

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07421

研究課題名(和文) オートファジーアダプター分子p62の細胞内局在制御とその異常がもたらす病態

研究課題名(英文) Regulation of the subcellular localization of p62 and its relation to the physiological role

研究代表者

蕨 栄治 (Warabi, Eiji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70396612

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)：p62は核-細胞質間を常時シャトリングしているタンパク質である。本研究は核-細胞質間シャトリングの仕組みと生理的意義を解明すること目的に、CRISPR/Cas9システムにより、核移行シグナル(NLS)、核外排出シグナル(NES)をそれぞれ欠失したp62遺伝子変異マウス(それぞれdNLS、dNESマウス)を作製し、dNESホモ接合体マウスは生後8週齢以内に全ての個体が死亡することを見出し、p62の核内限定的な局在が核内タンパク質品質管理の異常を引き起こし、ポドサイト障害を生じさせることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにp62は、オートファジーの選択的基質となることの発見を契機に、タンパク質分解系との関連を中心に盛んに研究が行われているが、細胞質-核間のシャトリングによる「細胞内の局在性と機能」に関する研究は全く無かった。近年、発がんや細胞内に異常タンパク質の凝集体形成を伴う神経系、肝臓の重大疾患に、オートファジー活性の低下によるp62発現量の変化が関与することや、その際に液-液相分離という物理的な現象が関連していることが続々と報告されているが、本研究で得られた成果は、それらに対し新たに細胞内の場の重要性を示唆する生物学的新知見をもたらした。

研究成果の概要(英文)：p62 is a protein that constantly shuttles between the nucleus and cytoplasm. To elucidate the mechanism and physiological significance of nuclear-cytoplasmic shuttling, I generated p62 mutant mice lacking the nuclear localization signal (NLS) and nuclear export signal (NES) by the CRISPR/Cas9 system (dNLS and dNES mice), and found that all dNES homozygous mice died within 8 weeks of birth, suggesting that the limited nuclear localization of p62 causes abnormal nuclear protein quality control, resulting in podocyte damage.

研究分野：分子生物学

キーワード：p62 オートファジー シャトリング

1. 研究開始当初の背景

p62(別名 Sqstm1, A170)はオートファジーに関与するタンパク質である。オートファジーは酵母からヒトにいたる真核生物に見られるタンパク質分解機構であり、細胞内での異常タンパク質の蓄積防止、栄養飢餓時におけるタンパク質のリサイクル、細胞質内に侵入した病原微生物の排除など、細胞を「浄化」することで恒常性の維持に関与している。近年、オートファジー研究の発展とともに、疾患との関連が次々と解析され、とくに、神経変性疾患、肝疾患などの異常タンパク質凝集体の形成を伴う疾患や各種のがんにおいて、その発症に重要な役割を果たすことが示されている。

p62はオートファジーにより選択的に分解を受けるアダプタータンパク質である。重要な点は、p62がユビキチン結合ドメインを持つことにより、ユビキチン化タンパク質がp62を介して選択的にオートファジーで分解されること(=選択的オートファジー)、また、種々の病態で観察される異常タンパク質凝集体の形成に必須な役割を果たしていることである。

p62は全身のあらゆる組織に発現するタンパク質であるが、正常細胞内においては主に細胞質に局在しているように染色される。しかし、核外排出トランスポーターであるエクスポーチン-1の特異的阻害剤処理下により、速やかに局在が核へと変化する。

このことは、正常細胞で観察されるp62は、あくまで見かけ上細胞質に局在しているように見えており、実質は核-細胞質間を、常時行き来(シャトリング)しているタンパク質であることを示している。ごく最近、口腔がんを対象にした研究で、p62の細胞内局在パターンの変化と予後とに相関があることを発表した(Clin. Exp. Dent. Res. 2019)が、同様な局在異常は前立腺がんでも報告されて(Pankivら J. Biol. Chem. 2010)いる。

2. 研究の目的

p62の細胞内局在と分子機能、疾患には重要な関係があることが強く示唆される。以上を踏まえ、「p62が核-細胞質間をシャトリングしていることの生理的な意義は何であろうか?」これを本研究の学術的な問とし、p62の核-細胞質間シャトリングの仕組みと生理的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9システムにより、核移行シグナル(NLS)、核外排出シグナル(NES)をそれぞれ欠失したp62遺伝子変異マウス(それぞれdNLS、dNESマウス)の作製を試みた。得られた変異マウスを交配し、各遺伝子型マウスの表現型を病理学的、生化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) dNLS2マウスの表現型

p62を細胞質のみに発現するdNLS2マウスはホモ接合体においても若齢時には異常はみられなかった。しかし、20週齢以降において体重の有意な増加を認め、肥満症を呈することが明らかになった。この表現型はp62ノックアウトマウスと類似しており、p62の正常な機能には核移行またはシャトリングが必要であることが示唆された。

(2) dNESマウスの表現型

dNESホモ接合体マウスは離乳直後より体重の増加が乏しく、生後8週齢以内に全ての個体が死亡した(図1)。解剖および血液生化学検査の結果、離乳直後より重度の腎機能障害が引き起こされていることが示され、これにより死に至っていることが予想された。

