

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07098

研究課題名(和文) 神経細胞における選択的オートファジーの制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanism of the selective autophagy though p62/SQSTM1 expression

研究代表者

松本 弦 (MATSUMOTO, Gen)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：50415303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの神経変性疾患では領域特異的なユビキチン化タンパク質の凝集体の蓄積が観察されることから、タンパク質分解機構の破綻が疾患原因の一つであると考えられてきた。我々は、脳内物質であるアシルドーパミンがタンパク質分解を阻害することなく、p62の発現を誘導してアグリソームの形成を促進することを発見し、タンパク質分解機構の破綻を伴わない凝集体形成機構の存在が示唆された。さらに、p62のS403リン酸化促進する化合物を同定し、p62リン酸化がアグリファジーの亢進による細胞内タンパク質凝集体の分解を促進することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患におけるタンパク質凝集体の形成は、タンパク質分解機構の変容が原因の一つであると考えられてきたが、本研究で明らかになったアシルドーパミンによるアグリソーム形成促進効果は、特にグリア細胞における凝集体形成を説明するものであり、いくつかの神経変性疾患の病態形成のメカニズム解明に寄与するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：As neuronal accumulation of ubiquitinated protein aggregates is the common pathology of many neurodegenerative diseases, disruption of the proteolytic mechanism has been considered as a cause of the neurodegeneration. In this research, we found that acyldopamines, a brain substance, induce the expression of p62 and promotes the aggresome formation without inhibiting protein degradation, suggesting that protein aggregates can be generated without disruption of the protein degradation systems. Furthermore, we also found compounds that promote S403 phosphorylation of p62 without aggresome formation. The enhanced p62 phosphorylation by the compound treatment induces the degradation of intracellular protein aggregates through autophagy pathway. The discovery of the compounds may lead to novel therapeutical drug discovery for several neurodegenerative diseases.

研究分野：病態神経科学

キーワード：神経変性疾患 選択的オートファジー アグリソーム アシルドーパミン p62

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患では、それらの顕著な病理学的所見としてユビキチン化タンパク質を含む封入体の蓄積が疾患神経細胞に観察されることから、タンパク質分解機構の破綻が疾患原因の一つであると考えられている。病理学的には、病態組織を抗ユビキチン抗体で免疫染色すると、変性領域の細胞にユビキチン化されたタンパク質を含むタンパク質封入体が観察される。しかしながら、疾患領域以外の脳組織は概ね正常であり、ユビキチン化タンパク質の蓄積は観察されない。これらのことは、神経変性疾患におけるユビキチン化タンパク質の蓄積が、本当に疾患領域の神経細胞で特異的なタンパク質分解機構の破綻に起因しているのかどうかという疑問を提起する。つまり、これまで考えられてきたタンパク質分解機構の破綻が起きているという仮説を、タンパク質分解機構の障害ではないタンパク質凝集体形成機構の存在を想定して検証する必要がある。我々は、脳内物質であるエンドカンナビノイドの一種であるアシルドーパミンが、タンパク質分解を障害せずに p62 の発現を誘導してユビキチン化タンパク質とともに一過性の凝集体構造を形成させることを発見した。アシルドーパミンは、プロテアソームや恒常的オートファジーによるタンパク質分解を阻害せず、脳内で合成される物質であることなどから、脳内の特定の領域にある神経細胞ではタンパク質分解の破綻がおこらなくてもタンパク質凝集体の形成が起ころうという可能性が示唆された。アシルドーパミンにより発現誘導された p62 は、S403 リン酸型となり、ユビキチン化タンパク質を積極的に取り込んで凝集するが、アシルドーパミンを除去すると速やかに選択的オートファジーにより分解されることもわかった。これらの結果は、アシルドーパミンによる凝集体形成は選択的オートファジーによるタンパク質分解の前段階となっていることを示唆している。つまり、タンパク質分解機構に致命的な破綻が生じなくても、細胞にはユビキチン化タンパク質の凝集体形成を促進する細胞内システムが存在しているということを示していると考えられる。ではなぜ、このようなシステムが細胞に備わっているのだろうか？その理由の一つとして、このアシルドーパミンにより活性化される凝集体形成システムは、選択的オートファジーを介してタンパク質の分解を促進する、いわば細胞内の大掃除のためのものであると考えることができる。細胞には細胞内に不要なタンパク質が蓄積してくると、それらを一時的に集約して隔離することにより一過性に作られるアグリソームという誘導型の細胞内構造物の形成機構が存在する。このアグリソーム形成のメカニズムについては全くわかっていないが、プロテアソーム阻害や異常タンパク質の過剰発現などにより、プロテアソームによる分解が飽和するような条件下で、アグリソームの構造形成が誘導されることが知られている。アグリソームの形成は、パーキンソン病の病理学的特徴であるレビー小体(Lewy body)との構造的類似性が議論されることもあり、アグリソーム形成による不要タンパク質の細胞質からの一時的な隔離機構が、神経細胞内の凝集体形成とどのような相関を持つのかという問題を解決することも重要であると思われる。

