

令和元年6月26日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05137

研究課題名(和文) 新規ストレス応答機構p62-Keap1-Nrf2システムの制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on molecular mechanism of p62-Keap1-Nrf2 system

研究代表者

一村 義信 (Ichimura, Yoshinobu)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80400993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：p62-Keap1-Nrf2経路は、肝がん細胞株や肝がん患者組織では恒常的に活性化されており、がん細胞の増殖に有利な代謝リプログラミングや薬剤耐性に寄与している。しかし現在まで、p62-Keap1-Nrf2経路の制御に関わる決定的因子は同定されていない。今回、(1)ヒト全ゲノムsiRNAライブラリー(約18,000遺伝子)を用いてp62の制御因子群のスクリーニングを試みた。(2)リン酸化p62とKeap1の結合阻害剤化合物の誘導体評価を行った。さらに、(3)リン酸化p62を指標とするオートファジー活性の評価システムの構築に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p62-Keap1-Nrf2経路は、p62のリン酸化を介して転写因子Nrf2が活性化される経路である。重要なことに、本経路は肝がん細胞株や肝がん患者組織では恒常的に活性化されており、がん細胞の増殖に有利な代謝リプログラミングや薬剤耐性を介してがんの悪性化に寄与している。すなわち、p62-Keap1-Nrf2経路を制御することが、がんの有効な治療手段となる。しかしながら、p62-Keap1-Nrf2経路の制御機構については十分に理解されていない。本研究課題ではp62-Keap1-Nrf2経路の制御に関わる新規な低分子化合物を同定し、そのメカニズムを明らかにした。さらに制御因子の探索を進めた。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that phosphorylation of p62 at Ser349 markedly increases p62's binding affinity for Keap1, an adaptor of the Cul3-ubiquitin E3 ligase complex responsible for degrading Nrf2, and induces expression of cytoprotective Nrf2 targets (p62-Keap1-Nrf2 axis). Further, we have demonstrated that the S349-phosphorylated p62 causes rearrangement of glucose and glutamine metabolism through persistent activation of Nrf2, which provides HCC cells with both tolerance to anti-cancer drugs and proliferation potency. However, the molecular mechanisms regulating the p62-Keap1-Nrf2 axis are not yet fully understood. In this study, we performed high-content screening with human whole siRNA library. Further, we established derivatives of K67, inhibitor for the Keap1-phosphorylated p62 interaction, and developed fluorescent K67-derivative.

研究分野：生化学

キーワード：選択的オートファジー p62-Keap1-Nrf2経路 p62

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

p62-Keap1-Nrf2 経路は、p62/SQSTM1 (以下、p62 とする) のリン酸化を介して転写因子 Nrf2 が活性化される経路である。重要なことに、本経路は肝がん細胞株や肝がん患者組織では恒常的に活性化されており、がん細胞の増殖に有利な代謝リプログラミングや薬剤耐性に寄与している。すなわち、p62-Keap1-Nrf2 経路が亢進しているがんでは、リン酸化 p62 の制御が有効な抗がん治療となる。しかしながら、がん細胞の p62-Keap1-Nrf2 経路の制御に関わる決定的因子は同定されていなかった。

2. 研究の目的

p62-Keap1-Nrf2 経路の制御に関わる決定的因子の同定、およびその分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リン酸化 p62 の動態を基盤とするハイコンテンツスクリーニング系を構築し、ヒト全ゲノム siRNA ライブラリー (約 18,000 遺伝子) を用いた p62 の制御因子群のスクリーニング。

