

令和 5 年 6 月 22 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：20K06644

研究課題名(和文) 選択的オートファジーレセプターp62のリン酸化制御機構とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Phosphorylation of phase-separated p62 bodies by ULK1 activates a redox-independent stress response

研究代表者

一村 義信 (Ichimura, Yoshinobu)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：80400993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：液-液相分離で形成されるp62顆粒は、349番目のセリン残基(Ser349)がリン酸化されたp62を含み、NRF2の活性化に関与している。しかし、リン酸化の制御機構や生理的意義は不明なままである。今回、ULK1をp62のキナーゼとして同定した。ULK1はp62顆粒に局在し、p62と直接相互作用していた。擬似リン酸化p62ノックインマウス(p62S351E/+)は、NRF2の恒常的活性化と成長遅延を示し、後者は過角化による食道や前胃の閉塞を起因とする栄養失調と脱水が引き起こされていた。以上の結果は、酸化還元依存しないNRF2活性化経路の生理的重要性と液-液相分離の新たな生理的役割を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は細胞のストレス応答機構や液-液相分離の生理的役割について新たな知見を与えるものである。p62顆粒は肝疾患、神経変性疾患の病変細胞や肝細胞がんの病変部位で過剰に蓄積することが知られており、これら病態においてレドックス非依存性ストレス応答が調整不全となっていることが強く疑われる。本研究で得られた知見をもとに、より詳細な解析を進めることで、p62顆粒が関与する病態発症機序の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：p62 bodies formed by liquid-liquid phase separation contain Ser349-phosphorylated p62, which participates in the redox-independent activation of NRF2. However, the regulatory mechanism and physiological significance of phosphorylation remain unclear. Herein, we identify ULK1 as a kinase responsible for phosphorylation of p62. ULK1 co-localizes with p62 bodies, and directly interacts with p62. p62S351E/+ mice are phosphomimetic knock-in mice in which Ser351 corresponding to human Ser349 is replaced by Glu. These mice, but not phosphodeficient p62S351A/S351A mice, exhibit NRF2 hyperactivation and growth retardation, the latter caused by malnutrition and dehydration due to obstruction of the esophagus and forestomach secondary to hyperkeratosis. Our results expand our understanding of the physiological importance of the redox-independent NRF2 activation pathway and provide new insight into the role of phase separation in this process.

研究分野：オートファジー

キーワード：選択的オートファジー p62 ULK1 リン酸化 p62-KEAP1-NRF2経路

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

選択的オートファジーレセプターの一つである p62 は、ユビキチン化タンパク質と結合することで液-液相分離し液滴を形成する。p62 液滴はクライアントタンパク質である KEAP1 と結合して生体防御機構の p62-KEAP1-NRF2 経路を活性化するとともに、自身のオートファジー分解を介して細胞のプロテオスタシスに貢献している。これらの p62 の機能には p62 の 439 番目のセリン残基のリン酸化が必要とされることが知られていた。しかし、そのリン酸化酵素や p62-KEAP1-NRF2 経路の生体内における意義については不明なままであった。

### 2. 研究の目的

細胞内に生じた p62 液滴は、p62-KEAP1-NRF2 経路の活性化、および p62 介在性選択的オートファジーを亢進させることで細胞の恒常性を維持している。しかしながら、そのキーファクターである p62 の責任キナーゼやその生理的役割は不明である。そこで本研究課題では、(1) p62 のリン酸化に関与するキナーゼを同定、(2) 同定したキナーゼの p62-KEAP1-NRF2 経路の活性化を介した生理的役割を検証、さらに、(3) p62-KEAP1-NRF2 経路の恒常的活性化が生体に与える影響を調べることを目的とした。

