

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07505

研究課題名(和文)オートファジー・酸化ストレスの観点からのp62-ALS変異の疾患発症機序の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of ALS linked p62-mutants from the point of view of autophagy and oxidative stress

研究代表者

渡邊 義久 (Watanabe, Yoshihisa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50363990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)/前頭側頭型認知症(FTD)の原因遺伝子の1つとして多機能タンパク質p62が明らかになっている。本研究ではこのp62の変異と疾患発症機序の研究を行った。変異型p62はストレスにより発現誘導を受けたプロテアーゼによってKeap1結合ドメインやLC3結合ドメインで切断される。この切断は酸化ストレス応答の制御やユビキチン化タンパク質のオートファジー分解などの機能が障害されることを明らかにした。これらの障害がALS/FTDの発症原因の1つになっている可能性が示唆され、変異p62を切断するプロテアーゼの阻害剤は新たな治療法になる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では筋萎縮性側索硬化症(ALS)/前頭側頭型認知症(FTD)の原因遺伝子の1つであるp62による疾患発症機序の研究を行った。ALS/FTD変異p62はストレスにより異常な切断を受け、酸化ストレス応答やオートファジーに障害を及ぼすことが明らかになった。今後、この異常切断を行うプロテアーゼを解明することで新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mutations in a multifunctional adaptor protein p62 are associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). p62 is implicated in selective autophagy and oxidative stress response. To investigate the pathogenic mechanism of ALS/FTD by p62 mutations, we produced the stable cell lines expressing p62-WT, P392L and G425R. Interestingly, both p62 mutants were cleaved at specific positions under stress conditions. Next, we assessed oxidative stress response via the p62-Keap1-Nrf2 axis in p62 mutant cells. Heme oxygenase-1 expression was significantly suppressed in both p62 mutant cells. Furthermore, p62 mutations decreased the binding of the UBA domain to ubiquitinated proteins. These results suggest that reduction of stress response and autophagic clearance of ubiquitinated proteins might be involved in the pathogenic mechanism of ALS/FTD by p62 mutations.

研究分野：神経内科

キーワード：筋萎縮性硬化症 前頭側頭型認知症 p62 オートファジー 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

筋委縮性側索硬化症 (ALS) / 前頭側頭型認知症 (FTD) は疾患ゲノム解析から複数の責任遺伝子が明らかになっており、それらの幾つかは RNA 結合タンパク質やオートファジー関連タンパク質であることが知られている。p62/SQSTM1 は複数のタンパク質と相互作用する多機能タンパク質である。その機能は様々な細胞内情報伝達、オートファジーそして酸化ストレス応答制御などが明らかになっている。p62 の変異は骨ペーজেット病や ALS/FTD の原因になることが報告されているが、それらの発症機序はまだ明らかになっていない。研究代表者は本研究に先立ち、p62 のユビキチン結合ドメイン (UBA) 内の ALS/FTD 変異の解析を行ったところ、P392L および G425R 変異では酸化ストレスやプロテアソーム阻害により p62 の内部で特異的な切断が起きることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では p62 の ALS/FTD 変異が様々なストレスによって異常な切断を受け、p62 の機能にどのような障害が起きるのかを明らかにする。そして、その機能障害と疾患発症との関連性を解明する。

3. 研究の方法

① ALS/FTD 変異 p62 の切断部位の決定

P392L 変異 p62 を発現する培養細胞を亜ヒ酸で 12 時間処理した後、0.5% Triton X-100 を含むバッファーに細胞をサスペンドしソニケーションした。遠心後、上清を回収して抗 p62 抗体で免疫沈降を行った。Protein G マグネットビーズで回収したサンプルを SDS-PAGE で分離し、p62 切断分子をゲルから切り出し、トリプシン処理後 LC-MS で分析し MASCOT および PEAKS で切断部位の解析を行った。また、質量分析の結果をもとに p62 切断分子を作製し分子量を SDS-PAGE で確認した。