(2) p62-Keap1-Nrf2 経路を化合物で制御するためリン酸化 p62 と Keap1 の結合阻害剤化合物の誘導体の評価。

(3) p62-Keap1-Nrf2 経路をモニターするためのツールとしてリン酸化 p62 を指標としたオートファジー活性判定システムの構築。

4. 研究成果

(1) p62 制御因子のスクリーニング

Huh1 を Control siRNA、p62 siRNA、ATG3 siRNA でノックダウンした後、抗リン酸化 p62 特異的抗体を用いて蛍光免疫染色を行った結果、p62 遺伝子のノックダウンによる p62 シグナルの減少、および ATG3 遺伝子のノックダウンによる p62 シグナルの増強が認められた。以上の結果は、スクリーニングのネガティブ、またはポジティブコントロールとして p62 と ATG3 の siRNA が利用可能であることを示している (図 1)。

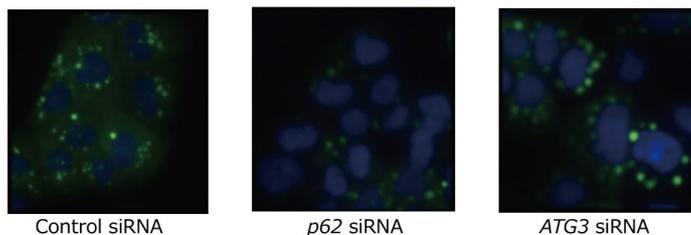


図1 siRNA導入による遺伝子ノックダウン

Huh1をControl siRNA (左)、p62 siRNA (中央)、ATG3 siRNA (右) でノックダウンした後、抗リン酸化p62特異的抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。p62遺伝子のノックダウンによるp62シグナルの減少、およびATG3遺伝子のノックダウンによるp62シグナルの増強が認められた。以上の結果は、スクリーニングのネガティブ、またはポジティブコントロールとしてp62とATG3のsiRNAが利用可能であることを示している。

CellInsight CX5 (Thermo Scientific) を用いて細胞質に存在するリン酸化 p62 集合体の蛍光シグナルを検出し、細胞 1 個あたりの p62 ドット数を自動計測することで p62 のシグナルの増減を指標としたスクリーニングを実施した(図 2)。

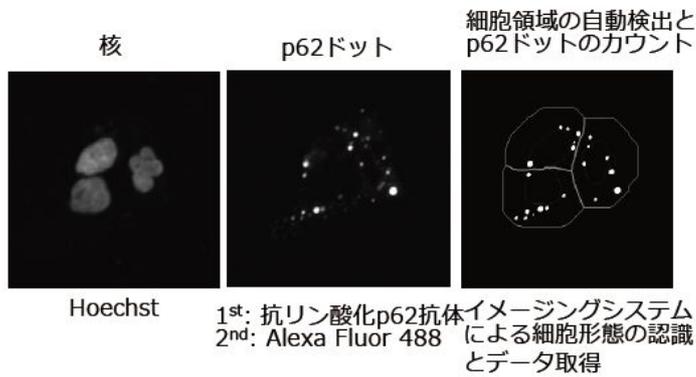


図2 リン酸化p62の動態を基盤とするハイコンテンツスクリーニング
CellInsight CX5 (Thermo Scientific) を用いて細胞質に存在するリン酸化p62集合体の蛍光シグナルを検出、細胞1個あたりのp62ドット数を自動計測した。

ヒト全ゲノム siRNA ライブラリーを用いて、p62 が顕著に蓄積ないしは減少させる候補遺伝子を取得した。これら候補遺伝子については現在解析中である。p62 リン酸化に関連する遺伝子を同定することで p62-Keap1-Nrf2 システムの制御機構の詳細を明らかにしていく。

(2) K67 誘導体の検証

オートファジー異常によって蓄積するリン酸化 p62 と KEAP1 の結合を阻害する化合物 K67 の構造改変体を作製し、水溶性に富む 6 種の化合物を取得した。特に、そのうちの一つは、リン酸化 p62 と KEAP1 の結合だけでなく、NRF 2 と KEAP1 との結合も強く阻害した (図 3)。近年、がん細胞での NRF2 活性化はがんの悪性化に繋がる一方で、がん微小環境における NRF2 活性化は腫瘍の抑制効果を示すという報告がなされている。この知見に基づくと、新規化合物はがん微小環境における NRF2 活性化剤として利用可能であることから、引き続きマウス個体レベルでの検証へ進む。

