

研究課題別評価書

1. 研究課題名

オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生

2. 氏名

小松 雅明

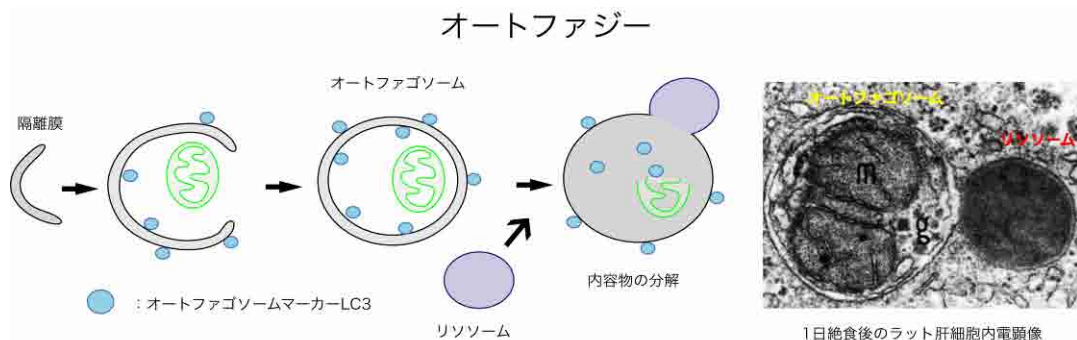
3. 研究のねらい

これまでオートファジーは、自己分解によるアミノ酸供給が主な役割であり、実際、栄養飢餓などで激しく誘導されることが知られていたが、マウス遺伝学を駆使した我々の動物オートファジーの発生工学的研究から、恒常的に起こっているオートファジー（恒常的オートファジー）が細胞の恒常性維持に不可欠であり、その破綻が様々なヒト疾病の発症原因となることが判明した。しかし、恒常的オートファジーの破綻による病態発症機構は不明であった。ごく最近我々は、そのプロセスにおいて中心的な役割を担っている分子として p62 の同定に成功した。本研究課題では、p62 の分子から個体レベルの研究を包括的に推進し、最初に恒常的オートファジーの機構解明を遂行し、次いで神経変性疾患や糖尿病発症に関与するタンパク質 p62 のモニター系の確立およびその代謝を制御する化合物の同定を行い、病態発症メカニズムおよび発症予防・治療方法の確立を目指す。

4. 研究成果

はじめに

細胞内には複数のタンパク質分解経路が存在し、それぞれが独立的に時には協調的に働くことにより、細胞の恒常性を維持・監視する役割を担うと考えられる。その一つである、オートファジー（self-eating: 自食作用）は一般に非選択的なタンパク質分解経路であると考えられてきた。栄養飢餓などの刺激により、細胞質の単膜構造体・隔離膜が伸長しオルガネラを含む細胞質成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体（オートファゴソーム）が形成される。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構成成分（タンパク質の場合、アミノ酸）にまで分解され、再利用される（下図）。



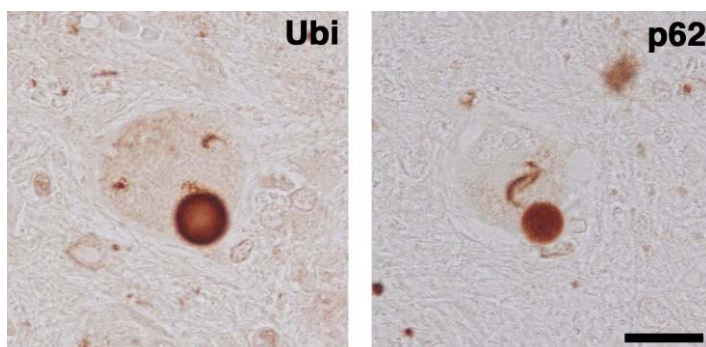
この分解系は、栄養飢餓により激しく誘導されることから、自己タンパク質分解によるアミノ酸供給を介した究極の生存戦略と考えられてきた。しかしながら、最近、高等動物においてオートファジーは飢餓時のみならず、十分に栄養が供給された状態でも恒常的に起こっていることが示唆されてきた。実際、我々が作製した様々な臓器特異的オートファジー欠損マウスの解析から、これらマウスは栄養飢餓に対するタンパク質分解阻害のみならず定常状態においてもユビキチン陽性封入体や異常オルガネラの蓄積を伴った肝障害、神経変性、糖尿病やミオパチーを引き起こすことが明らかになった (Komatsu et al. *J. Cell Biol.*, 2005, *Nature* 2006, *PNAS* 2007, Ebato et al., *Cell*