② ALS/FTD 変異 p62 の切断酵素の同定

カルパイン阻害剤 (ALLN) やカスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK) による ALS/FTD 変異 p62 の切断阻害実験を行った。またパーキンソン病関連プロテアーゼ HtrA2 による切断も解析するために siRNA でノックダウンしてウエスタンブロットを行った。

③ HSF1 パスウェイを介した ALS/FTD 変異 p62 の切断解析

ALS/FTD 変異 p62 を切断するプロテアーゼの発現が HSF1 により制御されるか阻害剤を用い解析した。細胞を亜ヒ酸と HSF1 阻害剤 KRIBB11 で処理した。その後、ウエスタンブロットで切断分子の解析を行った。

④ ALS/FTD 変異 p62 の Keap1-Nrf2 酸化ストレス応答への影響解析

WT, P392L, G425R 変異 p62 を発現する細胞を亜ヒ酸処理した後、細胞から RNA を精製して cDNA を合成した。そしてリアルタイム PCR で抗酸化遺伝子 HO-1 の発現レベルを測定した。また、これら細胞を用い HO-1 タンパク質のウエスタンブロットも行った。Keap1 の細胞などの動態を観察するために、これらの細胞に GFP-Keap1 を発現し、酸化ストレス時の局在性を観察した。

⑤ ALS/FTD 変異 p62 の Ub 化タンパク質のオートファジー分解への影響

WT と G425R 変異 p62 を発現する細胞を亜ヒ酸処理した後、細胞抽出液を抗 p62 抗体で免疫沈降した。そして p62 に結合する Ub 化タンパク質の量をウエスタンブロット (抗ポリ Ub 抗体) で測定した。

⑥ ALS/FTD 変異 p62 によるストレス顆粒動態への影響

ストレス顆粒の動態を観察するために、細胞を亜ヒ酸で 30min 処理した後、通常の培養液に戻しさらに培養した。1, 2, 4 時間後に細胞を固定して、ストレス顆粒のマーカーである G3BP の免疫染色を行った。

⑦ ALS/FTD 変異 p62 による TDP-43 病態への影響

WT, P392L, G425R 変異 p62 を発現する細胞を亜ヒ酸処理した後、抗 TDP-43 抗体と p62 抗体で免疫染色を行った。酸化ストレスによる TDP-43 の動態を観察した。

4. 研究成果

P392L 変異 p62 を発現する細胞に亜ヒ酸で酸化ストレス負荷を行った。細胞抽出液に抗 p62

抗体を加え免疫沈降を行い、SDS-PAGEで分離後ゲルを回収し質量分析で切断部位の同定を行った。その結果、N330、Q357、P359が切断部位の候補として明らかになった。そこで、それぞれの断片を人工的に作製した。p62₁₋₃₃₀、p62₁₋₃₅₇、p62₁₋₃₅₉をp62KO-HeLa細胞で発現し、ウエスタンブロットで分子量を比較した(図1)。その結果、変異p62の切断は主にQ357もしくはP359で僅かにN330でも起きていることが分かった。これらはKeap1結合ドメイン(KIR)やLC3結合ドメイン(LIR)に位置していた。