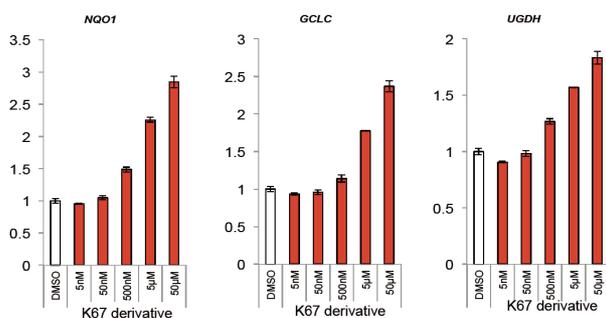


図3 K67誘導体によるNrf2活性化

K67誘導体で処理したHuh7よりmRNAを抽出し、qPCRでNrf2の標的遺伝子の変動を調べた結果、K67誘導体の濃度依存的にNrf2の活性化が認められた。

(3) オートファジー活性判定を目的とする K67 誘導体の蛍光標識化合物

K67 誘導体を BODIPY で標識した化合物を新規に作成した。インビトロ実験で本化合物と Keap1 の結合を定量解析することに成功している (図 4)。Keap1 は p62 と結合することでオートファジーに依存して分解される。したがって、Keap1 結合蛍光標識化合物の細胞内蓄積、ないしは局在を観察、定量化することで、p62-Keap1-Nrf2 経路の活性化状態の判定が可能となる。現在、蛍光標識化合物の細胞内への取り込み効率の改善を進めると

同時に、その細胞内局在の解析を進めている。

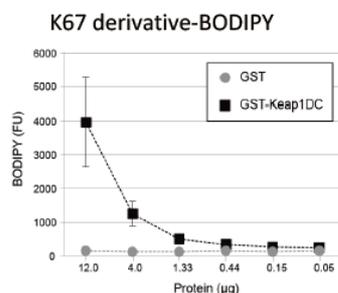


図4 K67誘導体の蛍光標識化合物

グルタチオンセファロースに結合させたGST-Keap1にK67 derivative-BODIPYを結合させた後に洗浄、回収。各濃度のGST-Keap1DCに結合回収されたKZO-FL001の蛍光を測定した。GST-Keap1の濃度に依存して化合物の蛍光シグナルの上昇が見られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

一村義信, 小松雅明: p62 を介した選択的オートファジー, 医学のあゆみ, Vol. 267,1023-1028 (2018) (総説)

Ichimura Y*, Komatsu M: Activation of p62/SQSTM1-Keap1-Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Pathway in Cancer. Front Oncol. 8:210, 2018 (*corresponding author), (総説) 査読あり

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, 査読あり

Nahorski MS, Maddirevula S, Ishimura R, Alsahli S, Brady AF, Begemann A, Mizushima T, Guzmán-Vega FJ, Obata M, Ichimura Y, Alsaif HS, Anazi S, Ibrahim N, Abdulwahab F, Hashem M, Monies D, Abouelhoda M, Meyer BF, Alfadhel M, Eyaid W, Zweier M, Steindl K, Rauch A, Arold ST, Woods CG, Komatsu M, Alkuraya FS.: Biallelic UFM1 and UFC1 mutations expand the essential role of ufmylation in brain development. Brain. 141:1934-1945, 2018, 査読あり

Yasuda D, Yuasa A, Obata R, Nakajima M, Takahashi K, Ohe T, Ichimura Y, Komatsu M, Yamamoto M, Imamura R, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Mashino T.: Discovery of benzo[g]indoles as a novel class of non-covalent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor. Bioorg Med Chem Lett. 27:5006-5009, 2017, 査読あり

