

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03415

研究課題名（和文）p62変異による液-液相分離異常の微細形態とその分子基盤

研究課題名（英文）Fine morphology and molecular basis of liquid-liquid phase separation caused by the p62 mutation

研究代表者

和栗 聡（Waguri, Satoshi）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30244908

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：p62液滴の生理的意義を調べるために、p62の疾患関連遺伝子変異が液滴構造に与える影響を調べた。しかし他グループから類似研究が報告されたため、研究計画を変更して各種実験系におけるp62液滴の詳細解析を行った。高浸透圧ストレス下で誘導されるp62液滴とストレス顆粒は別個の挙動と微細構造を示すこと、そしてp62液滴を介したオートファジー分解の基質分子を見出した。また、肝細胞においてLC3に依存する選択的オートファジーを抑制すると多数の小胞を伴うp62液滴が形成され、ここにKeap1も局在した。他の結果と合わせ、p62液滴がオートファジー分解とストレス反応シグナルの起点となることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p62の遺伝子変異や封入体形成は、神経変性疾患、非アルコール性脂肪肝炎、肝細胞癌等で報告されている。これら封入体の形成は液-液相分離から始まると考えられるが、その病態生理学的な意義は不明であった。また、LC3に依存した選択的オートファジーの基質分解機序は明確ではなかった。今回、p62液滴の形成が選択的オートファジーの重要なプロセスを成すこと、その発動がストレス応答に直接関連していることを示した。本成果は、選択的オートファジーの新たな意義の解明につながるのと共に、p62液滴形成を制御することが上記疾患の病態の理解と、治療開発の糸口に繋がることを意味する。

研究成果の概要（英文）：To investigate the physiological significance of p62 droplets, the influence of disease-related genetic mutations in p62 on droplet structure was investigated. However, as a similar study was reported by others, the research plan was changed and detailed analyses of p62-droplets in various experimental systems were carried out. We found that p62-droplets and stress granules induced under hyperosmotic stress showed distinct behavior and fine structures. We also found molecules that undergo autophagy degradation via p62-droplets. In addition, inhibition of LC3-dependent selective autophagy in hepatocytes resulted in the formation of p62-droplets with numerous small vesicles, where Keap1 was also localized. Together with other results, the p62-droplets serve as a platform for both autophagy and stress response signaling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：p62液滴 SQSTM1 液-液相分離 ストレス顆粒 高浸透圧ストレス 選択的オートファジー Keap1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内ではタンパク質や核酸などの分子がひしめいているが、これらは均質に混ざり合っているわけではない。特定の分子群は局所の環境や濃度変化によって液 - 液相分離という現象を経て集合し機能的構造をつくる。代表的なものは核小体やストレス顆粒であり、これらは総称して「液滴」あるいは「膜なしオルガネラ」と呼ばれる。研究開始当時、この新たな概念は細胞内のあらゆる現象に適用され始めていた。液滴を形成するタンパク質は、天然変性領域(立体構造をとらない領域)を介した多価結合能を有する特徴をもち、Tau、FUS、TDP-43、hnRNPA、p62などが知られている。医学的に重要なことは、それらの遺伝子異常は各種疾患の原因になると共に、細胞内封入体を形成することである。特に p62 (または SQSTM1) の遺伝子変異は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 前頭側頭型認知症、骨パジェット病で見つかっており、封入体形成はアルツハイマー病、パーキンソン病、非アルコール性脂肪肝炎、肝細胞癌で報告されている。これら疾患でみられる封入体や凝集体の形成は、この液 - 液相分離から始まると考えられ、発症早期における細胞内処理機構としてプロテアソームやオートファジー分解システムなどが注目されていた。しかし、*in vivo* における相分離の同定は困難であり、化学固定した細胞や組織で認められる集合体が、液体様の「液滴」か、それよりも固い「ゲル」か「凝集体」かを区別する術はなかった。ある細胞内構造が液滴であることを証明するには、*in vitro* 実験およびライブセルイメージング解析を用いて、構造の球状性、融合性、内部流動性、ヘキサソジオールによる分散性を示す必要がある。一方、化学固定した細胞では球状性という情報を提供できるが、補足に過ぎず、証明手段としては適さない。しかし、ヒト疾患や疾患動物モデルでは固定標本が多用され、実際に様々な形態を呈する液滴様構造が観察される。そもそも「細胞内の」液滴がどのような形態学的特徴を持ち、またどのような分子構成を有するのか、そしてどのような性状をもつ液滴が分解対象となり得るのかは全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究では相分離を引き起こす p62 液滴を対象として、その疾患関連遺伝子変異、リン酸化欠失変異、および結合因子による影響を細胞および個体レベルで解析し、電顕レベルの構造と対比させることで分子形態学的基盤を確立し、その検出法を開発する。本研究を通して凝集体様構造を細分化し、各種病態理解の高度化を目指す。