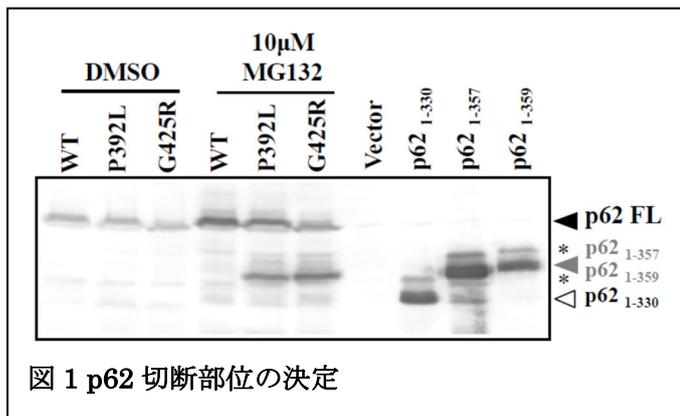


図1 p62 切断部位の決定

次に、変異p62を切断するプロテアーゼを検索するためにカルパイン阻害剤(ALLN)およびカスパーゼ阻害剤(Z-VAD-FMK)による切断阻害実験を行った。P392LおよびG425Rを発現する細胞に重ヒ酸処理を行うと同時にALLNまたはZ-VAD-FMKを添加した。その後p62のウエスタンブロットで切断を確認したところどちらの阻害剤も効果が無かった。その他の候補プロテアーゼとしてHtrA2に着目した。HtrA2はパーキンソン病に関連するセリンプロテアーゼである。siRNAを用いてHtrA2発現をノックダウンして同様に阻害実験を行ったが、コントロールsiRNAと同様に変異p62の切断は起きたことから、HtrA2も関与しないことが分かった。そこで、プロテアーゼを特定するために近位依存性ビオチン化法(BioID)を利用して検索することにした。ベイトタンパク質としてMACタグを用いMAC-変異p62融合タンパク質を構築した。この融合タンパク質でもストレス依存的に切断が起きるか確かめたが特異的な切断は認められなかった。本研究期間内ではプロテアーゼを特定することができなかったが、今後新しい方法で特定する予定である。

変異p62の切断はストレス時に起きることから、このプロテアーゼはストレス依存的に発現すると予想された。そこで、ストレス応答のマスターレギュレーターであるHSF1依存的に発現制御を受けているか確かめた。変異p62発現細胞を重ヒ酸処理するとともにHSF1阻害剤KRIBB11を添加した。その後、ウエスタンブロットで変異p62の切断を確かめた。その結果、KRIBB11で阻害すると変異p62の切断は抑制された(図2)。このことから、このプロテアーゼはHSF1により発現制御を受けていることが明らかになった。

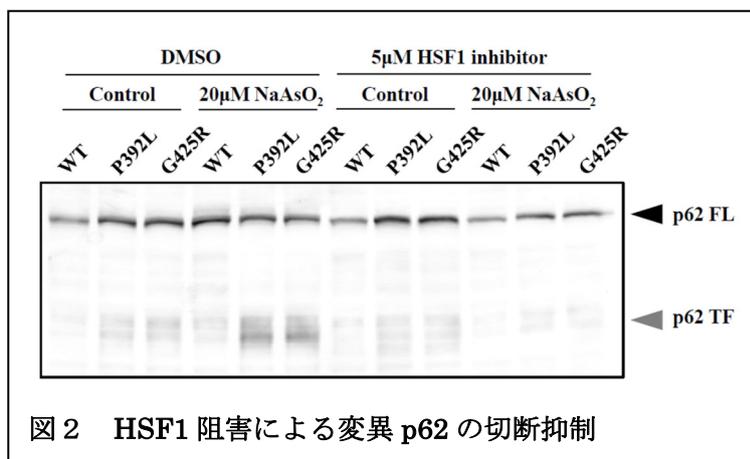


図2 HSF1 阻害による変異p62の切断抑制

変異p62はストレス暴露によりKIRドメインやLIRドメインで切断される。この切断によりp62の機能へどのような影響を及ぼすのか検討した。p62はKIRドメインを介して酸化ストレス応答因子Keap1と結合し、Nrf2の抑制は解除され抗酸化遺伝子群の発現が上昇する。そこで、p62の酸化ストレス応答への影響を調べた。野生型または変異p62発現細胞を重ヒ酸処理し、細胞からRNAを調製してcDNAを合成した。そして抗酸化遺伝子の1つであるHO-1の発現をリアルタイムPCRで測定した。その結果、P392LやG425Rを発現する細胞ではHO-1の発現レベルが約50%近くまで減少した(図3A)。さらにHO-1のウエスタンブロットでも発現を解析したところ、50%近くまでHO-1タンパク質の発現は減少していた(図3B)。そして、Keap1の細胞内局在性を観察したところ、野生型p62発現細胞ではp62とGFP-Keap1は酸化ストレスにより凝集体を形成したが、変異p62発現細胞ではどちらも変化なかった(図4)。このことから、変異p62は酸化ストレスにより切断されるためKeap1との結合ができなくなり、Nrf2の活性化を阻害した結果酸化ストレス応答が抑制されることが明らかとなった。