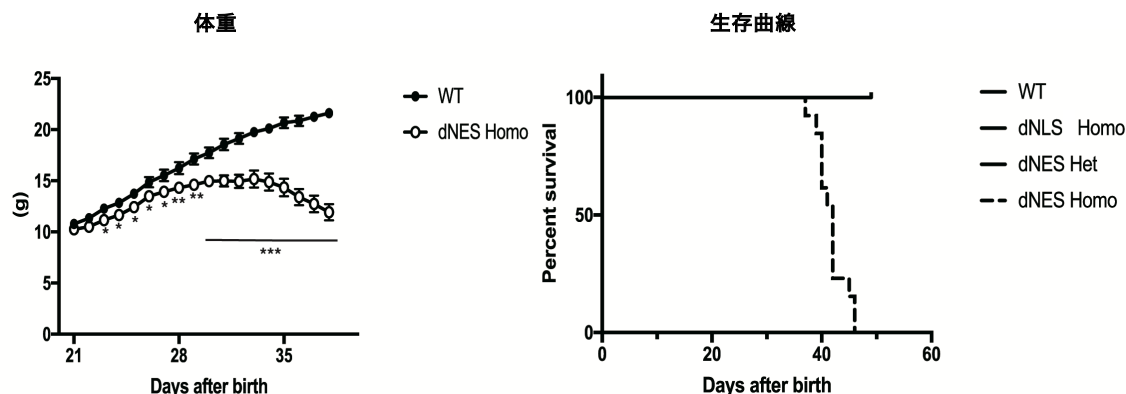


図1 変異マウスの体重増加曲線および生存率

腎機能について組織学的、生化学的な解析を加えたところ、病理所見では、遅くとも4週齢の時点でポドサイトの脱落、FSGS や半月体の形成を認め、ネフリンの発現量は著しく減少していた (図2、3)。