3. 研究の方法

(1) p62 遺伝子変異と液滴性状の関係性について

p62 遺伝子変異が p62 液滴の微細形態に与える影響を調べるため、各種変異を持つ p62 に GFP を付加した cDNA を p62 欠損 HeLa 細胞に導入し、形成された GFP 陽性液滴を相関光学 - 電子顕微鏡法 (CLEM) を用いて解析した。変異の部位としては、p62 どうしの結合に必要な PB1 ドメイン (K7A, D69A)、ユビキチンとの結合部位 (S403A)、オートファジー隔離膜局在分子である LC3 との結合部位 (各種 LIR 変異)、転写因 Nrf2 の制御因子である Keap1 の結合部位 (各種 KIR 変異) を用いた。

(2) 高浸透圧ストレス下で形成される p62 液滴とストレス顆粒の比較解析

これまで我々は、細胞を高浸透圧ストレス下に置くと p62 液滴が形成され、オートファジーで分解されることを見出している (Tamura et al., MCB, 2019)。各種癌由来細胞株において 0.2 ~ 0.4 M ショ糖による高浸透圧ストレスを 20 ~ 40 分間負荷し、この時形成される p62 液滴とス

トレス顆粒（マーカータンパク質である G3BP1 を指標）について、ライブセルイメージング解析、CLEM 解析による微細形態解析、および NBR1、OPTN、NDP52、TAX1BP1 等のオートファジーアダプター群の動態解析を行った。

(3) p62 液滴に集積するユビキチン化タンパク質の探索

膀胱癌由来 T24 細胞を高浸透圧ストレス環境下におき、p62 液滴を形成させた。その細胞抽出液から PTMscan によりユビキチン化タンパク質を精製し、質量分析計により同定した。同定したタンパク質について p62 液滴へ局在するか否か、そしてオートファジーで分解されるかどうかを解析した。

(4) 乳癌組織における p62 顆粒の解析

乳癌 113 症例の組織について抗 p62 抗体および抗リン酸化 p62 抗体を用いた免疫組織化学法を行い、p62 顆粒あるいはリン酸化 p62 顆粒の有無を解析し、臨床病理学的因子との関連解析や予後解析を行った。

(5) 粘性プローブを用いた液滴解析

Halo タグリガンドを利用した新規粘性プローブを評価するために、Halo タンパク質を安定に発現する T24 細胞を作製し、高浸透圧ストレスと細胞質粘性（蛍光寿命）および p62 液滴形成との関係を調べた。

(6) 選択的オートファジー減弱マウス肝臓における p62 液滴の解析

細胞に HyD-LIR-Venus を過剰発現させると、隔離膜における LC3 との結合部位がマスクされ、LC3 依存的に分解を受ける p62 が細胞内に蓄積して液滴を形成する。この p62 液滴の性状を解析するために、共同研究者らが作製した HyD-LIR-Venus の肝臓特異的ノックインマウスを用いて、光学顕微鏡及び電子顕微鏡解析を行った。

