

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790332

研究課題名(和文)オートファジー選択基質Nbr1の病態生理

研究課題名(英文)pathophysiological analysis of autophagic substrate Nbr1.

研究代表者

曾 友深(SOU, Yu-shin)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：60576221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、オートファジー選択的基質Nbr1に着目し、Nbr1の分子レベルの解析から、オートファジー不能マウスおよびNbr1遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの解析までを包括的に遂行した。作製した肝臓特異的Nbr1欠損マウスは特別な異常は認められなかった。また、Atg7欠損マウスとの掛け合わせで得られた肝特異的なAtg7;Nbr1二重欠損マウスの肝臓は、肝肥大と肝障害を発症するもの、その重篤度に関してはAtg7欠損マウスと大きく変わらなかった。現在、Atg7;p62;Nbr1三重欠損マウスを作製し、解析をすすめている。

研究成果の概要(英文)：To investigate a physiology of the Nbr1 metabolism, accumulation of Nbr1 and the effect to the liver, we created liver specific Atg7 and Nbr1-double deficient mice, and performed biochemical and morphological analysis. In liver specific Nbr1 knockout mice, the abnormality is not recognized. Simultaneous loss of Atg7 and Nbr1 in the liver cause hepatomegaly and liver dysfunction. It is shown that Loss of Nbr1 has few impacts on liver pathology in Atg7-deficient livers. Further analysis is needed to clarify the pathophysiological role of Nbr1 in Atg7-p62 double knockout tissues.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病体医科学

キーワード：オートファジー Nbr1

1. 研究開始当初の背景

近オートファジー-リソソーム経路は、真核生物に普遍的に存在する大規模な細胞内分解システムであり、栄養飢餓時のアミノ酸供給、タンパク質凝集体の分解、変性オルガネラの除去、または感染細菌の排除など細胞の恒常性を維持する上で重要な役割を担っている。オートファジーの過程は、ダイナミックな膜動態で構成されており、はじめ細胞質に出現した隔離膜が伸長しながら、オルガネラを含んだ細胞質成分を取り囲み、その両端が融合することでオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜構造体が形成される。形成されたオートファゴソームは速やかにリソソームと融合し、その内容物はリソソーム内の消化酵素により分解される。オートファジーは、特に栄養飢餓にตอบสนองして激しく誘導されることが知られている。これは、非選択的な分解を通じて生じるアミノ酸、脂肪酸、核酸を生体高分子の生合成やエネルギー源として再利用するためである。

近年のマウス遺伝学的手法を用いた研究から、栄養条件下でもオートファジーが恒常的に作動しており、それが特定のタンパク質の代謝に必要とされること、さらに変性オルガネラや侵入細菌を識別して選択的に取り除くメカニズムが明らかとなってきた。そして、このような選択的オートファジーの破綻こそが、肝臓がんや神経変性疾患などの重篤なヒト疾患に関連することが次第にわかってきた。

LC3 はオートファゴソーム膜に存在するタンパク質であり、オートファゴソームのマーカー蛋白としても広く利用されている。私の所属する研究グループでは、超高感度プロテオミクスおよび酵母ツーハイブリット法により、LC3 と結合する複数の分子を既に同定してきた。それらのうち、p62 および Nbr1 は、オートファジーで選択的かつ恒常的に代謝されるタンパク質である。p62 と Nbr1 は類似したドメイン構造を有しており、(Phox and Bem1) PB1 ドメインによるヘテロまたはホモオリゴマー化、LC3 相互作用領域 (LIR) による LC3 との結合、そしてユビキチン会合 (UBA) ドメインによるユビキチン鎖との相互作用が選択的オートファジーの分子基盤として機能し

ている。注目すべきことに、p62 や Nbr1 は、アルコール性肝炎や 1 アンチトリプシン欠損症などの肝疾患、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、肝細胞癌や神経芽腫などに認められるユビキチン陽性の封入体の主要構成成分として報告されている。

