

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25111006

研究課題名(和文)オートファジー選択的基質による細胞制御とその病態生理

研究課題名(英文)Study on selective autophagy on cellular functions

研究代表者

小松 雅明(KOMATSU, Masaaki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90356254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 169,100,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーが遺伝情報の維持機構、分化や環境変化に伴う細胞制御、幹細胞の維持・分化、さらには老化抑制に深く関与することが判明したが、そのような生命の根幹に関わる事象における役割についてはなお未解明な謎が山積している。本研究計画では、現在、急速な成長を続けるオートファジー研究分野の中でも、これまでの研究代表者の研究実績を基軸に選択的オートファジーによる酸化ストレス応答や細胞内代謝といった細胞機能制御に焦点を当て、その分子構造基盤および生理機能の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Autophagy has long been thought of as a bulk degradation system in which cytoplasmic components are sequestered by double-membrane structures called autophagosomes, and the contents are then degraded after autophagosomes fuse with lysosomes. Genetic experiments in yeast identified a set of Autophagy-related (ATG) genes that are essential for autophagy. We have since elucidated many of the molecular underpinnings of autophagy and the physiologic roles of these processes in various systems. Moreover, growing lines of evidence have shed light on indispensable role for autophagy in cellular homeostasis, which is mediated by selective degradation of a specific substrate(s). Such selectivity allows diverse cellular regulation, similar to the ubiquitin proteasome pathway. In this research program, we have addressed the pathophysiological roles of selective autophagy.

研究分野：病態医化学

キーワード：オートファジー タンパク質分解 p62 Nrf2 肝細胞がん

1. 研究開始当初の背景

オートファジーがユビキチン化タンパク質凝集体や変性ミトコンドリアをはじめとしたユビキチン化カーゴを選択的に排除するという発見により、選択的オートファジーの生理機能が注目されるようになってきた。我々は、臓器特異的オートファジー欠損マウスの解析からオートファジーの破綻がユビキチン陽性の凝集体形成を伴った神経変性、肝障害、腫瘍形成等を引き起こすこと(J Cell Biol 2005, Nature 2006, Gene Dev 2011)、それら病態発症の背景にはオートファジーによって選択的に代謝されるべき基質群の蓄積が存在することを明らかにしてきた(Cell 2007, Mol. Cell 2009, Nat Cell Biol 2010, J Cell Biol 2011)。しかし、選択的オートファジーの病態生理についてはほとんど手つかずの状態であり、オートファジー選択的基質に関わる研究を分子から個体レベルまで包括的に推進する必要があった。

2. 研究の目的

本研究課題では、オートファジーの選択基質群ないしは選択的オートファジー関連分子の遺伝子改変マウスの網羅的解析を基軸に、1. 様々なヒト疾患で確認される凝集体形成機構、2. 選択的オートファジーの分子機構、3. 選択的オートファジーによる細胞内制御機構、そして1から3を統合することで4. 選択的オートファジーとヒト疾患との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) オートファジーによる p62 分解機構とその生理作用の解明

我々はオートファジーの減弱により異常蓄積した p62 がユビキチンリガーゼアダプタータンパク質 Keap1 を不活性化し、Keap1 のターゲットであるストレス応答性転写因子 Nrf2 を活性化することを報告した(Komatsu et al., Cell 2007, Nat Cell Biol 2010)。本研究課題では、p62 による Nrf2 活性化の分子機構、生理的役割を明らかにする。一方、肝細胞がん患者組織においては恒常的に p62 が蓄積、リン酸化され、Nrf2 が活性化されている(Inami et al., J Cell Biol 2011, Takamura et al., Gene Dev 2011)。この Nrf2 の活性化は、肝細胞がんの微小環境下での生存を可能にする。この事実を、p62-Keap1 結合を標的とした化合物が肝細胞がんの新しい創薬候補となることを意味する。既に確立したアッセイ法を駆使し、p62 を標的とした抗がん剤スクリーニングを行う。