4. 研究成果

(1) p62 遺伝子変異と液滴性状の関係性について

PB1 ドメインの欠失変異を除く各種変異 p62 は、高発現することにより細胞内液滴を形成し、その形態はほぼ円形であり、内容物として粒子状あるいは線維状成分が均一に分布していた。これは過去の報告に一致するものである。また、その集積の程度、すなわち電子密度が変異により若干異なっていた。しかし、電子密度の差はわずかであること、発現レベルや細胞の状態で変わり得ること、そして CLEM により収集できるデータ数が少ないこと、そして他グループより ALS 関連の p62 変異について p62 液滴の細胞生物学的な研究が報告されたため (Faruk et al., JBC, 2021)、この実験計画は中止とした。

(2) 高浸透圧ストレス下で形成される p62 液滴とストレス顆粒の比較解析

ライブセルイメージング解析により p62 顆粒はストレス顆粒よりも短時間（数秒）で形成されること、CLEM 解析ではストレス顆粒よりも

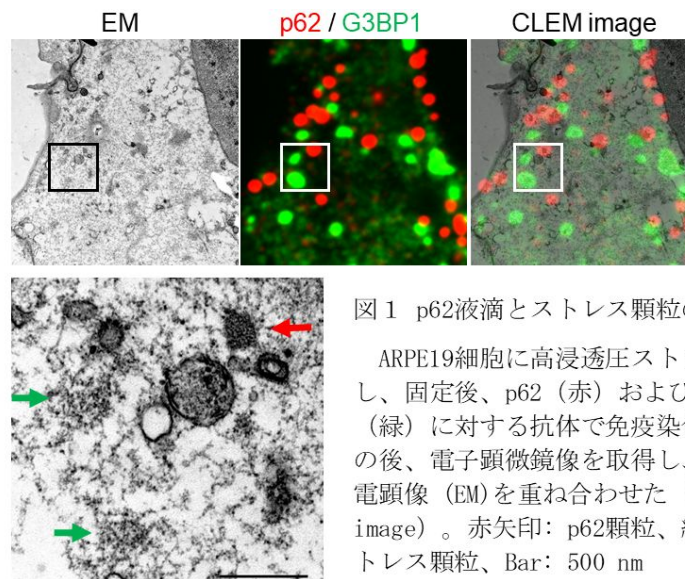


図1 p62液滴とストレス顆粒の微細構造

ARPE19細胞に高浸透圧ストレスを付加し、固定後、p62（赤）およびG3BP1（緑）に対する抗体で免疫染色した。その後、電子顕微鏡像を取得し、光顕像と電顕像（EM）を重ね合わせた（CLEM image）。赤矢印：p62顆粒、緑矢印：ストレス顆粒、Bar：500 nm

高い電子密度を有し、オートファジー隔離膜を伴うことが多いことが分かった(図1)。また、このp62液滴にはユビキチン鎖(K48鎖およびK63鎖)、NBR1、TAX1BP1、Keap1が局在し、オートファジー分解を受けることが分かった。さらに、このタイプのオートファゴソームは飢餓誘導によるオートファゴソームとはサイズや内容物の電子密度が異なっていた。以上より、p62液滴がストレス顆粒とは別個の構造であることを初めて明らかにした。また、高浸透圧ストレスによって誘導されるp62液滴の形成・分解における分子基盤的な理解が進んだ。これら成果は、日本細胞生物学会、日本解剖学会、国際オートファジーシンポジウムで口頭発表した。

(3) p62液滴に集積するユビキチン化タンパク質の探索

高浸透圧ストレスによりp62液滴に集積するユビキチン化タンパク質として、10個程度の解析候補タンパク質を抽出した。本成果は次期研究計画に引継ぐ予定である。

(4) 乳癌組織におけるp62顆粒の解析

症例によりp62およびリン酸化p62陽性顆粒数が異なっていた。また、細胞質におけるリン酸化p62のびまん性反応はp62のものより低く、p62顆粒がコントラスト良く検出できた。臨床病理学的因子との相関解析では、p62顆粒の有無は細胞増殖の指標であるKi-67と正の相関を認めた。また、予後解析ではp62陽性症例は無再発期間が有意に短いことを見出した。以上の結果より、リン酸化p62が予後予測マーカーとなる可能性が示唆された。本成果は次期研究計画に引継ぐ予定である。