Metab., 2008, Masiero et al., *Cell Metab.*, 2009)。これらの一連の研究からオートファジーによる異常タンパク質除去機構(新しいタンパク質品質管理機構)が肝細胞、 β 膵細胞、骨格筋や神経細胞において極めて重要な役割を果たしていることが判明した。また、ユビキチン陽性封入体はヒト神経変性疾患や肝疾患で確認される特徴的構造体であることから、これら疾患発症とオートファジーの関連が注目された。しかしながら、どのようなメカニズムでユビキチン陽性封入体が形成されるのか?どのようにして病態発症に至るのか?は全く不明であった。

オートファジー選択的基質p62

我々は、オートファゴソームに局在しその後リソソームにて分解される分子 LC3 をベイトにプロトオーム解析を行った結果、LC3 と予想外のタンパク質 p62 との相互作用を確認した。p62 は、N 末端側の Phox and Bem1p (PB1)ドメイン、ジンクフィンガードメインなどを介して TRAF6 や Caspase-8 などの多彩な分子群と相互作用することから、スカフォールドタンパク質と考えられてきた。興味深いことに、p62 は C 末端に存在するユビキチン会合ドメイン(UBAドメイン)を介してユビキチン鎖と結合すること、さらに N 末端の PB1 ドメインは自己オリゴマー形成することが明らかにされている。LC3 は Atg 結合システム依存的にホスファチジルエタノールアミン(PE)にアミド結合され、オートファゴソームの内膜及び外膜に局在する。PE 化された LC3(LC3-II)は、隔離膜の伸張に必須と考えられている。オートファゴソーム形成に伴い、外膜に局在する LC3-II はシステインプロテアーゼ Atg4B により膜から切断され再利用される一方、内膜に局在する LC3 はオートファゴソームがリソソームと融合することによりオートファゴソームに取り囲まれた細胞質成分とともに分解される。実際、リソソーム酵素阻害剤を処理すると、LC3-II はリソソーム内に蓄積する。同様に、p62 もリソソーム酵素阻害剤やリソソーム内の酸性化を阻害する Bafilomycin A1 処理によりリソソーム内に蓄積する(プロテアソーム阻害剤処理によっては影響されない)。さらに、オートファジー欠損細胞や組織においても p62 の大量蓄積が確認されている。これらのことは、p62 は LC3 との相互作用を介してオートファジー—リソソーム系で分解されることを意味する。LC3 を含む *Atg* 遺伝子の多くは真核生物に広く保存されている一方、p62 は多細胞生物から出現している。このことは、p62 はオートファゴソーム形成に関与する分子というよりはむしろ、オートファジーの選択的基質と捉えることができる。実際、*p62* ノックアウトマウスにおいて正常なオートファゴソーム形成及びリソソームによるタンパク質分解が確認されている。

我々は、オートファジーによる p62 の代謝の意義を検討するため、肝臓もしくは脳特異的 *Atg7* 欠損マウスにおける p62 の動態を調べた。その結果、*Atg7* を欠失させた肝臓もしくは脳においては、p62 が蓄積、不溶化し、最終的に p62 陽性の封入体形成が確認された。興味深いことに、*Atg7* 欠損肝臓、脳において、ユビキチン化タンパク質と p62 は比例的に蓄積し、ほぼ全ての封入体がユビキチン・p62 陽性であった。重要なことに、ユビキチンだけでなく p62 をも含む封入体は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患やアルコール性肝炎、脂肪肝、肝癌患者組織において同定されている(下図)。