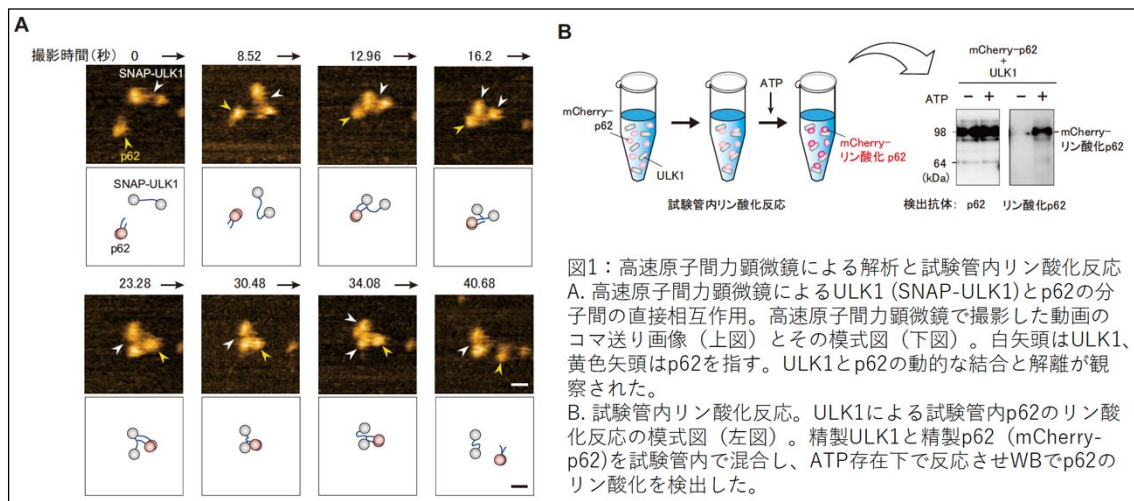
### 3. 研究の方法

高速原子間力顕微鏡を用いて p62 と ULK1 の相互作用を観察し、相互作用領域を特定する。免疫蛍光顕微鏡観察により、ULK1 の p62 液滴への局在とそれに依存した p62 と KEAP1 の結合を解析する。ULK1 の特異的阻害剤を用いて、p62 と KEAP1 の結合解析と p62-KEAP1-NRF2 経路への影響を調べる。さらに、光退色後蛍光回復(FRAP)や光退色後蛍光損失法(FLIP)を用いて p62 液滴と KEAP1 の動態を解析。p62 変異体ノックインマウスを作製し、p62-KEAP1-NRF2 経路の生体内での意義について検証する。

### 4. 研究成果

#### ULK1 は p62 と直接相互作用を介して p62 をリン酸化するキナーゼである

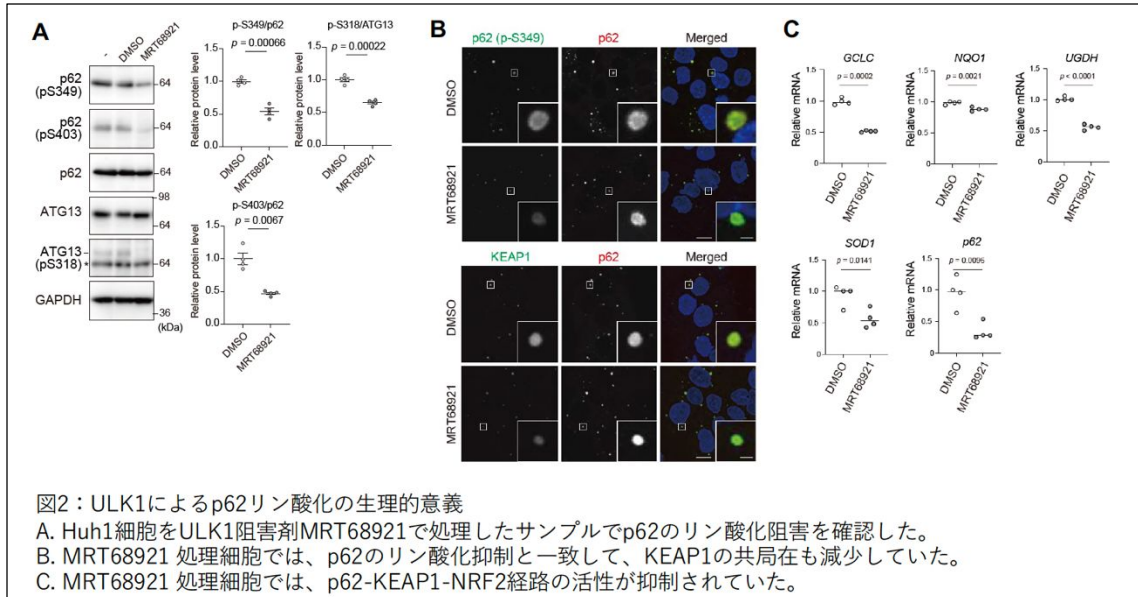
高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いて p62 と ULK1 の物理的相互作用を調べた (図 1A)。その結果、p62 と ULK1 は互いの IDR を介して相互作用を介していることが判明した。これと一致するように、インビトロキナーゼアッセイにより ULK1 が p62 の Ser349 を直接リン酸化すること