(5) 粘性プローブを用いた液滴解析

0M、0.2M、0.4Mとシヨ糖添加量を増加させると、細胞質における蛍光寿命が有意に増加した(図2a)。このことは本プローブが粘性を反映することを示す。さらにp62顆粒数を調べたところ、0.2Mシヨ糖より0.4Mシヨ糖の方が多く(図2b)また細胞毎で調べると両者に弱い正の相関が認められた。以上の結果は粘性とオートファジーの関連性を示唆するものである。本成果は次期研究計画に引継ぐ予定である。

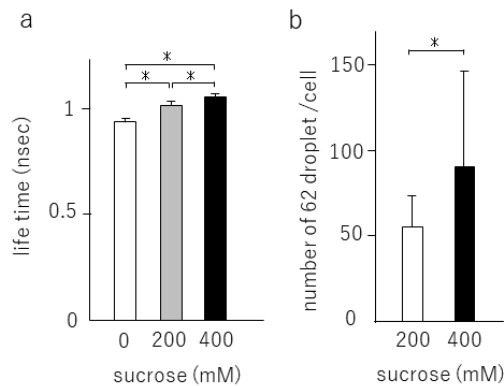


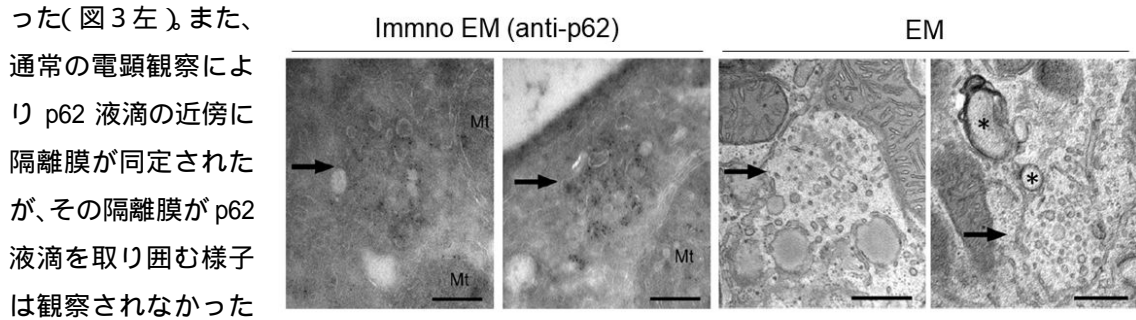
図2 粘性プローブの評価

培地にシヨ糖を加え、30分後に蛍光寿命を測定した(a; n=39)。その後固定し、抗p62抗体で染色後、細胞当たりのp62液滴数を数えた(b; n=28)。

* < 0.05 (Student's t-test)

(6) 選択的オートファジー減弱マウス肝臓におけるp62液滴の解析

HyD-LIR-Venusの肝臓特異的ノックインマウスに由来する初代肝細胞培養系を免疫電顕で解析したところ、p62液滴が多数の小胞を含む高電子密度の円形~楕円形構造体であることが分かった(図3左)また、



は観察されなかった

(図3右)

図3 HyD-LIR-Venusを高発現する初代肝培養細胞におけるp62液滴の微細形態

p62に対する抗体(6nm金コロイド標識)を用いた免疫電顕(Immuno EM)および通常の電子顕微鏡観察(EM)を行った。矢印:p62液滴、Mt:ミトコンドリア、*:オートファゴソーム/ファゴソーム様構造、Bar:500nm

また、HyD-LIR-Venus ノックイン肝臓において組織学的解析を行ったところ、肝細胞はやや肥大し、肝細胞で認められる p62 液滴はオートファジー不全肝臓よりも小さく、数も少なかった。また、ユビキチン、リン酸化 p62(S351)、Keap1 を含んでいた。その他、共同研究者らによる 3D 電顕解析、in vivo 解析、生化学的解析の結果を統合することで、p62 液滴がオートファゴソーム形成と Keap 1 -Nrf2 システムを介した抗酸化ストレス反応の両方に寄与することを明らかにした (Kageyama et al., Nat Commun, 2021)。