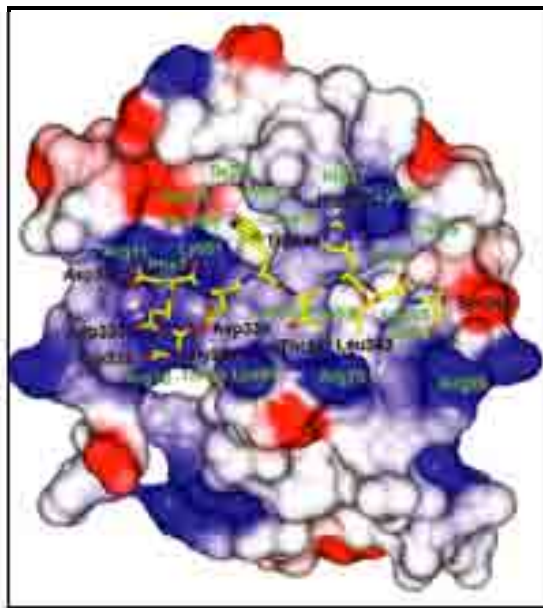
筋萎縮性側索硬化症患者組織におけるユビキチン-p62 陽性封入体。茶色に染まっている構造体が神経細胞内に蓄積しているユビキチン-p62 陽性封入体。

さらに、封入体形成における p62 の役割を検討するために、*Atg7/p62* ダブルノックアウトマウスを作製した結果、驚いたことに、オートファジー不全により出現する封入体は、p62 の同時欠失によってユビキチン化タンパク質の蓄積に関わらずほぼ完全に消失した(Komatsu et al., *Cell* 2007)。この *p62* 欠失による封入体形成の抑制は、オートファジー欠損肝臓、脳ともに確認されることから、

組織普遍的な現象と思われた。これらのことは、ヒト神経変性疾患や肝疾患で観察される封入体形成がオートファジーの減弱に起因しうること、そして p62 が封入体形成の責任分子であることを強く示唆している。

オートファジーによるp62 認識分子機構

上述の通りオートファジーを介した p62 の選択的分解経路が存在することは明白であるが、その分子メカニズムは不明なままだった。ごく最近、我々はマウス p62 分子内の 11 アミノ酸 (Ser334-Ser344) が LC3 によって認識される配列 (LC3-recognition sequence; LRS) であることを見出した。LRS は種間で高度に保存された酸性アミノ酸クラスター及び疎水性アミノ酸 (DDDWXXL) を有していた。さらに、LRS と LC3 の共結晶構造解析から、(1) LRS 内 Trp-340 及び Leu-343 と LC3 のユビキチンフォールド内の二つの疎水性ポケットとの相互作用、(2) LRS 内酸性クラスターと LC3 分子表面の塩基性アミノ酸との相互作用が明らかになった (Ichimura et al., *J. Biol. Chem.*, 2008)。In vivo の解析から、LC3 との相互作用能を欠失した変異 p62 は、オートファジーによる分解を逃れ PB1 ドメイン依存的にユビキチン化タンパク質を含んだ封入体を形成することが判明した。すなわち LC3 を介した p62 の分解阻害のみで、封入体形成が十分であることを意味する。さらに、PB1 ドメインを介した p62 のオリゴマー形成は、オートファジーを介した p62 の効率的な分解に重要であった。興味深いことに、Cvt 経路 (出芽酵母におけるオートファジーと分子機構をシェアする恒常的なアミノペプチダーゼ I 及び α -マンノシダーゼの液胞輸送経路) における選択的なアミノペプチダーゼ I の取込み機構には、アミノペプチダーゼ I 受容体として働く Atg19 と LC3 ホモログである Atg8 との結合が必須であるが、Atg19 の C 末端 10 アミノ酸からなる Atg8 結合領域は LRS 様配列 (WXXL) を含んでいる。さらに、Atg19 の LRS 様配列と Atg8 との共結晶構造解析が行なわれ、この結合様式が p62-LC3 結合様式と同様であることが明らかにされた。従って、WXXL 配列はオートファゴソーム膜に選択的に取り込まれるための普遍的な目印と考えられるのかもしれない。