が明らかにされた (図 1B)。

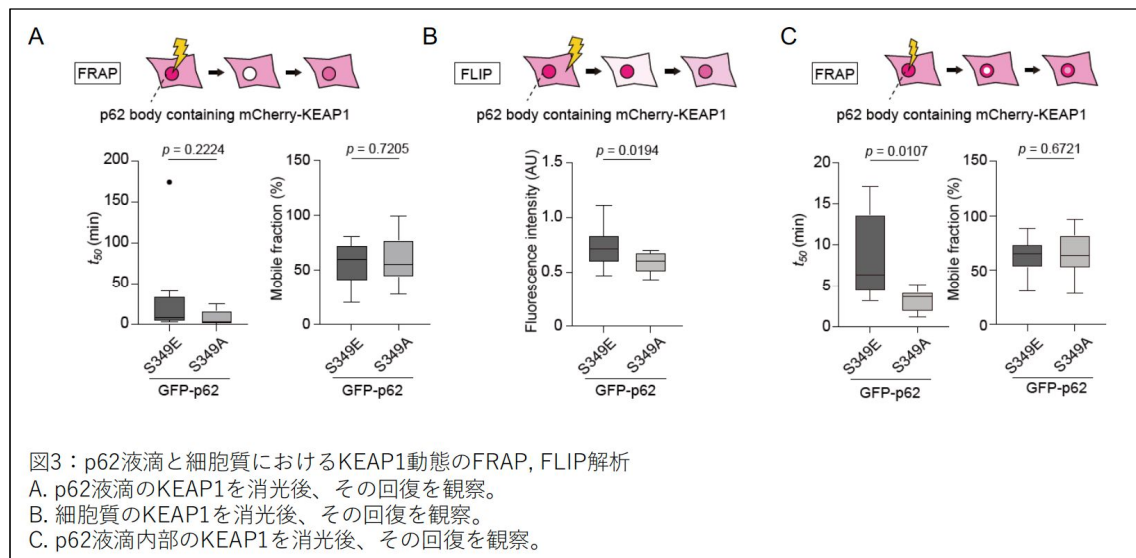
ULK1 は p62 液滴に局在し、p62 液滴内に KEAP1 を隔離する

ULK1 の特異的阻害剤 MRT68921 で処理した細胞では、p62 のリン酸化が抑制され、p62 液滴への KEAP1 の局在が減少、p62-KEAP1-NRF2 経路の活性化も低下していた (図 2)。



