

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460400

研究課題名(和文)リン酸化p62とオートファジーが関与するシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Phosphorylation of p62/Sqstm1 activates Nrf2 during selective autophagy

研究代表者

一村 義信 (ICHIMURA, Yoshinobu)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80400993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間内に、p62/Sqstm1に存在するKeap1相互作用領域(KIR:Keap1-interacting region)のセリン残基がリン酸化を介して、p62/Sqstm1とKeap1の結合親和性が増強されること。その結果、Nrf2とKeap1の結合が競合阻害され、Nrf2の遊離、活性化が引き起こされることを見出した。さらに、p62-Keap1-Nrf2経路の活性化は、選択的オートファジーと連動して細胞保護に働くことを明らかにした。一方、p62-Keap1-Nrf2経路の活性化は、がん細胞の悪性化に関与していた。したがって、p62とKeap1の結合阻害は新規抗がん治療となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that Ser351 phosphorylation of p62 markedly increases p62's binding affinity for Keap1, an adaptor of the Cul3 based E3 ubiquitin ligase complex for Nrf2 degradation. Therefore, p62 phosphorylation induces expression of cytoprotective Nrf2 target genes. Importantly, persistent phosphorylation of p62 was observed in hepatic adenoma in autophagy-deficient livers and in several cases of human hepatocellular carcinoma (HCC). Knockout of p62 gene in an HCC cell line markedly abrogated the growth, whereas forced expression of a phosphorylation mimic p62, but not a phosphorylation defective mutant, resulted in recovery of the growth defect. These results indicated the involvement of persistent activation of Nrf2 through the phosphorylation of p62 in hepatoma development.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：選択的オートファジー p62/Sqstm1 Keap1-Nrf2システム リン酸化 がん

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーおよび Keap1-Nrf2 システムは代表的な生体防御機構であり、その調整不全は腫瘍形成をはじめとしたヒト疾患と関連する。p62 タンパク質はユビキチンシグナルを介して変性タンパク質凝集体や異常ミトコンドリア、侵入細菌に局在し、それら構造体とともにオートファジーにより代謝される選択的オートファジーのアダプターかつ基質である。オートファジー不全や過剰発現により p62 が細胞内に蓄積すると、Keap1 は p62 と結合し、Nrf2 を解離する。その結果、Nrf2 は安定化され核に移行し、一連の生体防御遺伝子群の発現が誘導される。一方、p62 の選択的オートファジーと Keap1-Nrf2 システムの関係はほとんど理解されておらず、p62 の蓄積を伴う疾患での病態生理的意義についても不明のままであった。

2. 研究の目的

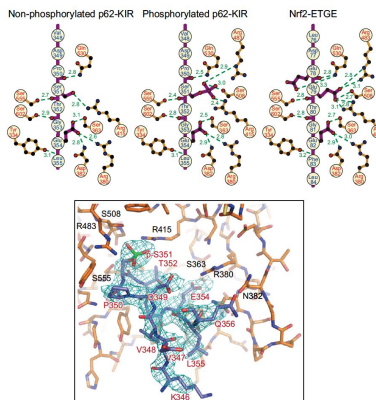
本研究では、Nrf2-Keap1 システムとオートファジーの相互関係、およびその病態生理的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

選択的オートファジー発動時の p62 の 351 番目のセリン残基(S351)のリン酸化、およびそれと連動した Nrf2 活性化機構を細胞生物学、生化学的手法を用いて解析した。また、p62 の S351 リン酸化と選択的オートファジーの連動機構を明らかにするため、リン酸化を受けない p62 変異体、あるいはリン酸化模倣体を利用した解析を進めた。作製済みのリン酸化 p62 を過剰蓄積するヒト肝細胞がん株の p62 欠失変異株に、野生型ないしは様々な p62 変異体を組み込み、p62 リン酸化の病態生理学的意義について調べた。さらに、リン酸化 p62 と Keap1 の結合化合物をスクリーニングにより取得、あるいは siRNA スクリーニング法を用いて p62 のリン酸化に関わる責任キナーゼの同定作業を進めた。

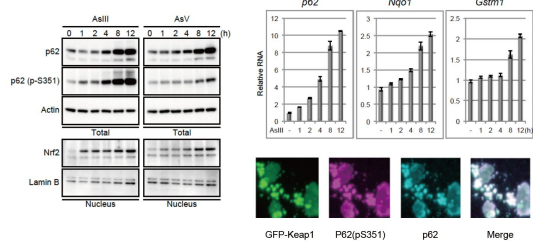
4. 研究成果

p62 の Keap1 結合領域に存在するセリン残基がリン酸化されると Keap1 との結合親和性が高まり、Keap1-Nrf2 の結合を競合阻害し、



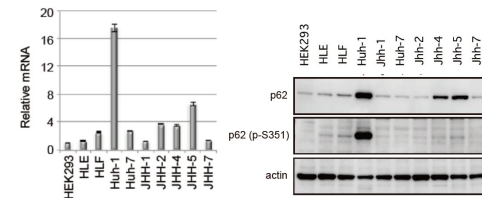
(図1) p62のKeap1相互作用領域に存在するセリン残基のリン酸化はKeap1との相互作用を高める

Nrf2 を遊離、活性化させる結果を生化学、構造学的解析から得た(図1)。p62 のリン酸化は、変性タンパク質凝集体の蓄積、異常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ることが見出された。すなわち、オートファジーと Keap1-Nrf2 経路は、リン酸化 p62 を介して連動していることが明らかとなった(図2)。

