

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K07285
研究課題名(和文) 選択的オートファジーを介した転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Transcriptional regulation through the autophagy

研究代表者

小川 英知 (Ogawa, Hidesato)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：20370132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は外的環境に応答し遺伝子発現を行うことで細胞分化や恒常性維持を厳密に制御している。本研究では選択的オートファジーレセプターp62の核内機能を解析することにより、外的環境に応答したオートファジーを介した遺伝子発現制御の新規の分子機構の解明を試みた。p62の翻訳後修飾と核内複合体に着目し解析をした結果、p62はアデノウイルス因子と結合し核内でクロマチン構造変換酵素の局在を変化させることで、異物侵入に対応する分子機構を制御している可能性を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞質タンパク質の分解制御にのみ関わると考えられてきたオートファジー機構が核内において遺伝子発現制御を介した細胞の老化やガンの発生に密接に関与していることを示した。更に興味深いことに、ヒト感染症疾患の原因となるアデノウイルスの侵入は、ウイルスタンパクがこの分子機構を攪乱させることで自らの増殖と細胞の状態をコントロールしている可能性があり、この分子機構がウイルスなど異物排除機構の制御に極めて重要なことを裏付けている。本成果は未だ多くが解明されていないガンの発生制御機構やウイルスの感染防御機構を明らかにする上で極めて重要な証拠となるものである。

研究成果の概要(英文)：The extracellular signal tightly regulates transcriptional activity to maintain cell differentiation and homeostasis. Several lines of evidence clearly showed that protein degradation mediated by the autophagy system is a vitally important means of regulation for transcriptional processes. In this study, we attempted to elucidate a novel molecular mechanism of autophagy-mediated transcriptional regulation in response to extracellular signals by analyzing the nuclear function of the selective autophagy receptor p62. To gain insight into the molecular mechanism of p62, we attempted to purify the nuclear p62 complex and identify its components. Interestingly, the complex contained some senescence and oncogenic proteins. Furthermore, Adenovirus protein tightly bound to this complex and colocalized ARIP4. These data strongly suggested that p62 acts as a sensing factor for virus infection and important for the cellular response through transcriptional regulation.

研究分野：転写制御

キーワード：転写制御 クロマチン構造変換 転写複合体 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

細胞のシグナル応答の観点から、核内での転写制御と細胞内タンパク質分解はその材料となるアミノ酸の確保において密接なつながりがあり、その制御は細胞の恒常性の維持や分化に極めて重要である。従来オートファジーはランダムに細胞質成分を取り囲み分解するシステムと考えられてきたが、近年オートファジーレセプターと呼ばれる分子が選択的にタンパク質をオートファゴソームに誘導し分解を行い、様々なシグナルカスケードの制御に関わっていることが明らかとなってきた。飢餓状態ではアミノ酸の確保を行うだけでなく、ストレス状態に対応するためのシグナルカスケードを活性化し速やかに遺伝子発現に繋げる必要がある。申請者は、飢餓応答を抑制するタンパク質をオートファゴソームで選択的に分解することで、アミノ酸の確保だけでなくそのシグナルを下流に伝えていると想定した。すなわち、細胞質に存在する選択的オートファジーのレセプターは細胞外シグナルセンサーとして働き、タンパク質分解をシグナルとして転写制御へとつなぐ役割を持つのではないかと考えた。

我々はこれまでの研究で、オートファジーレセプターp62/SQSTM1(p62)を核内受容体(転写因子)のコファクターであるクロマチン構造変換因子 ARIP4 複合体の構成因子として同定した(Tsuchiya M. et al. Scientific Reports 5, 14498 srep14498, 2015)。さらに p62 は飢餓状態において ARIP4 の分解に必須であり、ARIP4 は外的環境によって活性化される転写因子の抑制に必要であることから(Baba, T. et al. Nat. Commu.5:3634 ncomms4634, 2014)、我々は p62 が飢餓状態などのストレスをモニターし ARIP4 を分解することで、ストレス応答遺伝子の発現を一時的に亢進させるというモデルを提唱している。このモデルをサポートする結果としては、我々が独自に作製した ARIP4 の心臓特異的な遺伝子欠損マウスは心筋のエネルギー代謝経路異常を起こし、その結果として拡張型心筋症の原因の一つである心筋緻密化障害を起こすことが判明している。オートファジー関連因子 Atg5 の異常によってもマウスの心臓では拡張型心筋症様の表現系を示すことから、ARIP4 がオートファジーを介した細胞分化制御に関与していることが予想され、p62 による ARIP4 の制御機構が生体において重要な分子機構であると考えられた。