マウスのオートファジー欠損肝臓は、p62 と Nbr1 を過剰蓄積し、p62・Nbr1・ユビキチン陽性の凝集体を形成するとともに、肝肥大ならびに肝機能障害を呈する。また、ある種の肝細胞がん株では p62 の過剰蓄積とユビキチン陽性凝集体が検出されている。これらに見られるユビキチン陽性凝集体は、p62 を欠損することで完全に消失する。したがって、少なくとも p62 はオートファジー欠損や肝細胞がんで見られるユビキチン陽性凝集体の責任分子と考えられる。さらに私たちの最近の研究結果から、オートファジー欠損で蓄積した p62 はリン酸化を受けることで Keap1 と Nrf2 の結合を競合阻害し、転写因子 Nrf2 を活性化することが明らかにされた。驚くべきことに、オートファジー欠損肝臓で見られる肝機能障害は p62 の同時欠損だけでなく、Nrf2 の同時欠損でも改善される。つまり、以上の結果は、p62 の蓄積による Nrf2 の持続的活性化がオートファジー不全による肝機能障害の主因であることを示している。

2. 研究の目的

これまでにオートファジーによる p62 代謝の重要性が明らかになる一方、同じオートファジー基質 Nbr1 の病態生理だけでなく生理機能さえもほとんど解明されていない。本研究では、所属研究室において作製済みであるオートファジー不能マウス、p62 ノックアウトマウスおよび申請者が作製した Nbr1 ノックアウトマウスを中心に、オートファジーによる Nbr1 の代謝の分子機構およびその病態生理学的意義を解明することを目的とした。

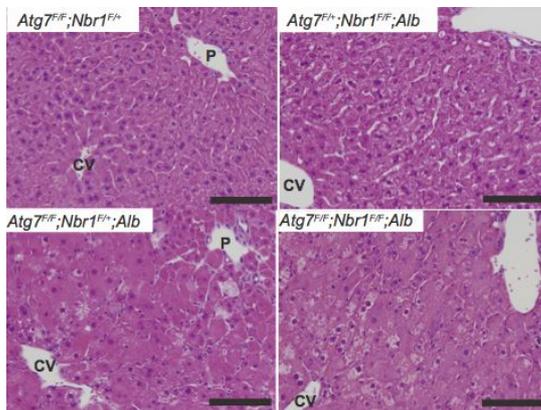
3. 研究の方法

本研究では、オートファジー選択的基質 Nbr1 に着目し、Nbr1 の分子レベルの解析から、オートファジー不能マウスおよび Nbr1 遺伝子改変マウスを用いた個体レベ

ルの解析までを包括的に遂行した。

4. 研究成果

オートファジーによる Nbr1 の代謝の意義を検討するため、作出済みであるオートファジー必須遺伝子である Atg7 を肝臓もしくは脳特異的に欠損したマウスを組織において、Nbr1 の動態を検討した。その結果、Atg7 を欠失させた肝臓もしくは脳においては、Nbr1 が蓄積・不溶化し、最終的にユビキチン-p62 陽性の封入体に局在することを確認した。つづいて、Nbr1 の病態生理学的意義の解明を目指し、組織特異的 Nbr1 欠損マウスを作製した。作製した肝特異的あるいは脳特異的に Nbr1 を欠損し



たマウスでは特別な異常は認められなかった。続いて、肝臓特異的 Atg7 欠損マウスと掛け合せ、肝臓特異的 Atg7;Nbr1 二重欠損マウスを解析した。Atg7;Nbr1 二重欠損マウスの肝臓は、肝肥大と肝障害(図 1,2)を発症するものの、その重篤度に関しては Atg7 欠損マウスと大きく変わらなかった。図 1 表記した遺伝型マウス肝臓の HE 染色像。肝細胞の肥大化および、白血球の浸潤が観察された。P:portal vein. CV:centeral vein. バー:50 μm

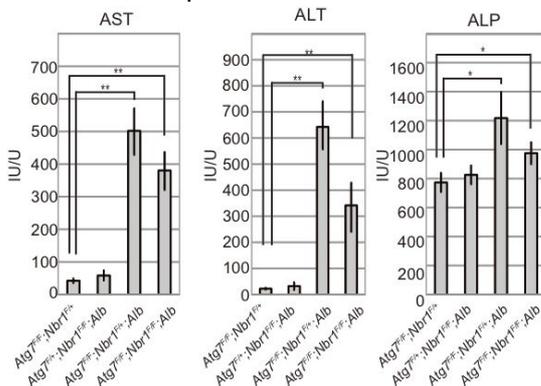


図 2 表記した遺伝型マウスの肝機能テスト。

さらに、Atg7;Nbr1 二重欠損肝臓を生化学的に解析した結果、Atg7 欠損マウスと同様に p62 の過剰蓄積とそれともなう Nrf2 の活性化が確認された(図 3)。その結果、Nrf2 の活性化を起因とする肝障害を生じていた。