ULK1 による p62 液滴のリン酸化は KEAP1 を p62 液滴内に維持する

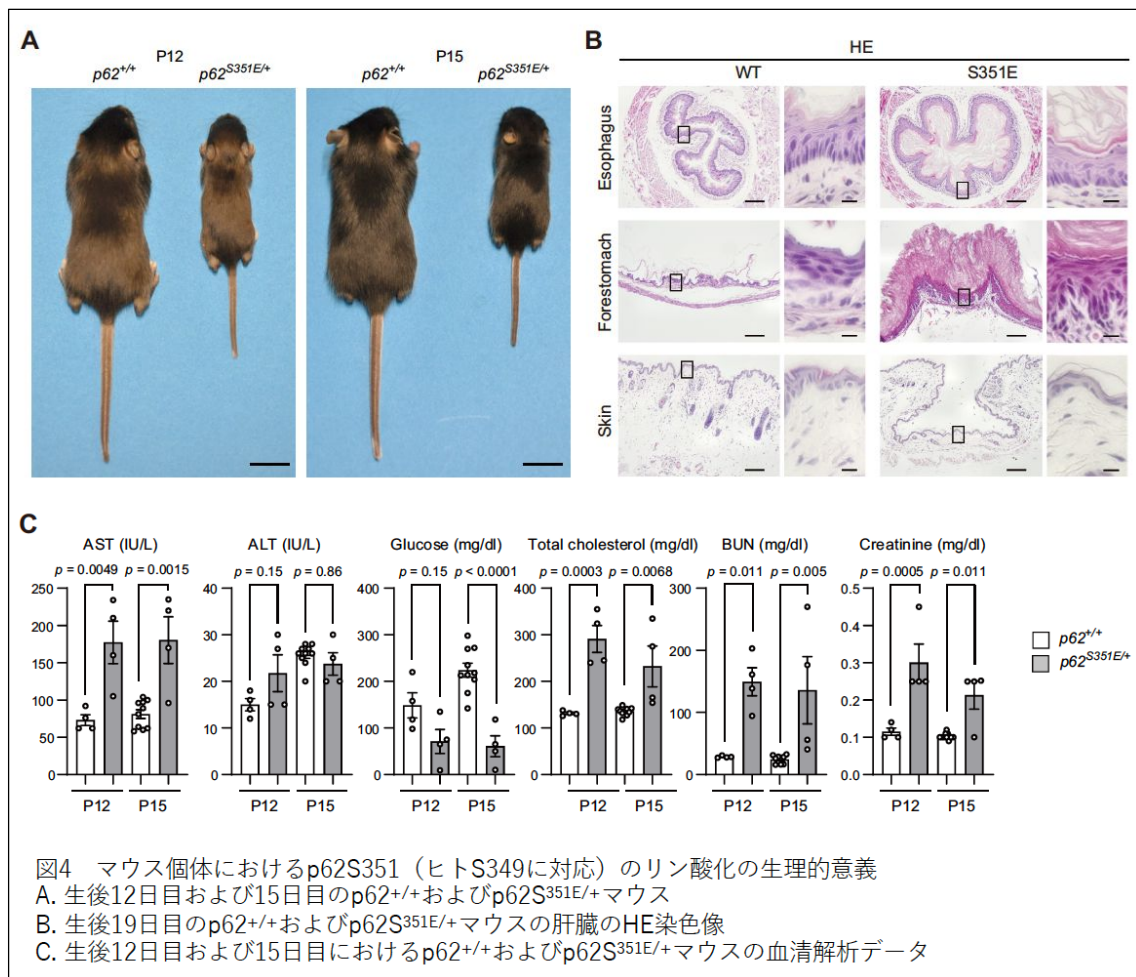
光退色後蛍光回復 (FRAP) および光退色後蛍光損失法 (FLIP) を用いた解析で、リン酸化不能 p62 変異体 (S349A) からなる p62 液滴では、KEAP1 が細胞質と p62 液滴との間で平衡状態にある一方、リン酸化模倣 p62 変異体 (S349E) からなる p62 液滴では KEAP1 は p62 液滴内部に流入できるものの p62 液滴からの流出が減少することが明らかとなった (図 3)。



ULK1 による p62 液滴のリン酸化の生理的意義

生体内における p62 の Ser349 リン酸化の生理的役割を明らかにするために、Ser351 (ヒト Ser349 に相当) を Glu ( $p62^{S351E/+}$  マウス) または Ala ( $p62^{S351A/+}$  マウス) に置換した p62 を発現するノックインマウスを作成した。p62S351E/+マウスは、P12 および P15 で重度の成長遅延と軽度の肝腫大を示した (図 4)。RNAseq、または定量 PCR を用いた遺伝子発現解析から  $p62^{S351E/+}$  マウスは、野生型マウスに比べ、NRF2 の活性化が認められた。HE 染色の結果、 $p62^{S351E/+}$  マウスの食道と前胃

は、野生型マウスに比べて角質層が著しく厚くなっていた(図4)。p62<sup>S351E/+</sup>マウスの血清データでは、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ値が有意に上昇し、低血糖と高コレステロール、血中尿素窒素とクレアチニンの増加は、栄養不良、および脱水症状を示していた(図4)。以上の結果は、p62<sup>S351E/+</sup>マウスが Keap1 欠損マウス(Wakabayashi et al, 2003)と同じフェノタイプであり、食道と前胃の過角化による栄養摂取障害が p62<sup>S351E/+</sup>マウスの表現型の主要因である可能性を示唆していた。これらのマウスとは対照的に、p62<sup>S351A/+</sup>や p62<sup>S351A/S351A</sup> マウスは正常であり、明らかな成長遅滞を示さなかった。