次に、オートファジーレセプター活性を調べた。p62はLIRとUBAドメインを介してLC3やUb化タンパク質と結合することで、Ub化タンパク質のオートファジー分解に関与する。野生型もしくはG425R変異p62を発現する細胞を重ヒ酸処理し、細胞抽出液を抗p62抗体で免疫沈降した。そして、共沈殿したポリユビキチンをウエスタンブロットで解析した。野生型p62では多くのUb化タンパク質の結合が観察されたが、G425Rでは減少していた。このことから、変異型p62はオートファジーレセプター活性が減少していることが分かった(図5)。

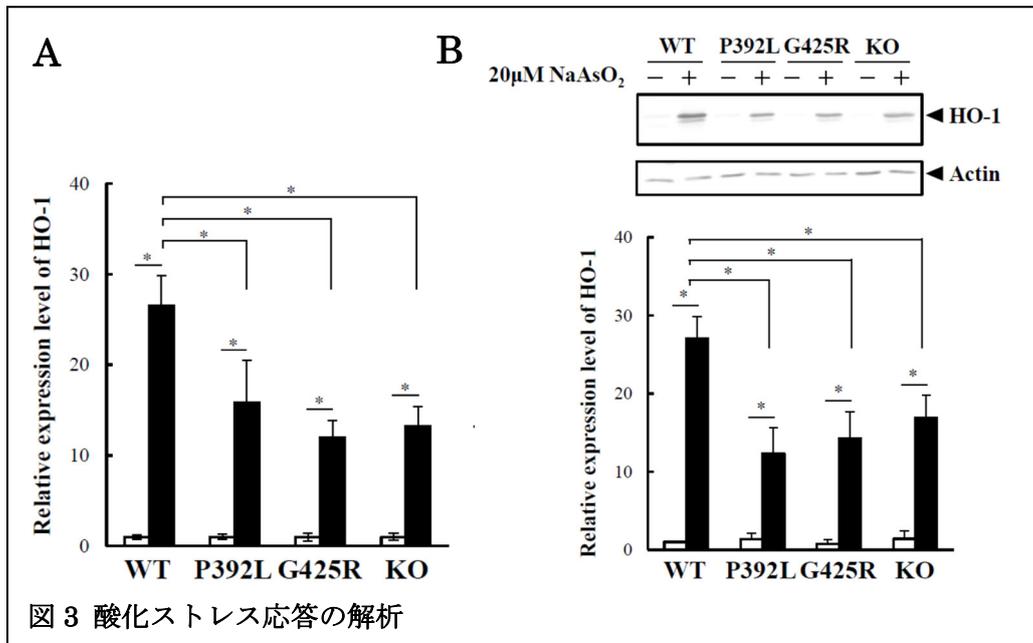


図3 酸化ストレス応答の解析

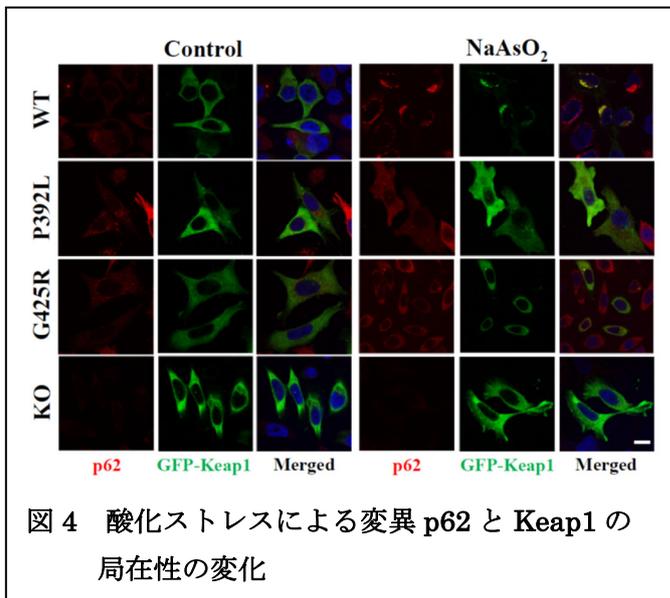


図4 酸化ストレスによる変異 p62 と Keap1 の局在性の変化

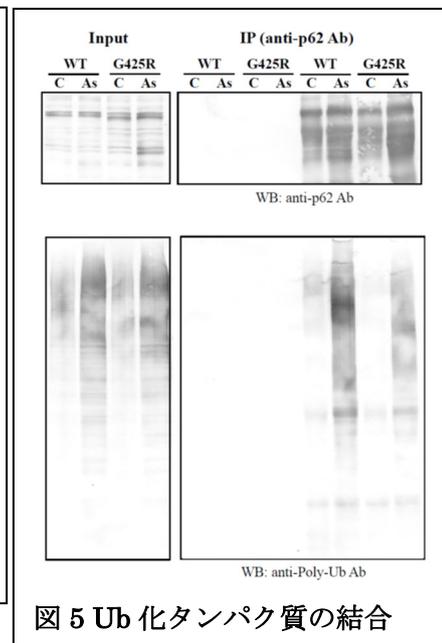


図5 Ub 化タンパク質の結合

ALS/FTD の発症にストレス顆粒の形成や消失が関与することが明らかになりつつある。そこで、変異 p62 発現細胞におけるストレス顆粒の形成と消失を観察することにした。