

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500434

研究課題名(和文) p62タンパク質の発現を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of p62 gene expression

研究代表者

松本 弦(Matsumoto, Gen)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員研究員

研究者番号：50415303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：選択的オートファジーの主要因子であるp62/SQSTM1の遺伝子発現を促進または抑制する化合物のスクリーニングを行った。その結果、p62の発現を促進または抑制する化合物10種類を同定した。p62の発現を誘導するものが、タンパク質凝集を抑制できるかどうか調べたところ、2つの化合物がタンパク質凝集を抑制したが1つは逆に促進した。それぞれの化合物がどのようにしてp62の遺伝子発現を制御しているのかについて、今後検討していく。

研究成果の概要(英文)：p62/Sqstm1 is a key molecule for the selective autophagy. To investigate how to induce p62 in cells, we performed a drug screening that activated or inactivated p62 promoter. For this aim, we cloned human 1.8 kbp of p62 promoter region and inserted GFP gene under the predicted translation starting points. Using this reporter constructs, we identified five p62-inducer candidates. Two of them were obviously able to reduce polyglutamine aggregation in cells, but the S403-phosphorylated p62 were not accumulated. On the other hand, one of the five candidates enhanced the polyglutamine aggregate formation and the accumulation of S403-phospho-p62. This may be possible that the drug may interfere the constitutive autophagy. Our results suggests that p62 promoter can be modulated artificially and the appropriate induction of p62 may be beneficial to induce selective autophagy.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 選択的オートファジー

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患では、その病変神経細胞において、ユビキチン陽性のタンパク質凝集体の蓄積が病理学的所見として観察される。ユビキチン化タンパク質は、通常、ユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)や選択的マクロオートファジーシステムにより迅速に分解除去される。つまり、神経変性疾患の病変細胞では、ユビキチン化タンパク質の分解を促進させることで神経細胞死を遅らせることができる可能性があると考えられる。プロテアソームはポリユビキチン鎖が付加されたタンパク質を特異的に分解するが、凝集したタンパク質や安定なタンパク質複合体は分解することができない。プロテアソームで分解できない変性タンパク質はマクロオートファジーシステムにより分解されると考えられている。マクロオートファジーは、飢餓応答により誘導される「飢餓オートファジー」と、特定のタンパク質やオルガネラを選択的にオートファゴソームに取り込む「選択的オートファジー」の大きく分けて二種類の異なる分解様式があると最近では考えられるようになっており、p62 タンパク質はユビキチン化タンパク質の選択的オートファジーに必須の因子である。凝集性のタンパク質は、神経変性疾患における神経毒性を持つ分子種であると考えられているので、それら疾患の原因となる毒性分子が神経毒性を発揮する前に選択的オートファジーを活性化することができれば、多くの神経変性疾患に共通した治療戦略となりうる。

私はこれまでに p62 タンパク質は、リン酸化されることによりユビキチン化された変性タンパク質を選択的にオートファゴソームへ輸送することを明らかにし、ポリユビキチン鎖がついたプロテアソームで壊すことができないようなタンパク質でも、リン酸化された p62 に認識され、p62 タンパク質と共に選択的オートファジーにより分解される

ことを示した。プロテアソームが阻害されるなどにより、ポリユビキチン化タンパク質が細胞内に蓄積すると、p62 タンパク質の発現が転写レベルで誘導され、選択的オートファジーがプロテアソームによる分解を補完する。p62 のリン酸化反応は CK2 によって恒常的に起こっていることから、p62 の発現を誘導することにより、リン酸化 p62 を増加させれば、ポリユビキチン化タンパク質の選択的オートファジーによる分解を促進することが可能となると思われる。

神経変性疾患において、変性した凝集性の異常タンパク質が神経毒性の原因の一つであることは研究者に共通した見解であるので、その原因となる異常タンパク質を特異的に取り除くことは、有効な治療法がない多くの神経変性疾患の発症と進行を遅らせるための治療戦略として有効であると考えられる。凝集してしまったタンパク質はプロテアソームでは壊すことができないため、疾患の原因タンパク質の分解を薬剤などで促進するためには選択的オートファジーを誘導する必要があり、それは p62 の発現誘導により可能となると考えられる。

2. 研究の目的

選択的オートファジーを人為的に活性化させて異常タンパク質の分解を促進するという神経変性疾患の治療戦略のもと、本研究では、選択的オートファジーの主要タンパク質である p62 の遺伝子発現の制御機構を明らかにし、p62 の発現を誘導する低分子化合物を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

