

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06549

研究課題名（和文）選択的オートファジー基質p62/SQSTM1液滴の分子病態の解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular pathogenesis of the selective autophagy substrate p62/SQSTM1 droplet

研究代表者

蔭山 俊（Kageyama, Shun）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30624225

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）：液-液相分離により液滴を形成するp62タンパク質のオートファジーによる選択的分解機構や疾患関連点変異の分子病態は不明であった。本研究により、p62液滴はオートゴソーム形成の足場となり、オートファゴソーム膜に局在するLC3/GABARAPタンパク質との相互作用を介して選択的に分解されることが明らかになった。また、p62液滴の性質は翻訳後修飾により制御されており、疾患関連点変異はp62液滴の質的变化をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患などで確認される封入体は生化学的機能を消失した液滴の凝集化体であると考えられるようになっており、液滴制御機構の解明は急務である。本研究は基礎研究領域のみならず臨床や創薬への応用まで大きく波及効果をもたらし、革新的・創造的な学術研究の発展に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of selective autophagic degradation of p62 protein, which forms droplets by liquid-liquid phase separation, and the molecular pathogenesis of disease-related point mutations were unknown. Here, we found that p62 droplets serve as a scaffold for autophagosome formation and are selectively degraded via interaction with LC3/GABARAP proteins localized on the autophagosome membrane. We also found that the properties of p62 droplets are regulated by post-translational modifications and that disease-associated point mutations result in qualitative changes in p62 droplets.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：オートファジー p62-KEAP1-NRF2 酸化ストレス リン酸化 液-液相分離 液滴

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内にはストレス顆粒、生殖顆粒や核小体など多数の液滴が存在しており、環境の変化といった外乱の影響によって変化することを阻止するストレス応答システムを制御する。液滴を形成するタンパク質の遺伝子変異はアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭型認知症 (FTD) などの神経変性疾患、前立腺がんやユーイング肉腫などの腫瘍を引き起こす。神経変性疾患などで確認される封入体は液滴の形成や分解不全の結果として起こる生化学的機能を消失した液滴の凝集化体であると考えられるようになっており、液滴形成制御機構の解明は急務である。一方で、異常あるいは過剰に形成された液滴は速やかに分散あるいは分解される必要がある。液滴は細胞小器官に匹敵する大きさであることから、その合理的な分解系としてオートファジー経路が考えられる。事実、液滴であるストレス顆粒や生殖顆粒はオートファジーにより分解される。一方、オートファジーの不全は凝集体形成を伴った神経変性疾患や肝腫瘍といった様々な疾患を起こす。しかし、オートファジーによる液滴の選択的分解の仕組みはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

申請者らのグループは、p62 がストレス依存的に発現誘導され、オートファジーによるユビキチン化タンパク質や変性オルガネラの除去を促進することでタンパク質やオルガネラの恒常性維持に働くことを見出し報告してきた。この時、酸化ストレス応答のマスター転写因子 NRF2 が活性化、抗酸化タンパク質の遺伝子発現を統一的に誘導し細胞変性を防ぐことも明らかにした。さらに、p62 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭型認知症 (FTD) といった神経変性疾患や骨ペーজেット病 (PDB) の原因遺伝子であり、現在までに 100 近くの点変異が報告されている。以上のことから、p62 は相分離の研究を分子から個体レベルの生理的意義まで包括的に推進するために最も適したタンパク質である。そこで本研究課題では、1) オートファジーによる p62 液滴分解の超微細構造、2) 翻訳後修飾による p62 液滴の細胞機能、3) p62 病態関連変異による p62 液滴の細胞内動態変化を検証し、p62 液滴の生理作用とその異常による個体の機能低下のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

p62 液滴はオートファジーにより分解されるが、オートファゴソームによる p62 液滴の認識、隔離機構はほぼ不明である。そこで p62 液滴に局在するオートファゴソーム形成タンパク質を蛍光顕微鏡により観察した。さらに、3次元で微細構造を構築できる電子線トモグラフィーを行い、オートファジー過程での p62 液滴を観察した。また、オートファゴソームによる p62 液滴認識の分子メカニズムならびに生理的意義を個体で明らかにするため、オートファゴソーム膜に局在する LC3/GABARAP ファミリーと結合するプローブを発現するマウスを作成した。

p62 による NRF2 活性化には p62 液滴形成に依存したリン酸化が必須であるが、その制御破綻は細胞障害を引き起こす。液滴は翻訳後修飾により質的に変化することが知られていることから、リン酸化模倣体もしくはリン酸化不能体を発現させ p62 顆粒の性質に変化を調べた。

また、p62 には多数の疾患関連点変異が報告されているが、p62 変異タンパク質と液滴形成、Nrf2 活性化、あるいはオートファジー分解との関連はほとんど不明である。そこで、疾患関連点変異が p62 液滴の質ならびに機能に与える影響を検証した。