細胞を 30 分間亜ヒ酸処理し、除いた後さらに通常の培養液でインキュベートした。ストレス顆粒の観察のために抗 G3BP 抗体で免疫染色を行った。亜ヒ酸処理により野生型や変異 p62 細胞ではストレス顆粒が形成された (図 6)。そして、通常培地に戻して 2 時間後には同様にストレス顆粒は消失したことから (図 6)、変異 p62 細胞ではストレス顆粒に大きな違いはなかった。

次に、ALS/FTD の病理学的特徴の TDP43 病態を観察した。野生型および変異 p62 発現細胞を亜ヒ酸で処理し、TDP43 および p62 の局在性を免疫染色で観察した。いずれの場合も TDP43 は核内に存在しており、核外で凝集体を形成することはなかった (図 7)。

以上の結果より、ALS/FTD 変異 p62 はストレスにより発現誘導されたプロテアーゼにより切断され、その結果オートファジーレセプター活性や酸化ストレス応答に障害が起きてしまうことが明らかになった。これらの障害が ALS/FTD 発症に関与している可能性が示唆される。今後、ALS/FTD 患者の神経細胞内でも同様の現象が起きているのか観察する必要がある。もし同様であれば p62 の切断を抑制する薬剤が治療に効果的であるかもしれない。