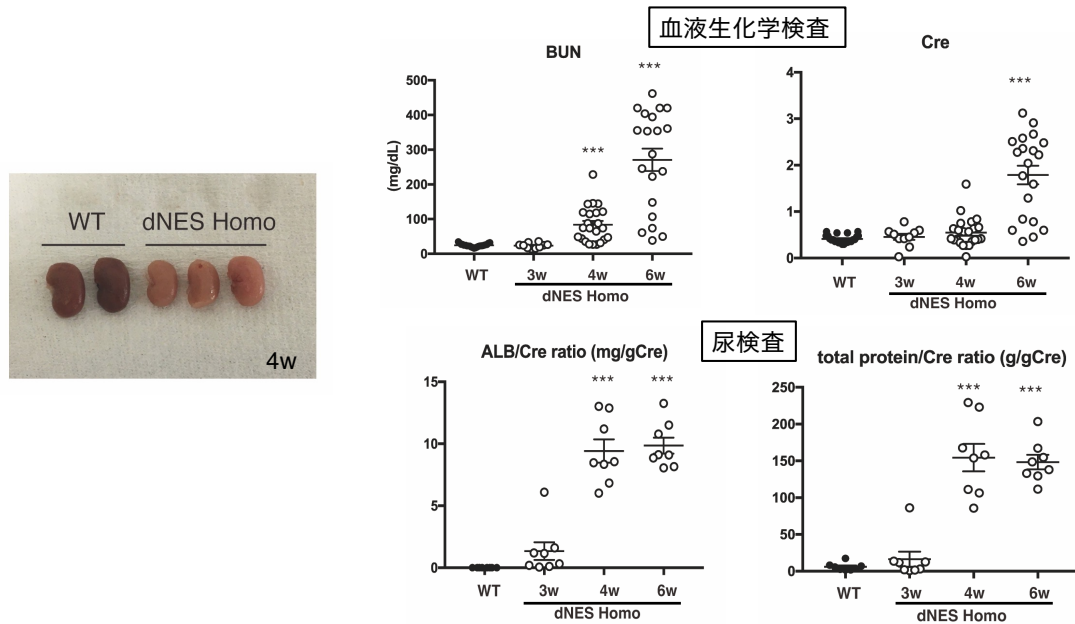


図2 腎臓の外観および血清、尿中における腎機能マーカー値

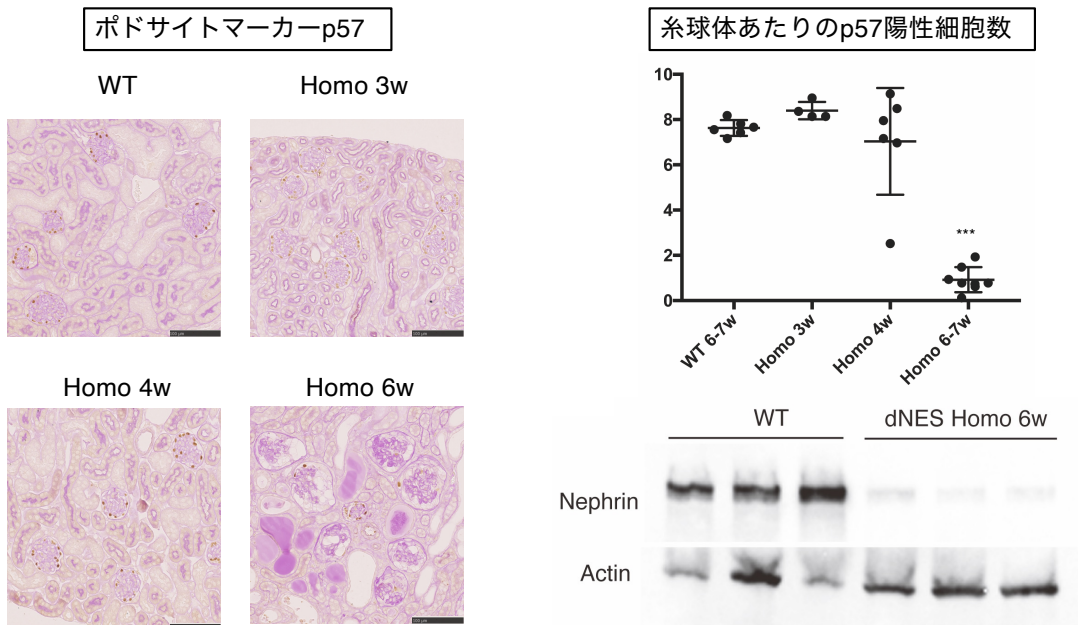


図3 dNES マウスにおけるポドサイトの脱落

また、ユビキチン化タンパク質を伴う p62 凝集体の核内形成が観察され、p62 およびユビキチン化タンパク質は不溶性の画分に蓄積していた (図4)。凝集体に含まれるタンパク質の同定を定量的な質量解析により解析した結果、dNES マウスの糸球体内にはポドサイト機能に関連したいくつかのタンパク質が顕著に減少、あるいは増加していた。発現増加したタンパク質は p62 凝集体と共局在し機能を失ったものが含まれることが予想される。

以上のことから、p62 の核内限定的な局在は、核内タンパク質品質管理の異常を引き起こし、ポドサイト障害を生じさせることが示唆された。

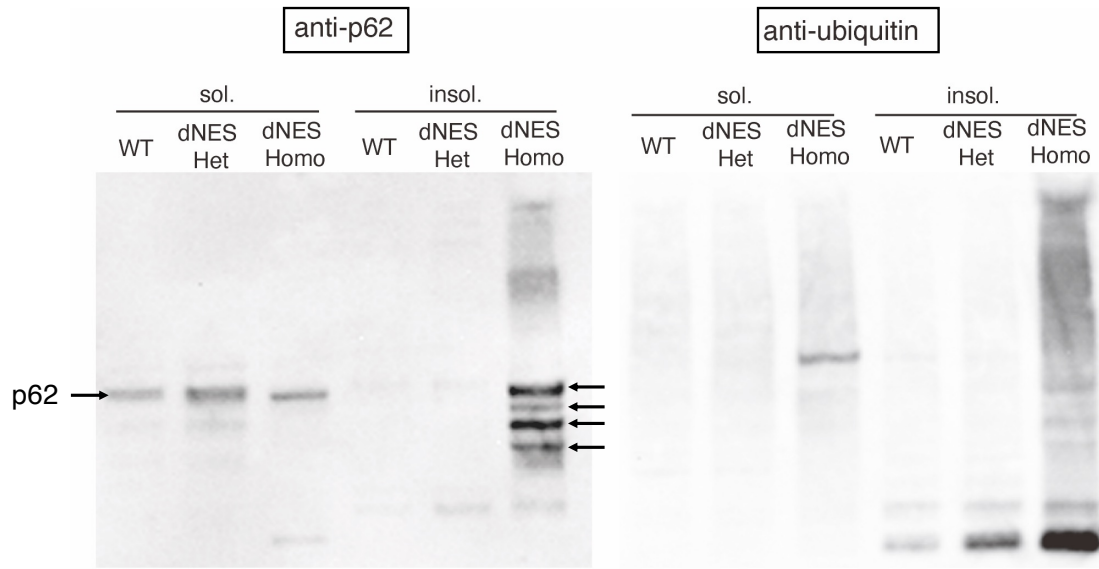


図4 p62 とユビキチン化タンパク質の不溶性分画への蓄積

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ning Baoshuo, Kawanishi Kunio, Kayama Emi, Tatsuno Rinna, Fuseya Sayaka, Morito Naoki, Usui Toshiaki, Yanagawa Toru, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Warabi Eiji
2. 発表標題 Physiological significance of nuclear-cytoplasmic shuttling of autophagy adaptor protein p62
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤栄治
2. 発表標題 オートファジー選択的基質p62/Sqstm1の細胞質 - 核間シャトリング異常はポドサイト障害を引き起こす
3. 学会等名 第6回ポドサイト研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------