これらの研究の過程で我々は、(1) p62 が細胞質 核をシャトリングしている (2) p62 は核内で SUMO 化タンパク質が集まる PML body と呼ばれる核内構造体の一部集結する (3) p62 の特異的抗体を用いてクロマチン分画で免疫沈降を行うとヌクレオソームが濃縮できる (4) 集められたヌクレオソームから回収した DNA 断片を次世代シーケンサーで読みゲノムワイドの解析を行ったところ、p62 の結合している領域には複数のコンセンサス配列が存在する、などが明らかとなった。興味深いことに p62 を含む ARIP4 複合体の DNA 結合コンセンサスは、p62 のコンセンサス配列の一部であったことから、p62 は ARIP4 と核内で結合し細胞質へ運搬・分解するだけでなく、ARIP4 以外とも結合し核内で特定の構造体を形成する、あるいは複数種の複合体を形成してクロマチン上に局在する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

細胞は外的環境よりシグナルを受け取り、必要な遺伝子の転写を行うことで、細胞分化や恒常性維持を厳密に制御している。近年オートファジーには、単なるアミノ酸確保の為のタンパク質分解だけではなく、環境シグナルに応答し遺伝子の転写を制御する「選択的オートファジー」が存在することが明らかとなってきた。本研究では選択的オートファジーのレセプターである p62

に関して、これまで知られていた細胞質での機能だけではなく、核内での機能を解析することにより、従来別々に研究がなされてきたオートファジーと転写制御機構を融合し一体化する。これにより細胞が飢餓などの外的環境に応答し遺伝子発現を制御する新規の分子機構の存在を明らかにする。さらにこの機構が関与する細胞分化や恒常性維持のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

2017年度には細胞質核を短時間で移行する p62 の機能を明らかにする目的で p62 の翻訳後修飾に着目しその変化を細胞外からの刺激による応答によって比較した。

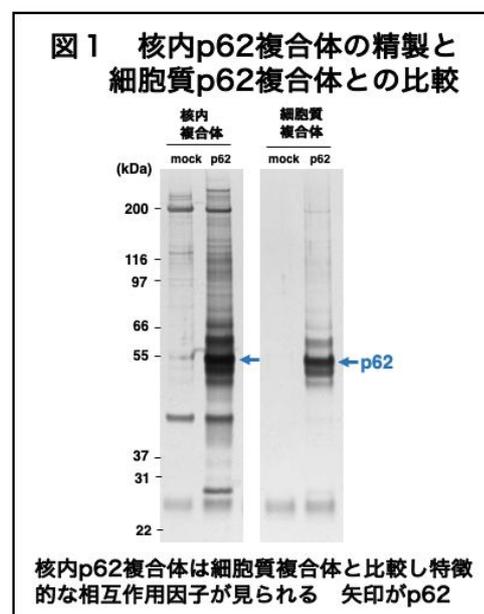
2018年度には、核内に移行した p62 の機能を明らかにする目的で、p62 の核内複合体の精製を試み、その構成因子の同定および細胞質複合体との比較を行った

