

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860224

研究課題名(和文) プロテアソームとオートファジーのクロストークとその破綻による凝集体形成機構の解明

研究課題名(英文) Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway

研究代表者

蔭山 俊 (KAGEYAMA, Shun)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30624225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン-プロテアソームシステムの破綻は凝集体の形成を引き起こす。これらの凝集体の分解機構、選択的オートファジーと生体防御機構であるKeap1-Nrf2システムとの運動の意義についてはマウス個体においては未だ解析されていない。肝実質細胞特異的にプロテアソーム機能を減弱させたマウスは、ユビキチンおよびp62陽性のタンパク質凝集体形成を伴った肝障害を呈し、これらの凝集体はオートファジーにより排除された。さらに、プロテアソーム変異マウス肝ではp62に依存したNrf2の活性化が生体防御に働いていた。以上の結果より、生体はタンパク質恒常性の破綻に応答し、複数の細胞防御機構を発揮することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitin-proteasome system and autophagy are crucially important for proteostasis in cells. These pathways are interdependent, and dysfunction in either pathway causes accumulation of ubiquitin-positive aggregates. To evaluate in vivo compensatory action against proteasomal dysfunction, we developed mice with reduced proteasome activity in their livers. The mutant mice exhibited severe liver damage, accompanied by formation of aggregates positive for ubiquitin and p62, an adaptor protein for both selective autophagy and the anti-oxidative Keap1-Nrf2 pathway. These aggregates were selectively entrapped by autophagosomes, and pathological features of mutant livers were exacerbated by simultaneous suppression of autophagy. Furthermore, defective proteasome function led to transcriptional activation of the Nrf2, which served as a physiological adaptation. Our in vivo data suggest that cells contain networks of cellular defense mechanisms against defective proteostasis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：オートファジー プロテアソーム ユビキチン 凝集体 Sqstm1/p62 Nrf2 Keap1

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内タンパク質恒常性維持の主幹をなす分解経路であるユビキチン-プロテアソームシステムとオートファジー・リソソームシステムの破綻は、ヒト神経変性疾患やがん病変部位に観察されるユビキチン陽性凝集体に酷似した構造体を形成する。細胞内で自己集合する p62 タンパク質が凝集体の責任因子であることが明らかになっているが、個体における凝集体形成の意義、その分解機構は未だ完全には解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、プロテアソームないしはオートファジー関連遺伝子改変マウスを駆使し、両分解系の破綻によるユビキチン陽性凝集体の形成と疾患発症との関連性を明らかにするため、(1) 個体における凝集体形成とその生理的意義、(2) 凝集体に蓄積するユビキチン鎖種の同定、(3) 個体での凝集体選択的オートファジーの有無、を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

肝臓特異的プロテアソーム減弱(*psmc1* 欠損)マウスとオートファジー欠損(*Atg7* 欠損)マウスを基軸に、凝集体形成責任因子 p62 の遺伝子欠損マウスや生体内解毒酵素群の転写因子である Nrf2 の遺伝子改変マウスとの多重欠損マウスを作成し、生化学・細胞生物学・組織学的解析を駆使した表現型解析を遂行した。具体的には、作成した遺伝子改変マウスのプロテアソーム活性、ユビキチン化タンパク質の動態、ならびにオートファジー活性を生化学および形態学的解析により調べた。また、界面活性剤不溶性画分を回収し、プロテアソームないしはオートファジー不全マウス肝で形成された凝集体に蓄積するユビキチン鎖種を Thermo Scientific 社の MS (Q Exactive) を用いて解析した。さらに、本研究課題により個体における凝集体形成の責任因子であることが明らかになった p62 を、生細胞内で内在性 p62 タンパク質の動態を評価できる p62-GFP ノックインマウスを作成した。なお、本研究における実験計画は、東京都医学総合研究所および新潟大学の承認を得て行った。

### 4. 研究成果

(1) 個体における凝集体形成とその生理的意義の解明

プロテアソームないしはオートファジー不全がユビキチン化タンパク質の動態ならびに凝集体の形成に与える影響を解析するため、*psmc1* 欠損マウス、*Atg7* 欠損マウス、および *psmc1;Atg7* 二重欠損マウスを作成し生化学および組織学的解析を行った。*psmc1* 欠損マウス肝ではプロテアソーム活性が低下しており、ユビキチン化タンパク質の蓄積ならびに肝障害が認められた(図 1)。免疫蛍