## 結論

本研究により、ULK1はp62液滴に局在化し、p62液滴をリン酸化することでKEAP1をp62液滴内に封じ込めることが明らかとなった。その結果として、p62液滴はKEAP1の酸化修飾がなくともNRF2を活性化するというこれまで全く知られていなかったストレス応答経路「レドックス非依存性ストレス応答」が見出された。マウス個体にp62の擬似リン酸化体を強制発現させた結果、過剰な生体防御反応のため食道や前胃上皮細胞の過角化を起し、その結果、栄養失調や脱水症状が引き起こされた。このことは、p62液滴のリン酸化を介したレドックス非依存性ストレス応答が生体内の恒常性維持に重要な役割を果たすことを示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ichimura Y, Komatsu M	4. 巻 1
2. 論文標題 Considering the mechanism by which droplets of ALS-FTD-associated SQSTM1/p62 mutants cause pathology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy Reports	6. 最初と最後の頁 9-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/27694127.2022.2031380	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 Faruk MO, Ichimura Y, Kageyama S, Komatsu-Hirota S, El-Gowily AH, Sou YS, Koike M, Noda NN, Komatsu M	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
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Faruk MO, Ichimura Y, Komatsu M	4. 巻 112
2. 論文標題 Selective autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3972-3978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15112.	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 -
1. 著者名 Briere LC, Walker MA, High FA, Rogers CA, Callahan C, Cooper C, Ishimura R, Ichimura Y, Caruso PA, Sharma N, Brokamp E, Koziura ME, Mohammad SS, Dale RC, Riley LG, Network UD, Phillips JA, Komatsu M, Sweetser DA.	4. 巻 mcs
2. 論文標題 A Description of Novel Variants and Review of Phenotypic Spectrum in UBA5-related Early Epileptic Encephalopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cold Spring Harb Mol Case Stud.	6. 最初と最後の頁 a005827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/mcs.a005827	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 Kageyama S, Gudmundsson SR, Sou YS, 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 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 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 Ikeda Ryo, Noshiro Daisuke, Morishita Hideaki, Takada Shuhei, Kageyama Shun, Fujioka Yuko, Funakoshi Tomoko, Komatsu Hirota Satoko, Arai Ritsuko, Ryzhii Elena, Abe Manabu, Koga Tomoaki, Motohashi Hozumi, Nakao Mitsuyoshi, Sakimura Kenji, Horii Arata, Waguri Satoshi, Ichimura Yoshinobu, Noda Nobuo N, Komatsu Masaaki	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Phosphorylation of phase separated p62 bodies by <sc>ULK1</sc> activates a redox independent stress response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 n/d
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022113349	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 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 池田良、一村義信、小松聡子、小松雅明
2. 発表標題 p62脱リン酸化酵素の同定
3. 学会等名 オートファジー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 良、一村義信、森下 英晃、能代 大輔、野田 展生、小松 雅明
2. 発表標題 ULK1キナーゼによるp62の液 - 液相分離制御
3. 学会等名 日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Ikeda, Yoshinobu Ichimura, Daisuke Noshiro, Hideaki Morishita, Shuhei Takada, Tomoko Funakoshi, Satoko Komatsu-Hirota, Shun Kageyama, Ritsuko Arai, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Arata Horii, Satoshi Waguri, Nobuo N Noda and Masaaki Komatsu
2. 発表標題 ULK1/2-mediated p62-phosphorylation at Ser349 is physiologically important for NRF2 activation
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>オートファジーフォーラム  <a href="https://proteolysis.jp/a_forum/threads/view/234">https://proteolysis.jp/a_forum/threads/view/234</a>          非膜型細胞小器官p62顆粒の機能を解明  <a href="https://prtimes.jp/main/html/rd/p/000000252.000021495.html">https://prtimes.jp/main/html/rd/p/000000252.000021495.html</a>          細胞のストレス応答の新しい仕組みを発見  <a href="https://www.juntendo.ac.jp/news/14334.html">https://www.juntendo.ac.jp/news/14334.html</a>          オートファジーフォーラム  <a href="https://proteolysis.jp/a_forum/threads/view/274">https://proteolysis.jp/a_forum/threads/view/274</a></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

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
---------	---------