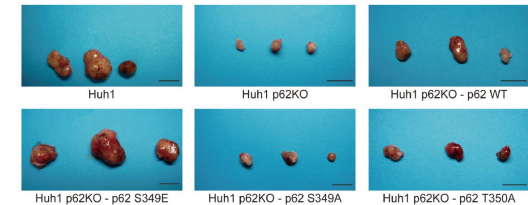


(図2) 細胞内に蓄積したリン酸化p62はKeap1と相互作用することでNrf2を活性化する

ある種のヒト肝細胞がん p62 の発現が亢進し、リン酸化を受けることで、Nrf2 が活性化されていることが見出された。この肝がん細胞株の p62 を欠損、ないしはリン酸化不能変異体 p62 を発現させると Nrf2 の活性化は低下し、がんの増殖亢進も抑制された(図3, 4)。

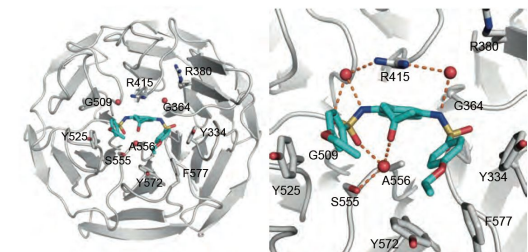


(図3) ある種のヒト肝細胞がんではリン酸化p62を蓄積することでNrf2の活性が上昇している。



(図4) 肝がん細胞株Huh1の増殖は、リン酸化p62を欠損させることで抑制された。

以上のように、リン酸化 p62 を蓄積したがんでは、Nrf2 が活性化されることで増殖亢進を生じていた。そこでリン酸化 p62 と Keap1 の結合阻害剤による処理は有効な抗がん治療になると考え、リン酸化 p62 と Keap1 との結合を阻害する化合物のスクリーニングを経てその候補化合物を同定した(図5)。



(図5) 新規に取得されたKeap1とリン酸化p62の結合阻害化合物は、Keap1のβプロペラの中心部分に結合する

現在、リン酸化 p62 の責任キナーゼについて、siRNA を用いたスクリーニングによる同定作業を進めている。今後、先に得られた p62 と Keap1 の結合阻害剤、または p62 の責任キナーゼの阻害剤を用いて、その抗がん効果を検証、新規な抗がん治療薬として適用できるよう改変誘導体の作成へと研究を進める予定である。

#### 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6件)

Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. FEBS J. 282: 4672-8. 2015 doi: 10.1111/febs.13540. 査読有

一村義信「選択的オートファジーと疾患」Thrombosis Medicine、vol. 4, 215-220. 2014 査読無

一村義信「オートファジーとがん治療」腫瘍内科、vol. 13, 810-816. 2014 査読無

Lystad AH, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. EMBO reports 15:557-565.2014 査読有 doi:10.1002/embr.201338003.

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. Biochemical and Biophysical Research Communications 446:309-315. 2014 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.093. 査読有

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. Molecular Cell 12:618-631. 2013 doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003. 査読有

[学会発表](計6件)

Joint Korea-Japan Symposium on Autophagy (A3)10.29.1015 Yonsei

University, Seoul, Korea Yoshinobu Ichimura, Masaaki Komatsu "Screening of a Responsible Kinase(s) for p62/SQSTM1, an Autophagy-specific Substrate" Yonsei Univ. Seoul, Korea.

KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology Autophagy (E6) June 19-24, 2015 · Beaver Run Resort · Breckenridge, Colorado, USA Yoshinobu Ichimura, Masaaki Komatsu "Phosphorylation of p62/Sqstm1 activates Nrf2 during selective autophagy"

新学術領域「オートファジーの集学的研究：分子基盤から疾患まで」第2回班会議・第8回オートファジー研究会 (ポスター発表) 一村義信、蔭山俊、和栗聡、水島恒裕、本橋ほづみ、山本雅之、小松雅明 “p62 のリン酸化を介した選択的オートファジーと Keap1-Nrf2 システムの連動” 2014.11.10-11.11 シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道札幌市)

新学術領域「オートファジーの集学的研究：分子基盤から疾患まで」第1回班会議 一村義信、曾友琛、蔭山俊、和栗聡、水島恒裕、本橋ほづみ、田中啓二、山本雅之、小松雅明 “オートファジーと Keap1-Nrf2 システムの連動” 2013.12.19-12.21 ヤマハリゾート「つま恋」(静岡県掛川市)

第5回 医学研国際シンポジウム Yoshinobu Ichimura, Yu-shin Sou, Shun Kageyama, Jun Hasegawa, Ryosuke Ishimura, Tetsuya Saito, Yinjie Yang, Tsuguka Kouno, Masaaki Komatsu “Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during

selective autophagy” 2013.7.10 東京  
都医学総合研究所（東京都世田谷区）  
第1回 がん代謝研究会 一村義信、  
和栗聡、本橋ほづみ、田中啓二、山本  
雅之、小松雅明 “オートファジーと  
Keap1-Nrf2 システムの接点：その異  
常と腫瘍増殖” 2013.10.30-11.1 慶  
應義塾大学先端生命科学研究所（山  
形県鶴岡市）

〔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 1件）

名称：Reagent for diagnosing tumor,  
pharmaceutical composition, and  
screening method  
発明者：Masaaki Komatsu , Yosinobu  
Ichimura  
権利者：公益財団法人東京都医学総合研究  
所  
種類：発明特許  
番号：13/910544  
取得年月日：2015年7月28日  
国内外の別：国外（米国）

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

一村 義信 (ICHIMURA, Yoshinobu)  
新潟大学医歯学系・准教授  
研究者番号：80400993

##### (2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

小松 雅明 (KOMATSU, Masaaki)  
新潟大学医歯学系・教授  
研究者番号：90356254