光染色で凝集体の形態を確認したところ、小さいドット状ならびに巨大な不定形のユビキチン陽性凝集体が確認され、これらは p62 と共局在した(図 2)。*Atg7* 欠損マウスでは既報の通り、ユビキチン陽性凝集体が形成されており p62 と共局在した。*psmc1* 欠損マウスで認められた不定形の凝集体は、*Atg7* を同時に欠損させることで、*Atg7* 欠損マウスと類似した小さい円形の凝集体へと形態が変化した(図 2)。*psmc1;Atg7* 二重欠損マウスでは、オートファジー選択的基質である p62 が著しく蓄積していたことから、ユビキチン陽性凝集体の形態変化は p62 の存在量に起因していると考えられた。

*psmc1* 欠損マウス肝では、Nrf2 の活性化に寄与する 351 番目のセリンがリン酸化された p62 が蓄積し、ユビキチン陽性凝集体へと集積していた(図 3)。実際に、*psmc1* 欠損マウス肝では Nrf2 が活性化しており、*psmc1* と *Nrf2* の二重欠損マウスでは肝障害が悪化した(図 4)。これらの結果は、プロテアソーム障害時には凝集体が形成され、集積したリン酸化 p62 に依存した Nrf2 の活性化が生体防衛に寄与していることを意味する。

