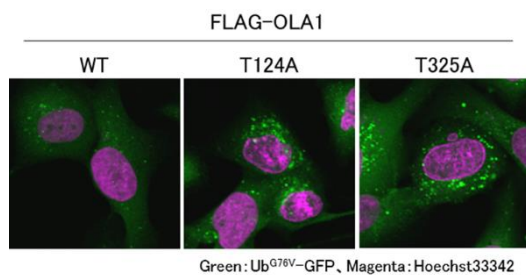


図2 OLA1 変異体におけるアグリソームの蓄積評価

千葉奈津子教授らの研究により、これらの変異体では BRCA1-OLA1 複合体の機能不全に伴う、中心体数の増加が報告されている。したがって、各種 BRCA1 複合体のうち、少なくとも中心体制御を担う BRCA1-OLA1 は、正常なアグリソームの蓄積制御に重要であることが示唆された。

BRCA1-OLA1 複合体によるアグリソーム制御機構の解明にあたり、各 OLA1 変異体におけるオートファジーへの影響を評価した。p62 はユビキチン認識タンパク質であり、ユビキチンの認識を介して特定のオルガネラをオートファジーに誘導する、選択的オートファジーのアダプタータンパク質である。そこで p62 の局在を指標に、各 OLA 変異体がオートファジーによるクリアランス制御に関与する可能性について検証した。その結果、OLA1 の T124A 変異体では、オートファジーやアグリソームとの共局在が報告されている、p62 のスペckル構造が増加していた。一方、T325A 変異体では細胞質全体において p62 の発現量が亢進していた (図 3)。両変異体の表現型がオートファジーによるタンパク質分解機能の亢進と低下のどちらに起因するかについては、今後、オートファジーマーカーとオートファジー阻害剤を組み合わせた Flux assay による評価が必要不可欠である。しかし、いずれにしても T124A 変異体と T325A 変異体では異なる作用機序でアグリソームのクリアランス機構

に影響する可能性が示唆された。

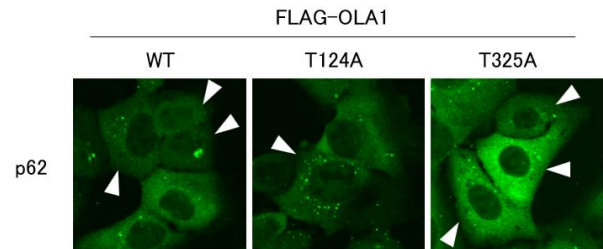


図3 OLA1 変異体におけるオートファジーアダプター p62 の局在の蓄積評価

以上、BRCA1-OLA1 複合体の機能破綻では中心体数の増加に伴い、選択的オートファジーによるアグリソームのクリアランス機構に異常が生じることが示唆された。今後、アグリソームとオートファジーの共局在を評価することで、分子機構の詳細を明らかにすることができると思われる。

(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、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にある可能性を秘めており、QOL 向上への貢献が期待される。特に孤発性アルツハイマー病においては BRCA1 機能不全との関連も報告されているため、本研究で着目している BRCA1-OLA1 複合体を標的とした神経変性疾患の治療薬開発への応用も期待される。

一方、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。BRCA1 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。さらに近年、BRCA1 の病的バリエーションがピロリ菌感染による胃がんのリスク因子であることが報告されている。このように本研究はがん領域とも関連が深く、今後、本研究成果とがん発症や増悪との関連性が解明されれば、アグリソームのクリアランス機構の破綻に基づく新たながん治療戦略の開発への応用が期待される。

[4] 成果資料

特になし