

平成23年 5月30日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21700398
 研究課題名（和文）
 選択的オートファジーによる不溶性タンパク質凝集体の分解機構
 研究課題名（英文）Molecular mechanism underlying selective autophagy of aggregated protein
 研究代表者
 松本 弦（MATSUMOTO GEN）
 独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員
 研究者番号： 50415303

研究成果の概要（和文）：

選択的オートファジーのアダプター因子である p62/SQSTM1 がリン酸化されることを見だし、その生物学的意義について詳細な解析を行った。その結果、p62 タンパク質は、ポリユビキチン鎖と結合する UBA ドメインをもつが、その UBA ドメインへのリン酸化によりポリユビキチン鎖との親和性が増大することがわかった。p62 はリン酸化状態になることで、ポリユビキチン化タンパク質を選択的にオートファジーで分解することができるようになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The specific phosphorylation of p62 in its ubiquitin-associated (UBA) domain, regulates the autophagic clearance of polyubiquitinated protein aggregate. This phosphorylated form of p62 binds to polyubiquitin chains with higher affinity, resulting in the efficient recruitment of polyubiquitinated proteins in the “sequestosomes” which are units of autophagosome entry. The phosphorylation in p62 regulates autophagic clearance of ubiquitinated proteins that are poorly degraded by proteasomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：オートファジー、p62、タンパク質分解、シクエストソーム、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

いくつか神経変成疾患や肝臓疾患などの患

者の病変細胞に見られるユビキチン陽性の不溶性タンパク質凝集体は最も顕著な病態の一つであり、

p62 (Sequestosome1/SQSTM1) は、それら多くの凝集体に共通に含まれているタンパク質の一つである。神経変成疾患の病因タンパク質であるハンチンチンや SOD1、シヌクレイン、タウタンパク質などの変異体は凝集性があり細胞内においてユビキチン化され不溶性のタンパク質凝集体を形成する。これら病因タンパク質は病変細胞においてタンパク質凝集体を速やかに除去する機構に影響を与えている可能性が考えられる。細胞内において不溶性のタンパク質凝集体がどのようにして分解・除去されるのかについての共通したメカニズムは未だ明らかではないが、ユビキチン-プロテアソームシステム (UPS) とマクロオートファジーシステムが協調して分解しているであろうと考えられている。オートファジーによるタンパク質分解には選択性がないため、特定の分子を選択的にオートファゴソームに取り込むためには特別な輸送が必要となる。p62 タンパク質はそのポリユビキチン化されたタンパク質をオートファゴソームへターゲティングする分子であると考えられているが、p62 がどのようにして凝集性の変異タンパク質をオートファゴソームへターゲティングするかについては、これまでほとんどわかっていない。また、p62 には保存されたユビキチン結合ドメインが存在するが、ユビキチンとの親和性は非常に弱く、直接ユビキチンを結合してオートファゴソームへ輸送することは難しいと思われる。従って、p62 が主として恒常的に選択的オートファジーの仲介をしているというモデルが正しいのかどうか、その信憑性が問われている。本研究では、この

問題に焦点をあて、現在提唱されているモデルを基本として、p62 によるユビキチン化タンパク質のオートファゴソームへの輸送メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、神経系細胞内においてユビキチン化タンパク質がどのようにして p62 顆粒の中に閉じ込められていくのか、またその閉じ込められたユビキチン化タンパク質をどのようにしてオートファジーによる分解システムへと運び、分解・除去していくのかという問題に取り組む。さらには、選択的オートファジーの制御機構へも踏み込み、オートファジーによるユビキチン化タンパク質の分解が何らかの分子制御を受けるのかどうか、もし受けるのであれば、それをコントロールすることができるのかどうかについても検討する。

3. 研究の方法

本研究では、p62 顆粒を可視化し、オートファジーによるユビキチン化タンパク質の分解課程を p62 タンパク質の変異解析と組み合わせることで、p62 の生化学的特性と細胞生物学的表現型がどのように相関しているのかを明らかにしていく。たとえば、p62 顆粒はある時間では細胞質内の小さな点として見えていたものが、ストレスをかけることにより、徐々に大きくなり流動性が下がり、核の近傍に輸送されていく様子が観察できる。このとき、p62 とともに異なる蛍光タンパク質を融合させたユビキチンを同時に観察することで、2 つのタンパク質の相対的な位置関係や挙動をモニターすることができる。また、ユビキチン化タンパク質が蓄積した条件下では、選択的オートファジーが昂進することが知られているため、このよ

うな条件下で p62 タンパク質を免疫精製し、p62 に起こる翻訳後修飾を網羅的に、質量分析により解析する。見つかった翻訳後修飾の模倣変異もしくは非修飾型変異体を作成し、その生物学的な意義についても検討する。