レポーターコンストラクトの作成
ヒト p62/SQSTM1 のプロモーター領域 1.8kbp を HeLa 細胞のゲノム DNA から PCR 法で増幅し、CMV プロモーターを切り出した GFP ベク

ターに組み込む。クローニングされたプロモーター領域の転写開始点の下流にある p62 の開始コドンに相当する部分から GFP の翻訳を開始できるようにする。このようにして作成したレポータープラスミド pp62PR-GFP をマウス神経系腫瘍細胞である Neuro2a 細胞に導入して安定発現株を樹立する。安定発現株のうち、バックグラウンドの GFP の蛍光が弱く、プロテアソーム阻害で蛍光強度が明らかに強くなる細胞株を取得する。

pp62PR-GFP 安定発現株を 96-well プレートにまいた翌日に 10 μ M の化合物を添加し、24 時間後の細胞あたりの蛍光強度をハイスループットセルイメージャー (ArrayScan) で定量化する。細胞に添加する化合物は Sigma 社の薬理的に活性な 1280 種類の低分子量化合物の薬剤ライブラリー (LOPAC1280 ; Library of pharmacologically active compounds 1280) を用いる。スクリーニングは独立に 3 回行い、p62 プロモーター活性が $\pm 3SD$ の範囲外の有意な差を示す化合物を第一候補とする。

第一候補を一つのプレートにまとめ、10 μ M、24 時間の処理で増加する GFP および内在性 p62 の量をドットプロットで定量する。明らかに細胞数が減少する毒性の強い化合物は除外し、ドットプロットにおいても有意な p62 の蓄積量の増減を示す化合物を第二次候補とする。

さらにウエスタンブロットにより、p62 の蓄積量の変化を経時的に測定し、有意な増減を示す化合物を最終候補とする。最終候補として同定された化合物のうち、作用機序のわかっているものの中で、共通する細胞内シグナル経路を推定していく。

4 . 研究成果

構築した Na2-pp62PR-GFP 細胞株に対して LOPAC1280 を用いたスクリーニングを行った。その結果 77 種類の化合物を 1 次候補として同定した。これら候補の中には、細胞毒性を持っているものが半数近く含まれていた。実際、MG132 などのプロテアソーム阻害剤や Cd などの重金属ストレスで p62 が誘導されることから、p62 の発現はストレス誘導性であることは以前から推測されていたが、それを支持する結果となった。

細胞毒性を示さない第二次候補として 30 種類の化合物を同定し、それぞれに対してウエスタンブロットにより p62 の蓄積量の変化を確認し、有意な増減を示す 10 種類の最終候補を同定した。

これら 10 種類の化合物のうち、p62 の発現量を増加させるもの 5 種類が、ポリグルタミンタンパク質の凝集の抑制効果を示すかどうかについて検討した。その結果、2 つの化合物が有意に凝集体形成を阻害したが、1 つは顕著に凝集体形成を促進した。p62 の発現を増加させる化合物間において共通の細胞内シグナル経路を *in silico* 解析したが、共通するものは見出すことはできなかった。このことは、p62 の発現制御がこれまでに知られている酸化ストレスによる誘導以外にも多数ある可能性を示唆している。

今後は同定した化合物により p62 による選択的オートファジーが亢進するのかどうか、また p62 の発現誘導は p62 自身の細胞内蓄積量が低下してきたときに起きていることから、p62 自身がオートレギュレーションしている可能性も見出している。今後