(2) オートファジーによる脂肪酸分解機構とその生理作用の解明

我々は、肝臓特異的オートファジー欠損マウス肝臓のリピドーム解析から β 酸化のステップにおいて脂肪酸酸化が抑制されていること、遺伝子発現解析からは β 酸化に関与

する酵素の遺伝子発現を制御する核内受容体 PPAR α が不活性化されていることを見出した。この分子機構および病態生理機能の解明を目指す。

(3) 選択的オートファジー関連分子 Alfy の機能解析

我々は、p62 には LC3-interacting region (LIR) と呼ばれるコンセンサス配列が存在し、LIR を介してオートファゴソームに局在する分子 LC3 と相互作用することを報告した(Ichimura et al., J Biol Chem 2008)。選択的オートファジーの足場タンパク質である Alfy にも LIR が存在し、オートファゴソームに局在する GABARAP と特異的に結合することを見出した。また、Alfy の LIR ペプチドと GABARAP との共結晶構造解析にも成功している。Alfy と GABARAP との相互作用様式、そしてその結合の生理作用を明らかにする。

(4) プロテアソーム減弱マウスの解析

我々は、肝臓特異的にプロテアソーム活性が半減したマウスの解析から、プロテアソームの減弱が p62 およびユビキチン陽性の凝集体形成を伴った肝障害を呈することを見出した。このマウスと Atg7 や p62 欠損マウスとの多重変異マウスを作出、解析し、凝集体形成や両分解系の相互関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 構造解析から p62 の 351 番目のセリン残基のリン酸化により Keap1 との親和性が著しく上昇し Nrf2 を活性化すること、そして細胞生物学的解析からそのリン酸化が選択的オートファジー発動時に引き起こされることを突き止めた。このことは、二つの主要な生体防御機構である Keap1-Nrf2 システムと選択的オートファジーが p62 のリン酸化を介して連動することを意味する(Ichimura et al., Mol Cell 2013, Ishimura et al., FEBS Lett 2014)。

(2) p62-GFP ノックインマウスを開発、様々な条件下における細胞あるいは生体内における p62 の動態解析が可能となった(Eino et al., J Cell Sci 2015)。

(3) p62-Keap1-Nrf2 経路が肝細胞がんにおいて活性化していること、この活性化がグルクロン酸経路およびグルタチオン合成を亢進させ腫瘍の増殖、抗がん剤耐性に寄与することを見出した(Saito et al., Nat Commun 2016)。

(4) p62-Keap1-Nrf2 経路を標的にした抗がん剤スクリーニングを実施し、ヒット化合物を同定するとともに、その誘導体を合成した(Saito et al., Nat Commun 2016, Yasuda et al., Bioorg Med Chem Lett 2016, 2017)。

(5) p62 の pre-mRNA スプライシングにより生じるバリエーションが、全長型 p62 タンパク質とは対照的に Keap1-Nrf2 経路を負に制御することを見出した(Kageyama et al., MCB 2018)。

(6) 核内受容体コリプレッサー NCoR1 がオートファジー選択的基質であること、そしてオートファジーによる NCoR1 の量的調節が PPAR をはじめとした核内受容体の転写活性を抑制することを見出した(論文投稿中)

(7) 選択的オートファジー関連タンパク質である Alfy とオートファゴソームに同存在する GABARAP とが特異的に相互作用することを見出し、Alfy の LIR ペプチドと GABARAP との共結晶構造解析にも成功した。Alfy の GABARAP 結合不能変異体を用いた細胞生物学的解析から、GABARAP は Alfy との相互作用依存的にオートファゴソームへ移行することが判明した(Lystad et al., EMBO reports 2014)

(8) 遺伝学的にプロテアソーム活性を減弱させたマウス肝臓においてオートファジーおよび Nrf2 経路が活性化することを見出した(Kageyama et al., JBC 2014)

