

そこで本研究では、OLA1 変異体発現条件下における CEP63 の過剰蓄積の有無を評価することで、同条件下における p62 の異常蓄積がセントロファジーの破綻によるものである可能性を検証した。加えて、p62 の蓄積はオートファジー活性の亢進と抑制の双方の状態を反映するため、各 OLA1 変異体におけるオートファジー機能の変化を Autophagy flux assay により評価した。なお、Autophagy flux assay は、オートファジーの活性状態を動的に評価する方法であり、オートファゴソームの形成およびそれに続くリソソームでの分解過程の両方を反映する。本研究では、オートファジー阻害剤である Bafilomycin A1 を用いてリソソームによる分解を一時的に阻害することで、p62 や LC3-II などのオ

オートファジーマーカーの蓄積量を比較し、OLA1 変異体過剰発現下でのオートファジーの機能の変化を定性的に解析した (図 2)。

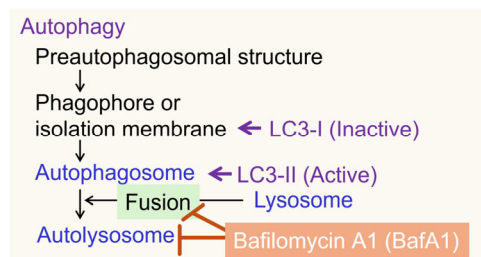


図 2

BRCA1-OLA1 複合体の機能不全を引き起こす OLA1 変異体として、OLA T124A 変異体に着目した。千葉奈津子教授らの研究および本共同研究により、G2 期の T124 のリン酸化が OLA1 分解のトリガーとなること、リン酸化阻害を生じる T124A 変異体の発現により中心体成熟不全とアグリソームの異所性蓄積および p62 の蓄積が示唆されている。これらの知見から、本研究では T124A 変異体をモデルとして用い、中心体制御異常がアグリソームのクリアランスに及ぼす影響についての解析を試みた。

なお、本研究の遂行に際しては、千葉奈津子教授と主にメールにより打ち合わせを行った。

[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、CEP63 のタンパク質を Western blotting により評価したところ、OLA1 T124A 変異体 (T124A) の過剰発現下では、OLA1 WT (WT) の過剰発現に比べて CEP63 のタンパク質量が増加することが示唆された。さらに、蛍光免疫染色法により CEP63 を観察したところ、WT で観察された CEP63 陽性のドット状シグナルが、T124A では増加する傾向にあった。

次に、上記の分解異常の意義を評価するために、Bafilomycin A1 を用いた Autophagy flux assay を実施し、p62 および LC3-II の蓄積の動態を検討した。T124A では、Bafilomycin A1 の有無にかかわらず、オートファゴソームの指標である LC3-II は減少傾向、p62 は増加傾向にあった。このことから、T124A ではオートファジー機能が低下したことで、選択的オートファジーの基質認識因子である p62 が分解されずに蓄積したことが考えられた。今後は同様の評価系において、CEP63 の蓄積についても評価する必要がある。これらの結果を踏まえると、T124A により中心体の過剰複製が生じると、セント

ロファジーの機能不全が生じることで、アグリソームのクリアランス機構が破綻することが示唆された。

以上、本共同研究により、BRCA1-OLA1 複合体が中心体複製制御機構を介してアグリソームのクリアランスに寄与する可能性を見出した (図 3)。

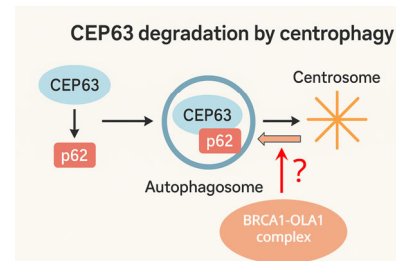


図 3

今後は、より明瞭な結果を得るために染色手法を改善し、定量解析を行う必要がある。また、 γ -tubulin およびオートファジーマーカーとの共局在を検討し、T124A では CEP63 が p62 と共に中心体以外の領域に異所的に蓄積している可能性を評価する必要がある。また、Autophagy flux assay による CEP63 さらなる評価も重要である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、中心体の恒常性維持機構とタンパク質分解機構の機能的共役に着目した新規性の高い取り組みであり、中心体制御分野とオートファジー分野の学際的融合によって新たな研究領域を切り拓く可能性を秘めている。BRCA1-OLA1 複合体や CEP63 など、がんや神経変性疾患に関与する分子群を軸に、細胞内恒常性の破綻が疾患に至る分子過程を解明することで、加齢関連疾患の根本的理解と治療戦略への確立に向けた貢献が期待される。

また、申請者は本研究期間中に現所属機関にて独立し、新たに皮膚科学および化粧品科学の分野の研究室を主宰するに至った。今後は、本研究で得られた知見を基盤として、皮膚における細胞老化とオートファジー機構との関連性の解明へと研究対象を拡充する予定であり、本研究に基づく皮膚老化の制御や評価方法の確立を通じた産学連携により、化粧品研究やスキンケア技術への応用も見込まれる。このように、加齢研究を軸とした分野横断的な展開によって、医薬品と化粧品という異なる応用領域への波及効果が期待される。

[4] 成果資料

特になし