4. 研究成果

(1) p62 液滴分解の微細構造ならびに基質選択的認識機構の解析

内在性に p62 液滴を有する肝がん細胞株や、酸化ストレスにより形成させた p62 液滴上のオートファジー関連タンパク質の局在やオートファゴソーム膜動態を電子顕微鏡などで観察した。その結果、p62 顆粒には複数のオートファジー関連タンパク質が集積、p62 顆粒近傍でオートファゴソームが形成されることを見出した (図 1)。p62 はオートファジーの選択的基質であると同時に、オートファゴソーム形成の足場となることが示唆された。

オートファジーによる基質選択的認識機構を調べた。オートファゴソーム膜上に局在する LC3/GABARAP と相互作用するプローブを発現させたところ、p62 が分解阻害により蓄積、液-液相分離により液滴を形成した。電子顕微鏡観察したところ、コントロールの細胞ではオートファゴソームが p62 液滴を選択的に取り囲んでいる像が観察されるのに対し、プローブを発現させた細胞では p62 液滴近傍で形成

されたオートファゴソームは観察されるが、p62液滴を囲い込んでいるオートファゴソームはほとんど確認されなかった。この結果は、LC3/GABARAPとの相互作用を介して分解基質の選択性が担保されていることを示唆する。

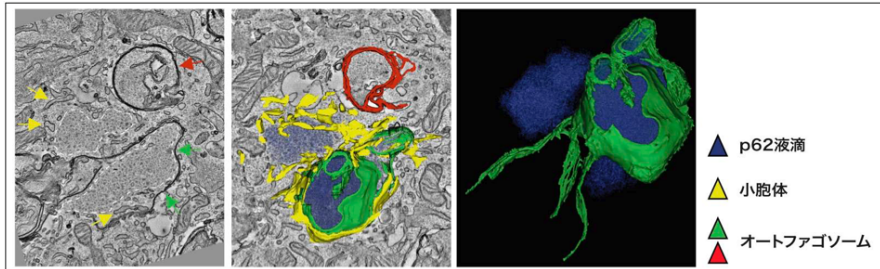


図1 p62顆粒(液滴)の三次元構造図
p62液滴の電子線トモグラフィー像(電子顕微鏡像(左,中央)と再構築した三次元構造図(中央,右))。p62液滴(青色)を取り囲むように多数のオートファゴソームが形成されている様子が観察される。

さらに、選択的オートファジーを特異的に阻害する人工プローブを発現するマウスを作成し、オートファジー必須因子欠損動物として比較して細胞障害が軽度であることを示した。これらの結果は、新たな選択的オートファジーの分子機構、生理作用を示しただけでなく、肝臓がんや神経変性疾患における p62 構造体の病態生理的意義を再考させるものである。

(2) 翻訳後修飾による p62 液滴の性質ならびに機能制御の解析

p62 は複数のセリン残基がリン酸化されること、リン酸化 p62 は NRF2 の分解を促す KEAP1 タンパク質やユビキチンと相互作用する。液滴はリン酸化などの翻訳後修飾や液滴構成タンパク質と相互作用する因子(タンパク質や核酸)により質的变化することが知られている。そこで、p62 のリン酸化が液滴の質的变化をもたらすかを検証した。KEAP1 との相互作用に関わる 349 番目のセリン残基をグルタミン酸に置換したリン酸化模倣体と KEAP1 と同時に細胞内に発現させると、p62 液滴の円形性が低下し球状の構造から不定形な形態へと変化した。この形態変化はリン酸化不能変異であるアラニン置換体では確認されなかったことから、p62 液滴の性質は、リン酸化により制御される p62 相互作用タンパク質 KEAP1 により規定されていることが明らかになった(図 2)。

次に光退色後蛍光回復や光退色後蛍光損失法を用いて p62 液滴に局在する KEAP1 の動態を調べたところ、リン酸化模倣体では KEAP1 が p62 と強く結合して p62 液滴へと封じ込められ、KEAP1 の細胞質への流出が抑制されることで不活化されていることが明らかになった。

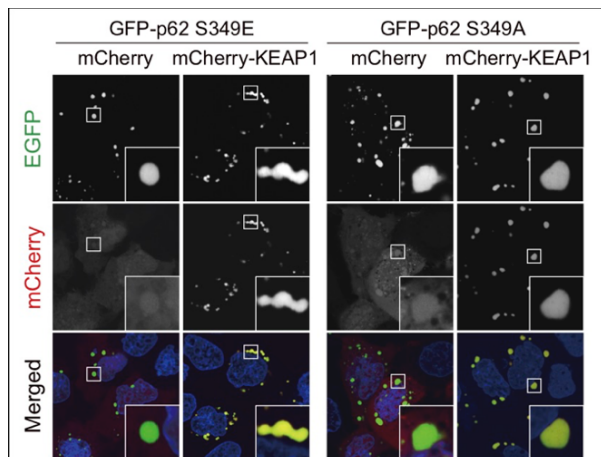


図2 p62のリン酸化模倣体と不能変異体の形態
KEAP1と同時に過剰発現させることにより、リン酸化模倣体(S349E)ではp62液滴が不定形を示すのに対し、リン酸化不能変異体(S349A)では球状の形態を示す。