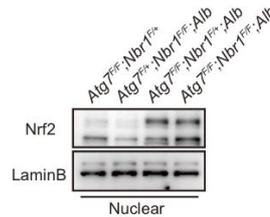


図 3 表記した遺伝型マウス肝臓における核内 Nrf2 の蓄積。

Atg7 欠損マウス肝臓で観察されるユビキチン-p62 陽性凝集体は、p62 との同時欠損肝臓では消失する。一方で、Nbr1 を同時欠損した Atg7;Nbr1 二重欠損マウス肝臓では、ユビキチン-p62 陽性の形成が確認された。つまり、Nbr1 はユビキチン陽性凝集体形成に関与しないことが明らかとなった(図 4)。

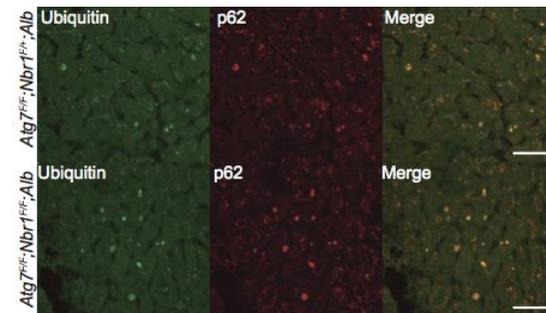


図 4 : Atg7 欠損および Atg7;Nbr1 二重欠損マウス肝臓におけるユビキチン-p62 陽性凝集体。バー:20 μm

これまでの解析結果は p62 の代謝不全がもたらす影響は甚大である事を示している。つまり、Nbr1 の病態生理学的意義を検証するためには p62 の蓄積による影響を除く必要がある。よって、現在 Atg7;p62;Nbr1 三重欠損マウスを作製している。Atg7;p62;Nbr1 三重欠損マウスの解析から、Nbr1 の病態生理学的意義が明らかになることが期待できる。

一方、我々は以前にオートファジーの減弱により異常蓄積した p62 がユビキチンリガーゼアダプタータンパク質 Keap1 を不活性化し、Keap1 のターゲットであるストレス応答性転写因子 Nrf2 を活性化することを報告した。今回、p62 の Keap1 結合領域に存在するセリンがリン酸化されると Keap1 との結合親和性が高まり、

Keap1-Nrf2 の結合を競合的に阻害し、Nrf2 を活性化させることを明らかにした。p62 のリン酸化は、凝集体の蓄積、変性ミトコンドリアの出現、細菌の侵入といった選択的オートファジーが誘導される条件下で起きていた。すなわち、オートファジーと Keap1-Nrf2 経路が連動していることを明らかにした。

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 3 件)

Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell*. 51.618-31.2014 (査読有り)

Maruyama Y, Sou YS, Kageyama S, Takahashi T, Ueno T, Tanaka K, Komatsu M, Ichimura Y. LC3B is indispensable for selective autophagy of p62 but not basal autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 446.309-15.2014(査読有り)

Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, Sou YS, Yabashi A, Yamada A, Annoh H, Kametaka S, Komatsu M, Waguri S. A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane. *Mol Cell Biol*.34.1695-706. 2014(査読有り)

[学会発表](計 2 件)

曾友深, 和栗 聡, 田中 啓二, 小松 雅明. オートファジー選択的基質 p62 および Nbr1 の病態生理的意義. 第 1 回 オートファジー班会議 (H25.12.20) ポスター発表

Yu-shin Sou, Satoshi Waguri, Keiji

Tanaka, and Masaaki Komatsu.

Phenotypic analysis of liver specific *Atg7* *Nbr1*-double knockout mice.

6th International symposium on Autophagy 2012(H24.10.28)

ポスター発表

6. 研究組織

(1)研究代表者

曾友深(Sou, Yu-shin)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体

分子先端研究分野・研究員

研究者番号：60576221