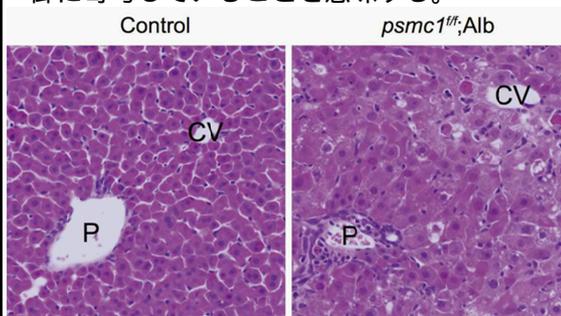


図 1. *psmc1* 欠損マウス肝では多数の空胞化した細胞やネクロシス、異常に分裂した細胞が認められる。

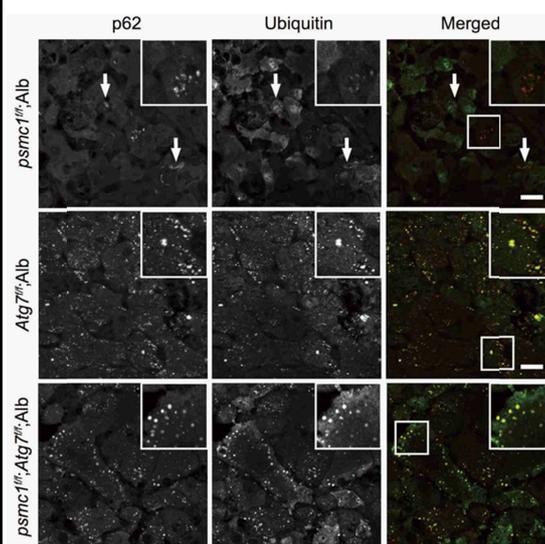


図 2. *psmc1* 欠損マウス肝ではユビキチン陽性凝集体は不定形の形態をしているが、*Atg7* の同時欠損により、小さい円形の形態へと変化した。

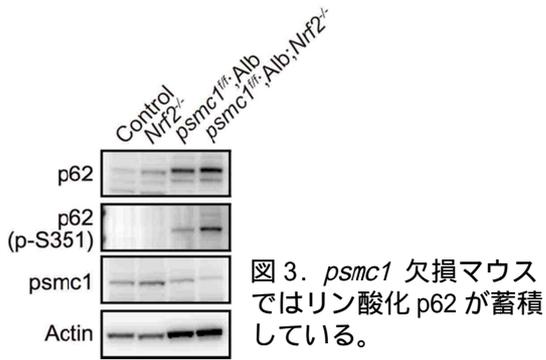


図 3. *psmc1* 欠損マウスではリン酸化 p62 が蓄積している。

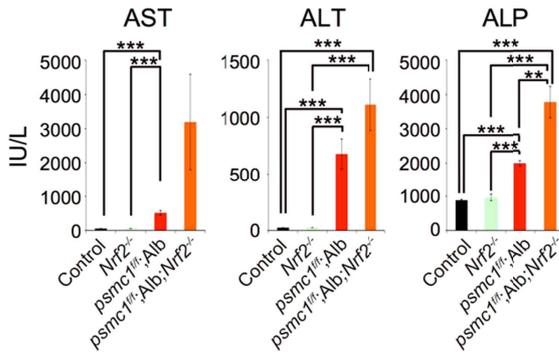


図 4. 表記した遺伝子型マウスの肝機能テスト。Nrf2を同時に欠損することにより、肝障害が著しく悪化した。

## (2) 凝集体に蓄積するユビキチン鎖種の同定

*psmc1* ないしは *Atg7* 欠損マウス肝で形成されるユビキチン陽性凝集体に蓄積するポリユビキチン鎖の鎖種を同定するため、マウス肝から界面活性剤不溶性画分を回収し、MS (Q Exactive) を用いてユビキチン鎖を同定した。*psmc1* ないしは *Atg7* 欠損のいずれにおいてもすべてのユビキチン鎖種で蓄積が認められ、*Atg7* 欠損では蓄積するユビキチン鎖種に大きな特異性は認められなかった(図 5)。

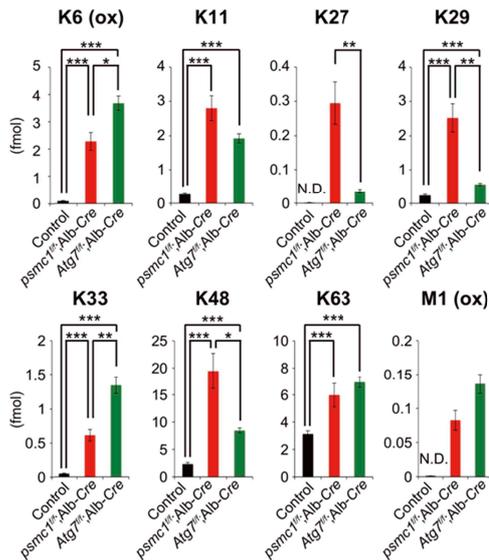


図 5. *psmc1* ないしは *Atg7* 欠損肝の界面活性

剤不溶性画分に蓄積するユビキチン鎖種の定量結果。

## (3) 個体での凝集体選択的オートファジーの有無

生体内で凝集体に対する選択的オートファジーの有無を調べるため、*psmc1* 欠損マウスにリソソーム阻害剤を投与し電子顕微鏡観察を行ったところ、内部に凝集体を含むオートファゴソームと見られる二重膜構造体を多数観察した(図 6)。オートファジー不全となる *Atg7* を同時に欠損することにより肝障害が悪化することから(図 7)、オートファジーはプロテアソーム減弱時に形成される凝集体を分解し、生体防御に寄与していることが示唆された。

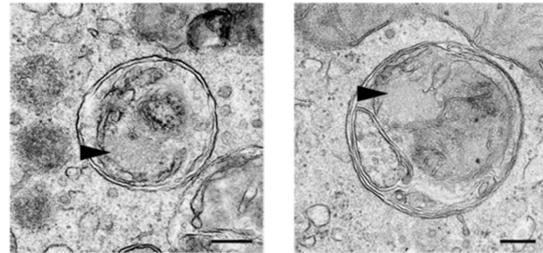


図 6. 内部に凝集体を含むオートファゴソームの電子顕微鏡写真。

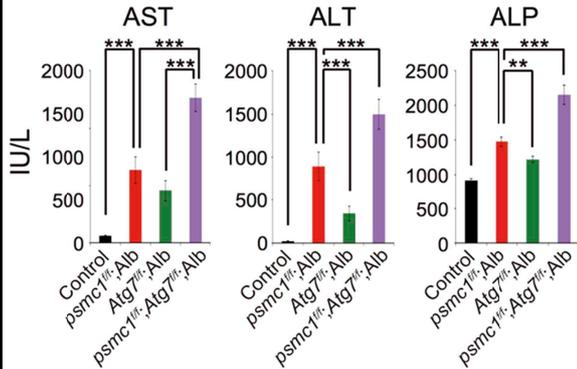


図 7. 表記した遺伝子型マウスの肝機能テスト。Atg7を同時に欠損することにより、肝障害が悪化した。

## (4) p62-GFP ノックインマウスの作成

凝集体の形成責任因子である p62 を生体内で内因性 p62 の動態を評価するため、p62 の C 末端側に GFP を融合した p62-GFP を発現するノックインマウスを作成した。このマウスは、*Atg7* を同時欠損することにより p62-GFP 陽性凝集体を形成し、*Atg7* 単独欠損マウスと同様の表現型を示した(図 8)。この結果は、本研究課題により作成した p62-GFP ノックインマウスが生細胞、個体における Sqstm1/p62 やオートファジー研究の強力なツールになることを意味している。