(9) Atg8 ファミリータンパク質である GABARAP に相互作用する E1 様酵素 UBA5 をコードする遺伝子の変異を複数の小頭症を伴う重篤発達障害家系において同定、UBA5 の酵素活性低下が遺伝性重篤発達障害を引き起こすことを明らかにした。さらに、UBA5 により活性化されるユビキチン様分子 UFM1 の神経特異的欠損マウスが小頭症を呈して生後数日で死亡することを明らかにした(Muona et al., AJHG 2016)

(10) UBA5 が活性化されるユビキチン様分子 UFM1 あるいは活性化された UFM1 が転移される E2 様酵素 UFC1 をコードする遺伝子の変異を複数の重篤発達障害家系から同定、UFM1 システムの機能減弱が遺伝性重篤発達障害を引き起こすことを見出した(Nahorski et al., Brain 2018)

(11) p62 介在性 Nrf2 活性化に関する包括的な総説(Katsuragi et al., FEBS J 2015) 肝臓オートファジーの役割とその異常と肝疾患に関する包括的な総説を発表した(Ueno & Komatsu, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2017)

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 70 件)

以下は全て査読あり

1. Nahorski, MS., *Wood, CG, *Komatsu, M (27 人中 26 番目), *Alkuraya FS. Biallelic *UFM1* and *UFC1* mutations expand the essential role of ufmylation in brain development. *Brain* in press.
2. Kageyama, S., Saito, T., Obata, M., Koide, RH., Ichimura, Y., *Komatsu, M. Negative regulation of the Keap1-Nrf2 pathway by a p62/Sqstm1 splicing variant. *Mol Cell Biol* 38: e00642-17 (2018).
3. van Wijk, SJL., Fricke, F., Herhaus, L., Gupta, J., Hötte, K., Pampaloni, F., Grumati, P., Kaulich, M., Sou, YS., Komatsu, M., Greten, FR., Fulda, S., Heilemann, M., *Dikic, I. Linear ubiquitination of cytosolic Salmonella Typhimurium activates NF- κ B and restricts bacterial proliferation. *Nat Microbiol* 2:17066 (2017).
4. *Ueno, T., *Komatsu, M. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 170-184 (2017).
5. Muona, M., Waguri, S (28 人中 26 番目), *Lehesjoki, AE., *Komatsu, M (28 人中 28 番目). Biallelic Variants in UBA5 Link Dysfunctional UFM1 Ubiquitin-like Modifier Pathway to Severe Infantile-Onset Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet* 99: 683-694 (2016).
6. Saito, T., Waguri, S (38 人中 34 番目), *Komatsu, M (38 人中 38 番目). p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat Commun* 7: 12030 (2016).
7. Eino, A., Kageyama, S., Uemura, T., Annoh, H., Saito, T., Narita, I., *Waguri, S., *Komatsu, M. Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 during autophagy and under stress conditions in living cells. *J Cell Sci* 2015 128: 4453-4461 (2015).
8. Morimoto, D., Walinda, E., Fukada, H., Sou, Y.-S., Kageyama, S., Hoshino, M., Fujii, T., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Iwai, K., Namba, K., Komatsu, M., Tanaka, K., *Shirakawa M. The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. *Nat Commun* 6: 6116 (2015).
9. Katsuragi, Y., Ichimura, Y., *Komatsu, M. P62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor *FEBS J* 282: 4672-4678 (2015).
10. Ishimura, R., Tanaka, K., *Komatsu, M. Dissection of the role of p62/Sqstm1 in activation of Nrf2 during xenophagy. *FEBS Lett* 588: 822-828 (2014)
11. Kageyama, S., Sou, YS., Uemura, T., Kametaka, S., Saito, T., Ishimura, R., Kouno, T., Bedford, L., Mayer, RJ., Lee, MS., Yamamoto, M., Waguri, S., Tanaka, K., *Komatsu, M. Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway. *J Biol Chem* 289: 24944-24955 (2014).
12. Uemura, T., Yamamoto, M., Kametaka, A., Sou, YS., Yabashi, A., Yamada, A., Annoh, H., Kametaka, S., Komatsu, M., *Waguri, S. A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum

to autophagic isolation membrane. *Mol Cell Biol* 34: 1695-1706 (2014).