### 2. 研究の目的

本研究では、アシルドーパミンによる p62 の発現誘導に伴うタンパク質凝集体形成の分子機構を解析し、凝集タンパク質の分解機構を解明することを目指す。また、アシルドーパミンによる p62 の発現誘導では S403 リン酸化も促進するので、この S403 リン酸化の責任キナーゼも同定する。そして、これらの知見から p62 の発現誘導をともなう選択的オートファジーの制御機構が神経細胞でも機能しているかどうか

かについて検証する。

### 3. 研究の方法

マウスの神経芽細胞腫由来の培養細胞である Neuro2a 細胞(N2a)をモデル細胞として使用した分子細胞生物学的解析を行う。ヒト p62 プロモーター下に GFP を挿入した遺伝子を導入した N2a を用いた薬剤ライブラリースクリーニングにより同定された N-オレオイルドーパミン(OLDA)とその類似化合物である N-アラキドニルドーパミン(NADA)について、選択的オートファジー促進効果やタンパク質凝集体形成機構などについて分子細胞生物学的に解析した。

### 4. 研究成果

我々はこれまでに、選択オートファジーによるユビキチン化タンパク質の分解過程が p62 の S403 リン酸化によって制御されていることを報告してきた。p62 は S403 のリン酸化を受けることにより、ポリユビキチン鎖との親和性が増大するため、ユビキチン化タンパク質と共に凝集構造体(セクエストソーム)を形成する。オートファゴソームは、隔離膜上の LC3 と p62 の結合を介して、セクエストソーム上で伸長することにより形成すると考えられる。先の研究で、p62 の発現を誘導する化合物のスクリーニングから同定した N-オレオイルドーパミン(OLDA)とその類似化合物である N-アラキドニルドーパミン(NADA)について、p62 の S403 リン酸化について検討した。N2a 細胞に