4. 研究成果

選択的オートファジーのアダプター因子である p62/SQSTM1 の翻訳後修飾を質量分析により同定した。その結果、プロテアソーム阻害条件下において7つのセリン残基と1つのスレオニン残基がリン酸化されていることを見いだした。リン酸化を受けるセリン/スレオニン残基をアラニンに置換した非リン酸化変異体とグルタミン酸に置換した、リン酸化模倣変異体を作成し、その細胞内局在を調べた。p62 タンパク質は、細胞質において p62 顆粒を形成するが、過剰な p62 タンパク質は細胞内で異常凝集してしまうため、1コピーの変異 p62 をそれぞれもつ安定発現株を樹立した。これらの変異 p62 はその局在を生細胞内で可視化するために GFP タンパク質を融合させたものを用いた。変異 GFP-p62 発現株における変異 p62 の局在を調べたところ、ユビキチン結合ドメインのリン酸化模倣変異体において、野生型や他の変異体と比べて明らかな p62 顆粒形成の昂進を認めた。この結果は、リン酸化により、p62 顆粒の形成が制御されている可能性を示唆するものである。さらに、その変異体では、顕著な変異 GFP-p62 タンパク質の分解が促進しており、ユビキチン結合ドメインのリン酸化による p62 顆粒形成の昂進が、p62 タンパク質の分解の促進に関与していることが示唆された。

p62 タンパク質は、その N 末端に PB1 ドメインをもち、その PB1 ドメインを介して多量体を形成することが知られている。この多量体形成は p62 顆粒の形成に必須であり、ユビキチン結合能もまた、重要であることが示されている。ユビキチン結合により p62 の多量体が架橋されることにより、p62 顆粒が安定化するのではないかと考えられる。もしそうであるなら、p62 顆粒形成が昂進している、リン酸化 p62 はユビキチン化タンパク質との結合に違いが有るのではないかと考え、p62 とポリユビキチン鎖の親和性を調べた。その結果、リン酸化模倣変異体では、野生型に比べ顕著にポリユビキチン鎖との結合力が促進していることが明らかとなった。この結果は、p62 とポリユビキチン鎖の結合が、p62 のリン酸化により制御されていることを意味する。さらに、p62 のユビキチン結合力は非常に弱いことが知られており、そのような弱い結合では、ユビキチン化タンパク質をオートファゴソームへと運ぶことは難しいと思われるが、リン酸化により結合力が増大するという本研究における発見により、p62 がユビキチン化タンパク質をオートファゴソームへ輸送するための制御機構が存在することが明らかとなった。

リン酸化 p62 がどのようにしてユビキチン化タンパク質の分解を行うのかという問題を解決するため、リン酸化模倣変異体の p62 顆粒について、詳細に調べた。p62 顆粒を可視化すると、それは、シクレストソーム、オートファゴソーム、リソソームの3つのことになった構造体が混じったものとして観察されることが知られている。つまり、これは3つの構成成分それぞれに、p62 が含まれていることを意味しており、蛍光顕微鏡下では p62 を観察するだけでは、それらを区別することができない。リン酸化模倣変異体の p62 顆粒形成の促

進は、どの構造体が増加しているのかを明らかにするため、オートファゴソーム形成の必須因子である Atg5 を microRNAi によりノックダウンさせた細胞株を樹立し、変異 GFP-p62 と二重安定発現株を構築した。その結果、リン酸化型 GFP-p62 は p62 顆粒を高い頻度で形成した。つまり、この結果は、リン酸化によりシクレストソームの数が増加していることを示唆している。つまり、リン酸化型 p62 はオートファゴソームへの直接の輸送を行うことで p62 顆粒の形成を促進したのではなく、シクレストソーム形成を促進することでオートファゴソームへの取り込みの効率をあげている可能性が考えられる。

ユビキチン化タンパク質がリン酸化型 p62 と強く結合し、シクレストソーム形成を促進することから、リン酸化型 p62 はユビキチン化タンパク質をシクレストソームへ輸送し、シクレストソーム内に安定に隔離するのではないかと考えられる。この仮説を証明するため、RFP を N 末端に融合させた RFP-UB と GFP-p62 の二重安定発現株を樹立し、GFP-p62 の変異体においてユビキチンがシクレストソームに局在するかどうかを調べた。その結果、非リン酸化変異体の p62 顆粒では RFP-ユビキチンの蓄積が見られないのに対して、リン酸化模倣変異体では有為に蓄積していることがわかった。この結果はリン酸化された p62 がユビキチン鎖を結合してシクレストソームを形成しユビキチン化タンパク質をその中に蓄積することにより細胞質から隔離し、オートファゴソームはシクレストソームを認識して取り囲み、リソソームへと運び分解するのではないかと考えている。

これらの研究結果は、論文として投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計3件)

① Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., and Nukina, N., Phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated protein, The 2011 Cold Spring Harbor Laboratory meeting on “The Ubiquitin Family”, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2011年5月17-21日(口頭発表)

② Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., and Nukina, N., Requirement of phosphorylation of p62/SQSTM1 for autophagic degradation of polyubiquitinated proteins, 3rd international symposium on Protein Community, 奈良, 2010年9月13-16日(ポスター)

③ Matsumoto, G., Wada, K., and Nukina, N., Phosphorylation at p62/SQSTM1 promotes selective autophagy of ubiquitinated protein, The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 札幌, 2009年10月6-9日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 弦 (MATSUMOTO GEN)
独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研
究チーム・研究員
50415303

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者