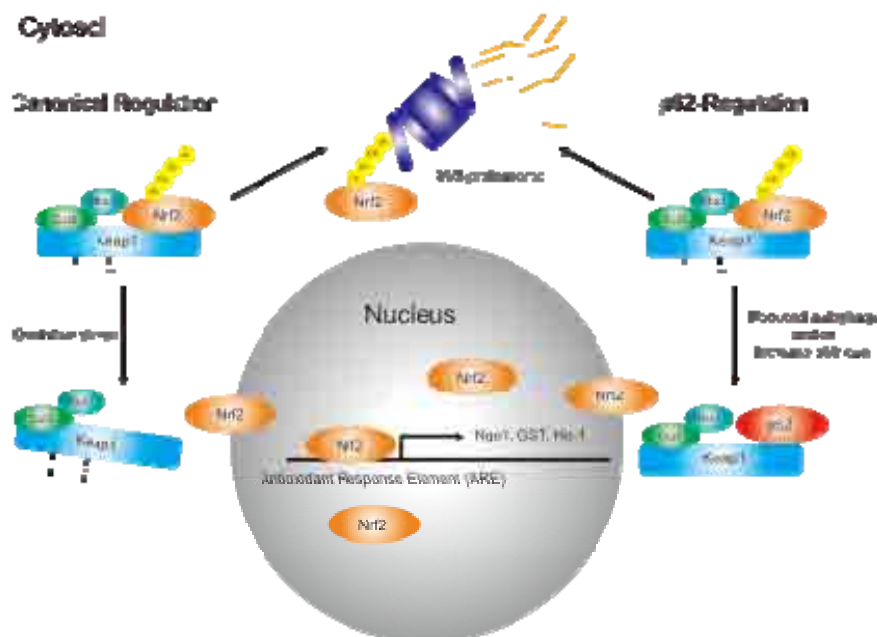


p62-LRS (LC3 recognition sequence)と LC3 結合体の構造。LC3 の分子表面 (表面電荷の塩基性は青、酸性は赤) と LRS ペプチドを黄色のスティックモデルで表している。LRS と相互作用している LC3 のアミノ酸残基は緑で記してある。

p62 の代謝異常による病態発症機序

オートファジーの減弱に起因する病態発症機序は複雑である。オートファジー不能マウスにおける p62 の同時欠損は肝障害を抑制するが、神経変性は抑制しない (Komatsu et al., *Cell* 2007)。このことは、オートファジーの破綻により発症する肝障害は p62 の異常蓄積に起因する一方、神経では異なった病態発症機序があることを意味する。神経においては神経細胞の軸索終末におけるオートファジーを介したオルガネラ代謝が極めて重要であり、その破綻が軸索変性を伴った

神経変性を引き起こすことを示唆する結果を得た (Komatsu et al., *PNAS*, 2007)。一方、肝臓におけるオートファジー減弱 (p62 蓄積) と病態発症機序においては、不透明のままだった。我々は、肝特異的 *Atg7* および *Atg7/p62* 欠損肝臓を用いたトランスクリプトームとプロテオーム解析に p62 タンパク質のインタラクトーム解析を併せることにより、p62 による新たなストレス応答転写制御機構を見出した。一連のストレス応答タンパク質群の遺伝子発現は転写因子 Nrf2 により正に制御されるが、我々は p62 が Nrf2 のユビキチンリガーゼである Keap1 と直接相互作用することを見出した。さらに、生化学的および構造学的解析から、p62 が結合する Keap1 の領域は、Nrf2 が結合する Keap1 の領域と全く同一であることを明らかにした。これらのことから、「p62 が Keap1-Nrf2 の結合を競合的に阻害し、その結果として Nrf2 の活性化とそれに引き続く抗酸化タンパク質群や解毒酵素群の遺伝子発現を上昇させる」という新しい転写制御機構があることが判明した (下図、Komatsu et al., *Nature Cell Biology*, in press)。さらに、このストレス応答転写制御機構がオートファジー欠損肝臓において異常亢進しており、その結果として肝障害を引き起こすことを明らかにした。