p62 の発現と選択的オートファジーの誘導
の関係について詳しく検討していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Matsumoto, G., Shimogori, T., Hattori, N., and Nukina, N. (2015) TBK1 controls autophagic engulfment of Parkin-recruited depolarized mitochondria through p62 phosphorylation. *Hum Mol Genet*, Ahead of Print, 査読有, DOI:10.1093/hmg/ddv179
 2. Kurosawa, M., Matsumoto, G., Kino, Y., Okuno, M., Kurosawa-Yamada, M., Washizu, C., Taniguchi, H., Nakaso, K., Yanagawa, T., Warabi, E., Shimogori, T., Sakurai, T., Hattori, N. and Nukina, N. (2015). Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. *Hum Mol Genet*, 24, 1092-1105. 査読有, DOI:10.1093/hmg/ddu522
 3. Shiba-Fukushima, K., Arano, T., Matsumoto, G., Inoshita, T., Yoshida, S., Ishihama, Y., Ryu, K.-Y., Nukina, N., Hattori, N., and Imai, Y. (2014) Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. *PLoS Genet* 10, e1004861. 査読有, DOI:10.1371/journal.pgen.1004861
 4. Kitamura, A., Inada, N., Kubota, H., Matsumoto, G., Kinjo, M., Morimoto, R.I., and Nagata, K. (2014). Dysregulation of the proteasome increases the toxicity of ALS-linked mutant SOD1. *Genes Cells* 19, 209-224. 査読有, DOI:10.1111/gtc.12125
 5. Yamanaka, T., Tosaki, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Koike, M., Uchiyama, Y., Maity, S.N., Shimogori, T., Hattori, N., and Nukina, N. (2014) NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization, *Nature Commun.* 5, 3354-68. 査読有,
- DOI:10.1038/ncomms4354
6. Bauar, P.O., Hudec, R., Goswami, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Mikoshiba, K. and Nukina, N. (2012) ROCK-phosphorylated vimentin modifies mutant huntingtin aggregation via sequestration of IRBIT, *Mol. Neurodegen.* 7, 43-55. 査読有, DOI:10.1186/1750-1326-7-43
 7. Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., and Nukina, N. (2011) Serine 403 phosphorylation of p62 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated protein. *Mol. Cell* 44, 279-289, 査読有, DOI:10.1016/j.molcel.2011.07.039
 8. 松本 弦, マイトファジーの認識機構—選択的オートファジーの一形態として, 医学のあゆみ(マイトファジー 基礎から疾患との関係まで; 企画 水島昇) 250 巻 6・7 合併号 (2014 年 8 月 9 日・16 日号 掲載)
 9. 松本 弦, 貫名信行 選択的オートファジーによるユビキチン化タンパク質の処理機構, 生体の科学 細胞の分子構造と機能—核以外の細胞小器官, 63 巻 5 号, p490-491, 2012 Sep-Oct
 10. 松本 弦, 貫名信行 p62 のリン酸化と選択的オートファジー, *BIO Clinica* 「神経筋疾患の分子標的治療開発」の各論, 2012 年 9 月号, 27 巻 10 号, p18-22
- 〔学会発表〕(計 5 件)
1. 第 37 回日本神経科学学会大会 Oral Session Parkinson's Disease and Related Disorders1; TBK1 controls PINK1/Parkin-dependent mitophagy through p62/SQSTM1 phosphorylation, 神奈川県横浜市, 2014 年 9 月 12 日
 2. 第 66 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム S6 ミトコンドリア研究の最新潮流:ミトコンドリアダイナミクスから合成生物学まで;p62/SQSTM1 リン酸化による PINK1/Parkin 依存性マイトファジーの制御機構, 奈良県奈良市, 2014 年 6 月 12 日
 3. 第 7 回オートファジー研究会 兼 新学術領域「オートファジー」第 1 回班会議;p62 のリン酸化による選択的オートファジーの分子機構, 静岡県掛川市 2013 年 12 月 20 日

4. シンポジウム：第 65 回 細胞生物学会
「プロテオスタシス:細胞内タンパク質
の恒常性」；p62 タンパク質のリン酸化
による選択的オートファジーの制御，
愛知県名古屋市 2013 年 6 月 20 日
5. The 2011 Cold Spring Harbor
Laboratory meeting on “ The Ubiquitin
Family ” ； Phosphorylation of
p62/SQSTM1 regulates selective
autophagic clearance of
ubiquitinated protein, Cold Spring
Harbor, NY, USA, May, 19th, 2011,

〔図書〕(計 1 件)

1. 松本 弦、貫名信行 著，p62 のリン酸
化とオートファジー，Annual Review
2013 神経，編集:鈴木則宏、祖父江元、
荒木信夫、宇川義一、川原信隆，29-36，
2013，中外医学社，東京

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
松本 弦、貫名信行；異常タンパク質の選択
的オートファジーによる分解はリン酸化 p62
により制御されている，新着論文レビュー
2011 年 11 月
[http://first.lifesciencedb.jp/archives/
3868#](http://first.lifesciencedb.jp/archives/3868#)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 弦 (MATSUMOTO, Gen)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・客
員研究員

研究者番号：50415303