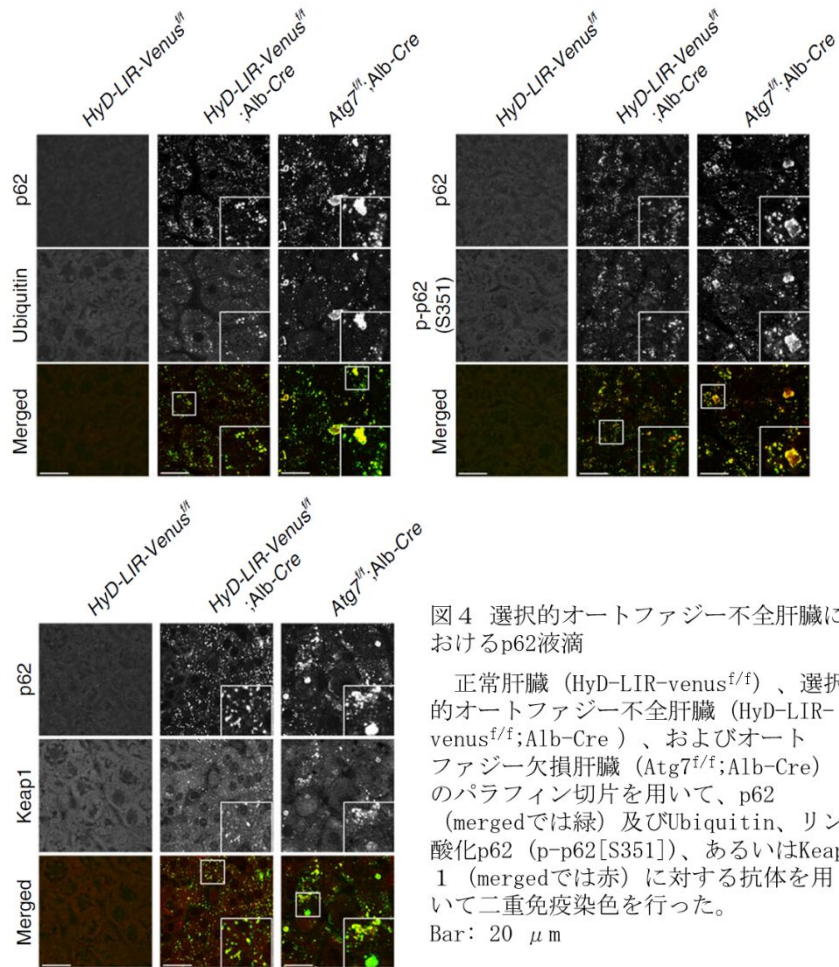


図4 選択的オートファジー不全肝臓におけるp62液滴

正常肝臓 (HyD-LIR-venus^{f/f})、選択的オートファジー不全肝臓 (HyD-LIR-venus^{f/f};Alb-Cre)、およびオートファジー欠損肝臓 (Atg7^{f/f};Alb-Cre) のパラフィン切片を用いて、p62 (mergedでは緑) 及びUbiquitin、リン酸化p62 (p-p62[S351])、あるいはKeap 1 (mergedでは赤) に対する抗体を用いて二重免疫染色を行った。
Bar: 20 μm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kuchitsu Y, Mukai K, Uematsu R, Takaada Y, Shinojima A, Shindo R, Shoji T, Hamano S, Ogawa E, Sato R, Miyake K, Kato A, Kawaguchi Y, Nishitani-Isa M, Izawa K, Nishikomori R, Yasumi T, Suzuki T, Dohmae N, Uemura T, Barber GN, Arai H, Waguri S, Taguchi T	4. 巻 25
2. 論文標題 STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 453 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-023-01098-9	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 Ishimura R, El-Gowily AH, Noshiro D, Komatsu-Hirota S, Ono Y, Shindo M, Hatta T, Abe M, Uemura T, Lee-Okada HC, Mohamed TM, Yokomizo T, Ueno T, Sakimura K, Natsume T, Sorimachi H, Inada T, Waguri S, Noda NN, Komatsu	4. 巻 13
2. 論文標題 The UFM1 system regulates ER-phagy through the ufmylation of CYB5R3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35501-0	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 Ding Wen-Xing, Ni Hong-Min, Waguri Satoshi, Komatsu Masaaki	4. 巻 77
2. 論文標題 Lack of hepatic autophagy promotes severity of liver injury but not steatosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 1458 ~ 1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2022.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takefumi Uemura, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Satoshi Waguri	4. 巻 10
2. 論文標題 Clathrin adapters AP-1 and GGA2 support expression of epidermal growth factor receptor for cell growth.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00367-2	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 Shun-Suke Sakai, Atsushi Hasegawa, Ryosuke Ishimura, Naoki Tamura, Shun Kageyama, Satoko Komatsu-Hirota, Manabu Abe, Yiwei Ling, Shujiro Okuda, Manabu Funayama, Mika Kikkawa, Yoshiki Miura, Kenji Sakimura, Ichiei Narita, Satoshi Waguri, Ritsuko Shimizu, Masaaki Komatsu	4. 巻 42
2. 論文標題 Loss of Atg2b and Gskip Impairs the maintenance of the hematopoietic stem cell pool size.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e0002421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00024-21	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 Kageyama S, Gudmundsson SR, Sou Y-S, Ichimura Y, Tamura N, Kazuno S, Ueno T, Miura Y, Noshiro D, Abe M, Mizushima T, Miura N, Okuda S, Motohashi H, Lee JA, Sakimura K, Ohe T, Noda NN, Waguri S, Eskelinen EL, Komatsu M	4. 巻 12