13. Lystad, AH., Ichimura, Y., Takagi, K., Yang, Y., Pankiv, S., Kanegae, Y., Kageyama, S., Suzuki, M., Saito, I., Mizushima, T., *Komatsu, M., *Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* 15: 557-565 (2014).
14. Ichimura, Y., Waguri S (20人中2番目), *Tanaka, K., *Yamamoto, M., *Komatsu M (20人中20番目). Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell* 51: 618-631 (2013).

[学会発表](計49件)

1. Masaaki Komatsu “Regulation of transcription factors through selective autophagy” The First International Conference on Autophagy and Liver Diseases. 2017.
2. Masaaki Komatsu “p62/Sqstm1, friend or foe?” EMBO Conference “Autophagy: From molecular principles to human diseases”. 2017.
3. Masaaki Komatsu “Autophagy-specific substrates, p62 and NBR1 serve as driver gene products on hepatocellular carcinoma” The 8th International Symposium on Autophagy. 2017.
4. Masaaki Komatsu “Autophagy defect and tumor development in mouse livers” Cold Spring Harbor Asia Ubiquitin Family, Autophagy and Diseases. 2016.
5. Masaaki Komatsu “p62/Sqstm1 regulates glucose and glutamine metabolism through a transcription factor NRF2” Keystone Symposium on Autophagy: Molecular and Physiological Mechanism. 2016.
6. Masaaki Komatsu “Metabolic reprogramming in human hepatocellular carcinoma by p62/Sqstm1” American Association for the study of Liver Diseases (AALD) Basic Science Symposium: Autophagy in the Liver. 2015.
7. Masaaki Komatsu “Metabolic reprogramming in human hepatocellular carcinoma by p62/Sqstm1” The 7th International Symposium on Autophagy. 2015.
8. Masaaki Komatsu “Coupling of the Keap1-Nrf2 system to Autophagy” Cold Spring Harbor Asia Protein Modification & Homeostasis. 2014.
9. Masaaki Komatsu “Coupling of the Keap1-Nrf2 system to Autophagy” 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International. 2014.

[産業財産権]

取得状況(計1件)

名称: Reagent for diagnosing tumor, pharmaceutical composition, and screening method

発明者: Masaaki Komatsu, Yoshinobu Ichimura

権利者: Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

種類: 特許

番号: 9090681

取得年月日: 2017年4月25日

国内外の別: 米国

[その他]

ホームページ等

研究代表者 HP

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc1/index.html>

新聞等報道

1. 東京読売新聞 2017.1.21[ふしぎ科学館] 生物に大切な自食作用(水島・小松・吉森)
2. 新潟日報 2016.3.6 若さ保つ秘けつ披露 新大医学科が学外講義(小松)
3. 新潟日報 2016.6.30 肝臓がん抑制物質特定 新大チーム、タンパク質に着目 治療薬への応用目指す(小松)
4. NHKニュース 2016.8.27 “肝臓がん増殖抑制 抗がん剤効果上昇” 化合物を特定 新潟大研究班(小松)
5. 東京読売新聞 2015.8.6[知の探検] オートファジー 細胞リサイクル、栄養供給(水島・小松・吉森)
6. 毎日新聞 2014.4.3 命名から半世紀、ブームの「オートファジー」多様な機能(水島・小松・吉森)
7. 日本経済新聞 2013.9.24 肝臓がんの細胞、増殖の仕組み解明(Science & Techフラッシュ)(小松)

アウトリーチ活動

1. 小松雅明 2016年3月29日 高校生のための春休み特別セミナー「オートファジー(自食作用)ってなんだ?」 高校生約30名 順天堂大学
2. 小松雅明 2016年3月5日 新潟大学医学部医学科学外講義「自分を食べて健康長寿」 一般約300名 新潟市民プラザホール

受賞

1. 第14回日本学術振興会賞(2018)
2. 第14回日本学士院学術奨励賞(2018)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松雅明(KOMATSU Masaaki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 90356254

(2)研究分担者

和栗聡(WAGURI Satoshi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30244908