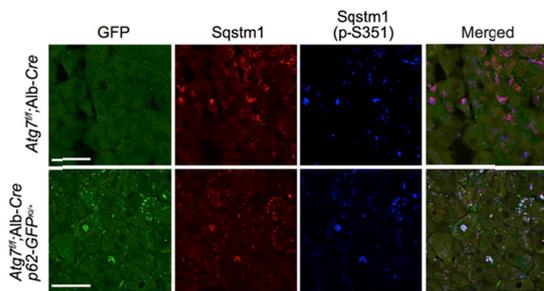


図 8. *Atg7* を同時に欠損することにより、p62-GFP は凝集体を形成し、リン酸化 p62 と共局在した。

#### 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 5 件)

Eino A, Kageyama S, Uemura T, Annoh H, Saito T, Narita I, Waguri S, Komatsu M. Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 during autophagy and under stress conditions in living cells. *Journal of cell science*, 査読有, 128, 2015, 4453-4461  
 Kuwahara S, Hosojima M, Kaneko R, Aoki H, Nakano D, Sasagawa T, Kabasawa H, Kaseda R, Yasukawa R, Ishikawa T, Suzuki A, Sato H, Kageyama S, Tanaka T, Kitamura N, Narita I, Komatsu M, Nishiyama A, Saito A. Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 査読有, 2015

Morimoto, D., Walinda, E., Fukada, H., Sou, YS., Kageyama, S, Hoshino, M., Fujii, T., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Iwai, K., Namba, K., Komatsu, M., Tanaka, K., Shirakawa, M. The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. *Nature Commun*, 査読有, 6: 6116, 2015

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*, 査読有, 15, 2014, 557-565

Kageyama, S, Sou, YS., Uemura, T., Kametaka, S., Saito, T., Ishimura, R., Kouno, T., Bedford, L., Mayer, RJ., Lee, MS., Yamamoto, M., Waguri, S., Tanaka,

K., Komatsu, M. Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway. *J Biol Chem*, 査読有, 289: 24944-24955 (2014)

##### [学会発表](計 6 件)

Kageyama S, Eino A, Uemura T, Waguri S and Komatsu M, Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 in living cells, Joint Japan-Korea Young Investigator Conference on Autophagy (A3), February 18, 2016, NIIGATA MEDICAL PROFESSIONALS DEVELOPMENT CENTER, NIIGATA UNIVERSITY, 757, Ichibancho, Asahimachidori, Chuo-ku, Niigata-shi, Niigata, JAPAN

蔭山 俊, 和栗 聡, 鐘ヶ江 裕美, 曾友深, 一村 義信, 斎藤 泉, 福田 光則, 小松 雅明, Alfy によるメンブレントラフィック制御, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会), 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際展示場 1 号館 1F, 兵庫県神戸市中央区港島中町 6 丁目 1 1-1

Eino A, Kageyama S, Uemura T, Annoh H, Narita I, Waguri S, Komatsu M. Sqstm1-GFP ノックインマウスを用いた Sqstm1/p62 の動態解析, 第 3 回新学術オートファジー」班会議「第 9 回オートファジー研究会」合同会議, 2015 年 11 月 16 日, 淡路夢舞台国際会議場, 兵庫県淡路市夢舞台 2 番地

Kageyama S, Sou Y, Uemura T, Kametaka S, Saito T, Ishimura R, Kouno T, Bedford L, R. John Mayer, Myung-Shik Lee, Yamamoto M, Waguri S, Tanaka K, and Komatsu M, Proteasome Dysfunction Activates Autophagy and the Keap1-Nrf2 Pathway, keystone Symposia Conference E6: Autophagy, June 21, 2015, Beaver Run Resort, Breckenridge, Colorado, USA

蔭山俊, 曾友深, 植村武文, 亀高諭, 斉藤哲也, 石村亮輔, 河野亜華, Lynn Bedford, R. John Mayer, Myung-Shik Lee, 山本 雅之, 和栗聡, 田中啓二, 小松雅明, プロテアソーム障害は選択的オートファジーと Keap1-Nrf2 システムを活性化する, 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜展示ホール, 2014 年 11 月 26 日, 神奈川県横浜市西区みなとみらい 1-1-1

蔭山俊, プロテアソーム障害は選択的オートファジーと Keap1-Nrf2 システムを活性化する, 第 8 回オートファジー研究会・第 2 回新学術「オートファジー」班会議, 2014 年 11 月 10 日, 北海道札幌市北区東茨戸 132

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc1/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

蔭山 俊 (SHUN KAGEYAMA)  
新潟大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：30624225

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：