OLDA, NADA をそれぞれ 5 $\mu$ M 添加し、24時間後のリン酸化 p62 の細胞内蓄積量をウエスタンブロットリング法により定量したところ、OLDA, NADA とともにリン酸化 p62 の蓄積と、p62 タンパク質の細胞内総量の増加が観察された(図1)。これまでの研究により、プロテアソーム阻害により p62 の S403 リン酸化促進は誘導されることが知られている (Matsumoto et al. Mol. Cell, 2014) が、アシルドーパミンによる p62 のリン酸化促進は、ユビキチン化タンパク質の蓄積を伴わないものであった。このことは、アシルドーパミンがプロテアソーム阻害とは異なるメカニズムで p62 のリン酸化促進を行っていることを示唆している。S403 リン酸化 p62 は、恒常的なオートファジーにより迅速に分解されているため、オートファジー阻害剤であるバフィロマイシンで細胞を処理した場合に蓄積することが知られている。アシルドーパミン処理した細胞をバフィロマイシンでさらに処理した場合でもリン酸化 p62 のさらなる蓄積が観察されたことから、アシルドーパミンはオートファジーによるリン酸化 p62 の分解を抑制していないことが実証された。また、アシルドーパミンは脳内のエンドカンナビノイド/エンドバニロイドとして分類されていることから、代表的なカンナビノイドとバニロイドであるアナンダミド(アラキドニルエタノールアミン)とカプサイシンについても p62 のリン酸化促進効果について検証してみたところ、これら化合物にはそのような効果が見られないことも明らかとなった。また、アシルドーパミンによる p62 の S403 リン酸化を行うキナーゼを同定するため、これまでに知られている CK2 および TBK1 の阻害剤存在下で OLDA もしくは NADA で処理したところ、TBK1 阻害剤(BX795)存在下では p62 のリン酸化が抑制された。つまり、アシルドーパミンによる p62 のリン酸化は、TBK1 の活性化を伴うものであると考えられる。これらの結果は、アシルドーパミンによる p62 のリン酸化促進効果は、それが結合するカンナビノイド受容体を介した

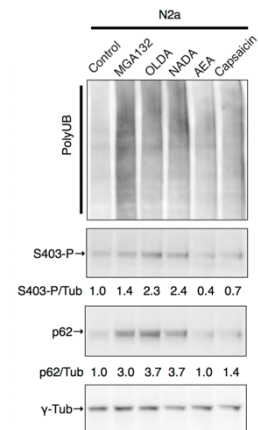


図1: アシルドーパミンは S403 リン酸化 p62 の

応答ではない新規な経路によることを強く示唆しており、TBK1の活性化を伴う経路であると考えられる。

アシルドーパミンに対する細胞の応答は、p62の遺伝子発現誘導を伴うものであり同時にOPTNやLC3Bの発現も誘導されていた。p62を含むオートファジーレセプターは選択的オートファジーによるタンパク質の分解過程において基質とともに分解されるため、p62のリン酸化促進によりp62が分解された結果、細胞内のp62タンパク質の濃度が低下した結果としてp62の遺伝子発現が誘導されたものと考えられる。p62タンパク質を過剰発現した場合、過剰に存在するp62分子はS403のリン酸化をほとんど受けない。しかしながら、アシルドーパミンによるp62の発現誘導では、誘導されたp62はS403のリン酸化を受けるため、選択的オートファジーによる分解系全体が促進されている可能性が考えられる。S403リン酸化p62の細胞内局在について免疫蛍光法により確認したところ、予想外なことにアシルドーパミンで処理した細胞がアグリソームを形成し、リン酸化p62はアグリソームに取り込まれていた。アグリソームはプロテアソーム阻害や異常タンパク質の過剰発現によりプロテアソームによるタンパク質分解が飽和してユビキチン化タンパク質が細胞内に蓄積した場合に出現する細胞内の誘導性構造物であるとこれまで考えられてきたが、アシルドーパミンは細胞内のユビキチン化タンパク質を増加させないことから、アグリソーム形成がポリユビキチン化タンパク質の蓄積により引き起こされるものではないことが明らかとなった。つまり、アグリソームはタンパク質分解の遅延による誘導因子の活性化により形成されるのではなく、アグリソームの形成を制御するシステムが別に存在することを意味している。さらに、興味深いことに、プロテアソーム阻害により誘導されるアグリソームでは、内包するp62タンパク質はS403リン酸化を受けていないが、アシルドーパミンにより誘導されたアグリソーム内のp62はS403リン酸化を受けていた。このことは、アシルドーパミンにより誘導されるアグリソームにより、本来プロテアソームで分解されるべきユビキチン化タンパク質がアグリソーム内に取り込まれて、濃縮される可能性を示唆している。アシルドーパミンによるアグリソーム形成の誘導が凝集性タンパク質のシード形成を促進する可能性について検証するため、ポリグルタミンの凝集形成について評価した。その結果、OLDA, NADAともにポリグルタミン凝集形成を有意に促進することがわかった。さらに、ユビキチン化タンパク質の蓄積は観察されない程度のプロテアソーム活性が低下した状態を模した低濃度MG132(0.2μM)条件下において、OLDA, NADAはユビキチン化タンパク質の明白な蓄積を示した(図2)。これらの結果は、アシルドーパミンによりアグリソーム形成が誘導されると、ユビキチン化された凝集性タンパク質が局所的に濃縮され、結果として凝集体の形成が促進されてしまう可能性を示唆しており、これまでタンパク質分解機構の破綻が原因と考えられてきた晩期発症性の神経変性疾患における伝播性凝集核の形成問題を考える上で重要な知見となったと思われる。