(3) p62 病態関連変異による p62 液滴の細胞内動態変化の解析

筋萎縮性側索硬化症(ALS)、前頭側頭型認知症(FTD)、骨ペーজেット病(PDB)などの疾患の原因遺伝子の一つとして知られる p62 の疾患関連点変異が、オートファジーやストレス応答の障害、および p62 液滴の動態に与える影響を調べた。p62 タンパク質の主要な機能であるオートファジーならびに NRF2 活性化の機能発現に関連する領域である LIR および KIR に着目し、この領域に位置する 7 個の疾患関連変異に着目し解析した。p62 の疾患関連変異の一部は KEAP1、または LC3 との相互作用を欠失するため NRF2 活性化能の低下や p62 の分解遅延を示していた。しかし、p62 が関与する KEAP1-NRF2 経路、ないしはオートファジーの障害は一部の変異に限定されたものであり、疾患関連変異の共通要素ではなかった。一方、p62 変異体は液滴を形成する能力はあるが、液滴内部の流動性低下が全ての変異体で認められた。以上の結果は、p62 変異による病態発症の主因は、少なくともオートファジーや抗酸化ストレス応答の障害によるものではなく、むしろ他の ALS/FTD 疾患関連タンパク質と同様に、p62 液滴の質的变化に起因することを示している。

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 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Faruk Mohammad Omar, Ichimura Yoshinobu, Kageyama Shun, Komatsu-Hirota Satoko, El-Gowily Afnan H., Sou Yu-shin, Koike Masato, Noda Nobuo N., Komatsu Masaaki	4. 巻 297
2. 論文標題 Phase-separated protein droplets of amyotrophic lateral sclerosis-associated p62/SQSTM1 mutants show reduced inner fluidity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101405 ~ 101405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101405	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 Gemma Aragones, Kalavathi Dasuri, Opeoluwa Olukorede, Sarah G Francisco, Carol Renneburg, Caroline Kumsta, Malene Hansen, Shun Kageyama, Masaaki Komatsu, Sheldon Rowan, Jonathan Volkin, Michael Workman, Wenxin Yang, Paula Daza, Diego Ruano, Helena Dominguez-Martin, Jose Antonio Rodriguez-Navarro, Xue-Liang Du, et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 Autophagic receptor p62 protects against glycation derived toxicity and enhances viability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Cell	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) 10.1111/ace1.13257	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 Shun Kageyama, Sigurdur Runar Gudmundsson, Yu-Shin Sou, Yoshinobu Ichimura, Naoki Tamura, Saiko Kazuno, Takashi Ueno, Yoshiki Miura, Daisuke Noshiro, Manabu Abe, Tsunehiro Mizushima, Nobuaki Miura, Shujiro Okuda, Hozumi Motohashi, Jin-A Lee, Kenji Sakimura, Tomoyuki Ohe, Nobuo N Noda, et al.	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 -
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 Eskelinen Eeva-Liisa, Kageyama Shun, Komatsu Masaaki	4. 巻 8
2. 論文標題 p62/SQSTM1 droplets initiate autophagosome biogenesis and oxidative stress control	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 1890990 ~ 1890990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23723556.2021.1890990	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 蔭山 俊、Sigurdur Gudmundsson、曾 友深、一村 義信、田村 直輝、數野 彩子、上野 隆、三浦 芳樹、能代 大輔、阿部 学、水島 恒裕、三浦 信明、奥田 修二郎、本橋 ほづみ、Jin-A Lee、崎村 建司、大江 知之、野田 展生、和栗 聡、Eeva-Liisa Eskelinen、小松 雅明
2. 発表標題 p62顆粒はオートファゴソーム形成とストレス応答の足場として働く機能的液滴である
3. 学会等名 第73回 日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蔭山 俊、Sigurdur Gudmundsson、曾 友深、一村義信、田村直輝、數野彩子、上野 隆、三浦芳樹、能代大輔、阿部 学、水島恒裕、三浦信明、奥田修二郎、本橋ほづみ、Jin-A Lee、崎村建司、大江知之、野田展生、和栗 聡、Eeva-Liisa Eskelinen、小松雅明
2. 発表標題 選択的オートファジーの動態解析と生理的意義の解明
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 Shun Kageyama, Sigurdur Runar Gudmundsson, Yu-Shin Sou, Yoshinobu Ichimura, Naoki Tamura, Saiko Kazuno, Takashi Ueno, Yoshiki Miura, Daisuke Noshiro, Manabu Abe, Tsunehiro Mizushima, Nobuaki Miura, Shujiro Okuda, Hozumi Motohashi, Jin-A Lee, Kenji Sakimura, Tomoyuki Ohe, Nobuo N Noda, et al.
2. 発表標題 p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response
3. 学会等名 VIRTUAL KEYSTONE SYMPOSIA Autophagy: Mechanisms and Disease（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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

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			
フィンランド	University of Helsinki	University of Turku		
韓国	Hannam University			
スペイン	Universidad de Sevilla	Universidad de Sevilla	IRYCIS	