2. 論文標題 p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20185-1	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 Mori Tatsuhiko, Tamura Naoki, Waguri Satoshi, Yamamoto Toshiyuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Autophagy is involved in the sclerotic phase of systemic sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FUKUSHIMA JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE	6. 最初と最後の頁 17 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5387/fms.2019-28	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15件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田村直輝、和栗聡
2. 発表標題 高浸透圧ストレス下で形成される非膜性オルガネラの解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoki Tamura, Satoshi Waguri
2. 発表標題 Characterization of p62-body induced under hyperosmotic stress in mammalian cells
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 直輝、和栗 聡
2. 発表標題 高浸透圧ストレス下で形成される非膜性オルガネラの比較解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村直輝、和栗聡
2. 発表標題 高浸透圧ストレス下で形成される非膜性オルガネラの微細構造解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ritsuko Arai, Shun-ichi Yamashita, Tatsuya Sugisaki, Wu Huajui, Tomotake Kanki, Satoshi Waguri
2. 発表標題 Ultrastructural analysis on the process of isolation membrane formation during piecemeal mitophagy
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井 律子、山下 俊一、杉崎 達也、Wu Huajui、神吉 智丈、和栗 聡
2. 発表標題 ピースミールマイトファジー隔離膜形成プロセスの微細形態学的解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村 武文、和栗 聡
2. 発表標題 Recycling endosome-localized clathrin adaptors AP-1 and GGA2 regulate cell surface expression of EGFR for cell growth
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和栗 聡、田村 直輝
2. 発表標題 哺乳類細胞におけるSQSTM1/p62液滴の形成と分解
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村直輝、和栗聡
2. 発表標題 高浸透圧ストレス変動に応答したp62顆粒およびストレス顆粒の形成・消失機序
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村直輝、和栗聡
2. 発表標題 高浸透圧ストレス下における非膜性オルガネラの形成と分解
3. 学会等名 第66回日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ritsuko Arai, Shun-ichi Yamashita, Tatsuya Sugisaki, Wu Huajui, Tomotake Kanki, Satoshi Waguri
2. 発表標題 Ultrastructural analysis on the process of isolation membrane formation during piecemeal mitophagy
3. 学会等名 126th Annual meeting of The Japanese Association of Anatomists (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>福島県立医科大学 解剖・組織学講座 https://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/</p>

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	田村 直輝 (Tamura Naoki) (70745992)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小松 雅明 (Komatsu Masaaki)		

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