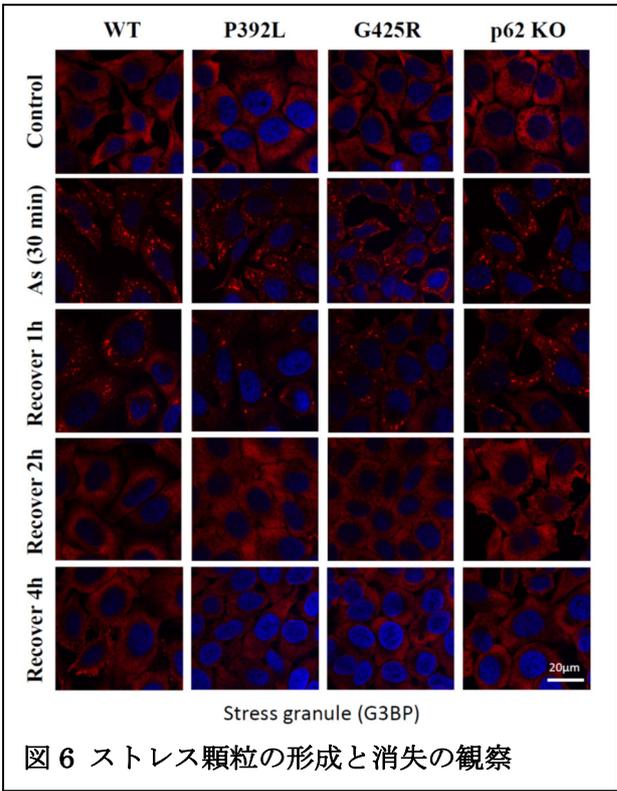


図 6 ストレス顆粒の形成と消失の観察

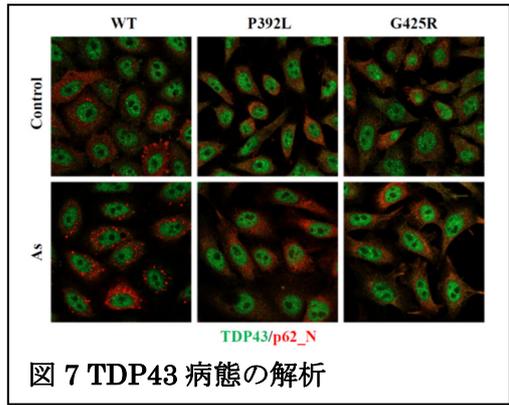


図 7 TDP43 病態の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Taguchi Katsutoshi、Watanabe Yoshihisa、Tsumijima Atsushi、Tanaka Masaki	4. 巻 57
2. 論文標題 -Synuclein Promotes Maturation of Immature Juxtglomerular Neurons in the Mouse Olfactory Bulb	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 1291 ~ 1304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-019-01814-3	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 Taguchi K, Watanabe Y, Tsumijima A, Tanaka M.	4. 巻 94
2. 論文標題 Expression of -synuclein is regulated in a neuronal cell type-dependent manner.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anat Sci Int	6. 最初と最後の頁 11-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-018-0464-8	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 Nakamura S, Oba M, Suzuki M, Takahashi A, Yamamuro T, Fujiwara M, Ikenaka K, Minami S, Tabata N, Yamamoto K, Kubo S, Tokumura A, Akamatsu K, Miyazaki Y, Kawabata T, Hamasaki M, Fukui K, Sango K, Watanabe Y, Takabatake Y, Kitajima T, Okada Y, Mochizuki H, Isaka Y, Antebi A, Yoshimori T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08729-6	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 Watanabe Yoshihisa、Taguchi Katsutoshi、Tanaka Masaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Ubiquitin, Autophagy and Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2022 ~ 2022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9092022	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., Tanaka, M
2. 発表標題 -Synuclein promotes maturation of immature juxtglomerular neurons in the mouse olfactory bulb
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 虚血モデルを用いた嗅球傍系体細胞に高発現するパーキンソン病関連分子 シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 脳虚血モデルを用いた嗅球傍系球体細胞に高発現するパーキンソン病関連分子 -シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第9回4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 一過性脳虚血モデルを用いた嗅球傍系球体細胞に高発現するパーキンソン病関連分子 -シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Taguchi, Y. Watanabe, A. Tsujimura, M. Tanaka.
2. 発表標題 -Synuclein counteracts immature identity of the periglomerular cells in the mouse olfactory bulb after ischemic stroke.
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M.
2. 発表標題 Isolation and characterization of cell-to-cell transmissible -synuclein seeds
3. 学会等名 8th APICA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 神経細胞間伝播性 -シヌクレインシードの同定とその解析
3. 学会等名 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 脳虚血モデルを用いた嗅球傍系球体細胞に高発現する -シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 嗅球傍系球体神経に高発現するパーキンソン病責任分子 -シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Watanabe Y, Taguchi K, Tsujimura A, Ueyama M, Nagai Y, Tanaka M.
2. 発表標題 ALS-FTD-linked mutations of SQSTM1/p62 suppress oxidative stress response via the NRF2-Keap1 axis
3. 学会等名 FENS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Watanabe Y., Tanaka M.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Publishing	5. 総ページ数 315
3. 書名 Regulation of Autophagy by the Heat Shock Factor 1-Mediated Stress Response Pathway. In: Asea A., Kaur P. (eds) Heat Shock Proteins and Stress. Heat Shock Proteins, vol 15.	

〔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
研究 分担 者	徳田 隆彦 (Tokuda Takahiko) (80242692)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------