2019年度にはこれらの複合体の構成因子の詳細を解析し、その中からアデノウイルス因子の同定に成功したため、その因子の局在パターンと機能解析を行った。

4. 研究成果

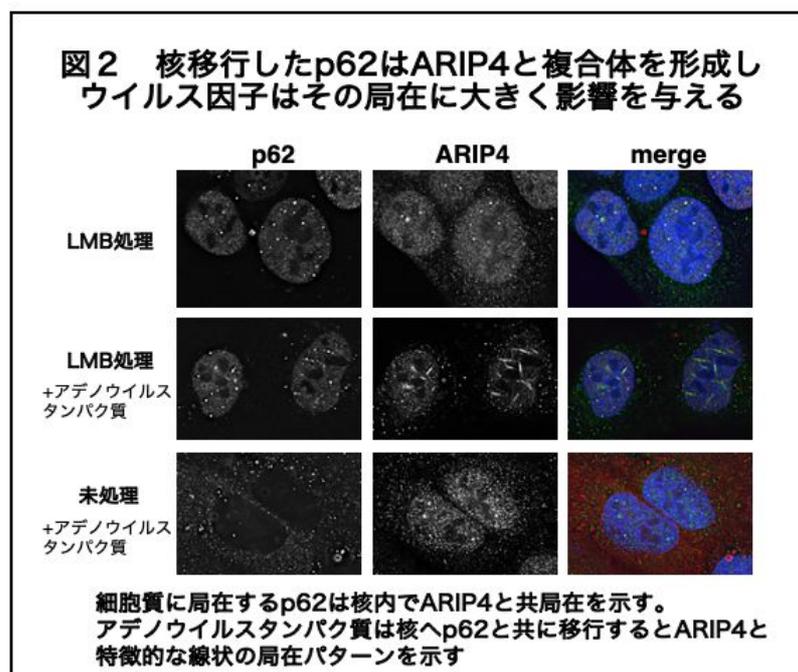
初年度は p62 の翻訳後修飾の変化に着目し、核移行および核内複合体形成の制御を解明することを目的とした。これまでの実験から、細胞環境が変化することで p62 の内部にある UBA domain のユビキチン結合活性を制御する S403 のリン酸化が起きる事が明らかとなっている。この UBA domain には ARIP4 もまったく同様の結合様式で結合する事から、このリン酸化はユビキチン化タンパク質のみならず、核内での ARIP4 との相互作用の調節をしていると考えられ、p62 の核内複合体形成において重要な翻訳後修飾であると考えられた。そこで S403 のリン酸化を特異的に認識する抗体を作製した。この抗体を用いて p62 のリン酸化を検出した結果、マウス初代培養細胞などではこのリン酸化フォームは定常状態で殆ど検出できないが、核酸導入などのエンドサイトーシスを活性化するような細胞刺激を与えることにより、急激に増加することが判明した。興味深いことに、ある種の癌細胞では常にこのリン酸化状態が維持されており、p62 が細胞外シグナルに応答するだけでなく、癌細胞における細胞増殖や代謝経路の異常にも反応していることが明らかとなった。

2018年度には、核移行した p62 の機能解析を目的として p62 の局在の可視化と p62 の相互作用因子の解析を試みた。p62 は細胞質核を常に移動しているタンパク質で有り、核排出阻害剤であるレプトマイシン B(LMB)で処理すると速やかに核への集積が見られる。核に集積した p62 は複数のドットパターンを形成し、そのドットに ARIP4 が共局在することが観察される。このような核内の動態からその機能を明らかにするため、LMB 添加、非添加の細胞から p62 の複合体を精製し複合体の構成因子を比較した(図1)。抗体による二段階精製の結果、細胞質複合体には含まれない複数の因子が核内で p62 に安定に結合している事が判明した。興味深い



点は、これらの因子の中に細胞周期制御に関わる因子および細胞寿命に関わる因子が多数含まれていたことである。細胞の継代が進むことで老化した細胞に細胞内老廃物が蓄積することは知られているが、核内においても同様に不要な老廃物が存在し、細胞質核を頻繁に移行するp62がそれらを積極的に搬出している可能性が考えられた。細胞老化の制御に重要な因子を選択的に分解することで細胞内の恒常性維持やシグナルカスケードが制御されていると予想される。