今後に残された問題点として、(1)アシルドーパミンがどのようにしてアグリソーム形成を誘導するのか、(2)アシルドーパミンは脳内でタンパク質凝集核の形成を促進するのか、(3)アグリソーム形成の抑制によりタンパク質凝集体形成を抑制できるのか、などがあげられる。これらの問題点を解決することで、今後、なぜタウタンパク質のような伝播性のシード形成が起こるのかなどの神経変性疾患発症の根本となる原因の解明につながっていくことが期待される。

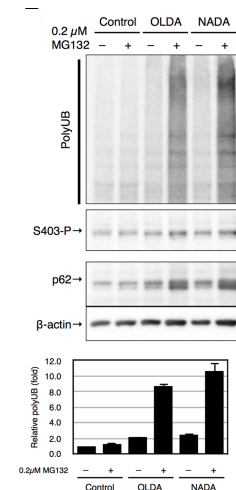


図2: アシルドーパミンはユビキチン化タンパク質を細胞内に蓄積させる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto Gen, Inobe Tomonao, Amano Takanori, Murai Kiyohito, Nukina Nobuyuki, Mori Nozomu	4. 巻 8
2. 論文標題 N-Acyl dopamine induces aggresome formation without proteasome inhibition and enhances protein aggregation via p62/SQSTM1 expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27872-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Gen, Matsumoto Kazuki, Kimura Taeko, Sahara Tetsuya, Higuchi Makoto, Sahara Naruhiko, Mori Nozomu	4. 巻 19
2. 論文標題 Tau Fibril Formation in Cultured Cells Compatible with a Mouse Model of Tauopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1497 ~ 1497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19051497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 松本 弦、森望	4. 巻 31
2. 論文標題 超解像蛍光顕微鏡でみるアグリファジーと凝集化タウ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dementia Japan	6. 最初と最後の頁 2-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 松本 弦	4. 巻 35
2. 論文標題 選択的オートファジーにおけるオートファジーレセプター	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 実験医学増刊号「Theオートファジー」	6. 最初と最後の頁 2549-2556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松本 弦	4. 巻 35
2. 論文標題 マイトファジー：オートファジーアダプターによるユビキチン鎖の認識機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 実験医学7月号 特集「オルガネロファジー」	6. 最初と最後の頁 1800-1805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Gen Matsumoto
2. 発表標題 p62/SQSTM1-mediated selective autophagy for protein aggregates
3. 学会等名 Keystone Symposia, "Selective Autophagy" joint with the conference on "Mitochondrial Biology"; N-acyldopamines modulate (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gen Matsumoto
2. 発表標題 Prion-like propagation of filamentous tau inclusions in cultured neuronal cells,
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 弦
2. 発表標題 tau凝集伝播細胞株における線維化tau封入体の形成と分解
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gen Matsumoto, Taeko Kimura, Kazuki Matsumoto, Naruhiko Sahara, Nozomu Mori
2. 発表標題 Tau prion propergation and aggregate formation in cultured neuronal cells
3. 学会等名 Brain Protein Aging and Dementia Control 2nd International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Gen Matsumoto, Tomonao Inobe, Takanori Amano, Nobuyuki Nukina, Nozomu Mori
2. 発表標題 N-acyldopamine induces p62/SQSTM1 and modulates selective autophagy
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考