Habisov, S.*, Huber, J.*, Ichimura, Y*., Akutsu, M., Rogova, N., Loehr, F., McEwan, D.G., Johansen, T., Dikic, I., Doetsch, V., Komatsu, M., Rogov, V.V., Kirkin, V.: Structural and functional analysis of a novel interaction motif within UFM1-activating enzyme 5 (UBA5) required for binding to ubiquitin-like proteins and ufmylation. J Biol Chem 291: 9025-9041, 2016. (*equally contributed), 査読あり

一村義信: オートファジー制御におけるユビキチン化の役割と疾患, 医学のあゆみ, Vol. 256, 896-902 (2016) (総説)

Saito T, Ichimura Y, Taguchi K, Suzuki T, Mizushima T, Takagi K, Hirose Y, Nagahashi M, Iso T, Fukutomi T, Ohishi M, Endo K, Uemura

T, Nishito Y, Okuda S, Obata M, Kouno T, Imamura R, Tada Y, Obata R, Yasuda D, Takahashi K, Fujimura T, Pi J, Lee MS, Ueno T, Ohe T, Mashino T, Wakai T, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Motohashi H, Waguri S, Soga T, Yamamoto M, Tanaka K, Komatsu M.: p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. Nat Commun. 7:12030, 2016, 査読あり

Muona M, Ishimura R, Laari A, Ichimura Y, Linnankivi T, Keski-Filppula R, Herva R, Rantala H, Paetau A, Pöyhönen M, Obata M, Uemura T, Karhu T, Bizen N, Takebayashi H, McKee S, Parker MJ, Akawi N, McRae J, Hurles ME, DDD Study, Kuismin O, Kurki MI, Anttonen AK, Tanaka K, Palotie A, Waguri S, Lehesjoki AE, Komatsu M. Biallelic Variants in UBA5 Link Dysfunctional UFM1 Ubiquitin-like Modifier Pathway to Severe Infantile-Onset Encephalopathy. Am J Hum Genet. 99:683-694, 2016, 査読あり

Dragich, JM., Kuwajima, T., Hirose-Ikeda, M., Yoon, MS., Eenjes, E., Bosco, JR., Fox, LM., Lystad, AH., Oo, TF., Yarygina, O., Mita, T., Waguri, S., Ichimura, Y., Komatsu, M., Simonsen, A., Burke, RE., Mason, CA., Yamamoto, A. : Autophagy linked FYVE (Alfy/WDFY3) is required for establishing neuronal connectivity in the mammalian brain. Elife 5. pii: e14810, 2016, 査読あり

Yasuda D, Nakajima M, Yuasa A, Obata R, Takahashi K, Ohe T, Ichimura Y, Komatsu M, Yamamoto M, Imamura R, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Mashino T.: Synthesis of Keap1-phosphorylated p62 and Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors and their inhibitory activity. Bioorg Med Chem Lett.26:5956-5959, 2016 , 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

一村義信、Omar Faruk、小幡美貴、小松雅明、リン酸化 p62 を指標とするオートファジーFlux assay 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28日-30日

一村義信、Omar Faruk、小幡美貴、小松雅明、リン酸化 p62 抗体を利用したオートファジーフラックスアッセイ、第11回オートファジー研究会、掛川、2018年11月19-20日

Yoshinobu Ichimura, Tetsuya Saito, and Masaaki Komatsu, High-throughput screening for inhibitors of p62-Keap1 protein-protein interaction The 8th International Symposium on Autophagy (ISA),奈良, 2017.5.29-6.1

一村義信、小松雅明、 p62/Sqstm1 の Keap1 相互作用領域をリン酸化するキナーゼのスクリーニング 第89回日本生化学会大会、仙台、2016年9月25日-27日

〔図書〕(計 1 件)

オートファジー 分子メカニズムの理解から病態の解明まで 南山堂
一村義信、小松雅明 “ 哺乳類選択的オートファジー概論 ” (2018)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。