2019年度には、p62に核内複合体の構成因子を解析していく過程で、アデノウイルス由来のタンパク質が強固に結合している事を見出した。p62のUBA domainのコピキチン結合活性を制御するS403リン酸化がこのウイルスタンパク質との結合に影響を与えるのかを調べたところ、このタンパク質はリン酸化修飾の有無に影響されず常に安定にp62と結合していることが判明した。さらにLMB添加により、このタンパク質とARIP4、p62は生化学的に安定な核内三者複合体を形成する一方で、ARIP4とアデノウイルスタンパク質は核内で特徴的な線状の構造体を形成する。そこにp62がこの構造物に共局在しながらも独立した形で点状に局在する様子が観察された。この結果はp62がアデノウイルスタンパク質と共に細胞質核を移行し、核内ではARIP4の局在を変化させることでARIP4の機能に影響を及ぼしていることが予想される(図2)。これまでに多くのウイルスタンパク質が宿主のタンパク質を結合し細胞周期やゲノムの安定性に大きな影響を与えることが知られているが、本研究により、異物侵入における緊急応答としてARIP4のクロマチン構造制御もアデノウイルスの標的となり、ARIP4の機能障害がアデノウイルスの感染及び増殖に重要であることが示唆された。本研究結果から、ARIP4のクロマチン構造制御が細胞の栄養状態をモニターするだけでなく、ウイルス感染によるオートファジーの活性化に対する細胞の防御応答にも重要であると考えられ、アデノウイルスの増殖制御における宿主の遺伝子発現制御がエピジェネティックレベルで制御されていることを示唆する結果を得ることができた。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Teeli Aamir S., Leszczyński Paweł, Krishnaswamy Narayanan, Ogawa Hidesato, Tsuchiya Megumi, Miecz Magdalena, Skarzynski Dariusz, Taniguchi Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Possible Mechanisms for Maintenance and Regression of Corpus Luteum Through the Ubiquitin-Proteasome and Autophagy System Regulated by Transcriptional Factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.3389/fendo.2019.00748	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 該当する
1. 著者名 Ogawa Shiho, Kido Sayuri, Handa Tetsuya, Ogawa Hidesato, Asakawa Haruhiko, Takahashi Tatsuro S., Nakagawa Takuro, Hiraoka Yasushi, Masukata Hisao	4. 巻 37
2. 論文標題 Shelterin promotes tethering of late replication origins to telomeres for replication timing control	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e98997 ~ e98997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.201898997	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 Tsuchiya Megumi, Ogawa Hidesato, Koujin Takako, Mori Chie, Osakada Hiroko, Kobayashi Shouhei, Hiraoka Yasushi, Haraguchi Tokuko	4. 巻 8
2. 論文標題 p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 470 ~ 480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12385	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 Ichiro Takada, Megumi Tsuchiya, Kaori Yanaka, Shinya Hidano, Sayuri Takahashi, Takashi Kobayashi, Hidesato Ogawa, Sinichi Nakagawa, Makoto Makishima	4. 巻 497
2. 論文標題 Ess2 bridges transcriptional regulators and spliceosomal complexes via distinct interacting domains.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 597-604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.110. Epub 2018 Feb 16.	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 Baba Takashi, Otake Hiroyuki, Inoue Miki, Sato Tetsuya, Ishihara Yasuhiro, Moon Ju-Yeon, Tsuchiya Megumi, Miyabayashi Kanako, Ogawa Hidesato, Shima Yuichi, Wang Lixiang, Sato Ryuichiro, Yamazaki Takeshi, Suyama Mikita, Nomura Masatoshi, Choi Man Ho, Ohkawa Yasuyuki, Morohashi Ken-ichirou	4. 巻 1
2. 論文標題 Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1038/s42003-018-0020-z	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小川英知
2. 発表標題 選択的オートファジー機構を介した細胞自己防衛機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidesato Ogawa, Megumi Tsuchiya, Takako Koujin, Chie Mori, Hiroko Osakada, Kento Watanabe, Shouhei Kobayashi, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi
2. 発表標題 Regulation of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells
3. 学会等名 Lecture of Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidesato Ogawa, Megumi Tsuchiya, Takako Koujin, Chie Mori, Hiroko Osakada, Kento Watanabe, Shouhei Kobayashi, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi
2. 発表標題 Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells
3. 学会等名 第70回細胞生物第51回発生生物合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土屋 恵, 小川英知, 渡邊 賢人, 荒神 尚子, 小林 昇平, 森 知栄, 小坂田 裕子, 平岡 泰, 原口 徳子
2. 発表標題 オートファジーレセプター-p62/SQSTM1 を標的とした効果的な遺伝子導入法の確立
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidesato Ogawa, Megumi Tsuchiya, Takako Koujin, Shouhei Kobayashi, Chie Mori, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi
2. 発表標題 Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Megumi Tsuchiya, Hidesato Ogawa, Takako Koujin, Shouhei Kobayashi, Chie Mori, Hiroko Osakada, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi
2. 発表標題 Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 2種類のTBK1/IKKe阻害剤を利用した核酸導入	発明者 小川英知, 土屋恵, 渡邊賢人, 平岡泰, 原口徳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-000088	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

大阪大学大学院生命機能研究科細胞核ダイナミクス研究室ホームページ
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hi-raoka/index.html>
 大阪大学大学院 生命機能研究科 細胞ネットワーク講座 研究室ホームページ
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hi-raoka/member.html>

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
研究協力者	土屋 恵 (Tsuchiya Megumi)		