5. 自己評価

概ね達成できている。特に、非選択的タンパク質分解系であると信じられていたオートファジーにおいて、選択的分解機構の存在を示した論文の評価は高いと考えられる。オートファジー選択的基質 p62 に関しては、分子から個体レベルの研究を包括的に行なっており、オートファジーを介した p62 の代謝分子メカニズムやその生理的意義を明らかにしつつある。また、我々が発見した恒常的オートファジーの各臓器や各細胞での役割が、我々が作製した条件付きオートファジー欠損マウスをベースに明らかにされている。但し、研究目的に掲げた p62 のモニター系の確立およびその代謝を制御する化合物の同定は、今後の課題と考えられる。

6. 研究総括の見解

オートファジーにおいて重要な役割を演じる分子 LC3 として p62 タンパク質を同定し、この分子がオートファジー選択的な基質となることを明らかにし、また LC3 による p62 認識の分子機構も結晶解析により解明した。さらに、p62 の蓄積は、Keap1 と転写因子 Nrf2 との相互作用を阻害することを明らかにし、その結果として肝障害等を引き起こすことを示した。このように、研究は極めて順調に進行し、予想外の新しい発見をするにいたっている。数多くの国際会議での招待講演から明

らかなように、国際的にも高く評価されている。新しい創薬の切り口となる研究としても今後の更なる発展が期待できる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.s., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J.I., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E. and *Tanaka, K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131:1149–63 (2007)
2. Komatsu, M., Wang, Q.J., Holstein, G.R., Friedrich, Jr V.L., Iwata, J.I., Kominami, E., Chait, B.T., Tanaka, K., and *Yue, Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:14489–94 (2007)
3. Ichimura, Y., Kumanomido, T., Sou, Y.s., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and *Komatsu, M. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem.*, 283, 22847–57 (2008)
4. Sou, Y.S., Waguri, S., Iwata, J.I., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and *Komatsu M. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol. Biol. Cell*, 19, 4762–4775 (2008)
5. *Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-s., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S.I., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., *Tanaka, K. and *Yamamoto, M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through Keap1-inactivation. *Nature Cell Biology*, In press

②受賞

1. 平成 18 年度日本生化学会奨励賞 (2006 年 10 月 27 日)
2. 第 7 回日本分子生物学会三菱化学奨励賞 (2009 年 12 月 11 日)

③招待講演

1. Masaaki Komatsu: Selective Autophagy Regulates Formation of Intracytoplasmic Inclusions. Keystone Symposium on Autophagy in Health and Disease, April 15–20, 2007, Monterey, CA.
2. Masaaki Komatsu: Role of p62/SQSTM1 degradation by autophagy in cytoplasmic inclusion formation. 3th GRC AUTOPHAGY IN STRESS, DEVELOPMENT AND DISEASE, January 6–11, 2008, Ventura, CA.
3. Masaaki Komatsu: Autophagy and Neurodegeneration. Keystone Symposium on Neurodegenerative Diseases: New Molecular Mechanisms, Feb. 17–22, 2009, Keystone Resort in Keystone, Colorado, USA.
4. Masaaki Komatsu: Important roles of autophagy-specific substrate p62 in environmental stress response. International Symposium on Autophagy, Sep. 25–28, 2009, Otsu Japan
5. Masaaki Komatsu: Important roles of autophagy-specific substrate p62 in environmental stress response. EMBO Conference AUTOPHAGY Cell biology, Physiology & Pathology, Oct 18–21, 2009, Monte Verita, Ascona, Switzerland