

2023年6月13日

細胞のストレス応答の新しい仕組みを発見

—細胞内の巨大構造体「p62 顆粒」の新たな役割を解明—

順天堂大学大学院医学研究科器官・細胞生理学の小松雅明 教授、一村義信 前任准教授、北海道大学遺伝子病制御研究所生命分子機構分野の野田展生 教授らの研究グループは、p62 顆粒^{*1} を介した細胞のストレス応答の新しい仕組みを解明しました。細胞の酸化ストレス応答は、KEAP1-NRF2 経路^{*2} により一元的に制御されています。これまで、細胞は KEAP1 が酸化修飾されることで酸化ストレスを感知し、転写因子 NRF2 を活性化し、一連の抗酸化たんぱく質の発現を誘導することが知られていました。今回、リン酸化酵素^{*3}ULK1 が p62 顆粒をリン酸化することで KEAP1 を p62 顆粒内に封じ込め、KEAP1 の酸化修飾がなくとも NRF2 を活性化する新しい仕組みを明らかにし、この経路をレドックス^{*4} 非依存性ストレス応答と名付けました。マウスの生体内において強制的にレドックス非依存性ストレス応答を活性化させると、マウスは過剰な生体防御反応のため食道や前胃上皮細胞の過角化^{*5} を起こし、その結果、栄養失調や脱水を引き起こすことも分かりました。リン酸化された p62 顆粒は肝疾患、神経変性疾患やがんの病変部において異常蓄積することが知られており、これら疾患の病態発症機序の解明につながることを期待されます。本論文は The EMBO Journal 誌のオンライン版に 2023 年 6 月 12 日付で公開されました。

本研究成果のポイント

- 細胞内の巨大な構造体 p62 顆粒の新たな役割とその調節の仕組みを発見。
- p62 顆粒を介したストレス応答の異常は食道や胃の閉塞を引き起こす。

背景

液-液相分離とは、均一に混ざり合った溶液が互いに溶け合わない二相に分離する現象のことであり、細胞内ではたんぱく質や核酸同士の弱い相互作用によって起こることが知られています。液-液相分離によって周囲の細胞質から区画化された構造体は液滴と呼ばれ、近年、様々な液滴が同定され、それらは遺伝子発現、たんぱく質翻訳、ストレス応答、たんぱく質分解など多様な生命現象を制御することが明らかになってきています。p62 顆粒は、ユビキチン化たんぱく質と結合することで液-液相分離した液滴であり、選択的オートファジー^{*6} により分解されることが知られていました。一方、p62 顆粒が持つ生理機能に関しては不明なままでした。

News & Information

内容

今回、研究グループは、p62 顆粒は細胞のストレス応答を制御する液滴であることを見出しました。高速原子間力顕微鏡^{*7} など高度な研究手法により、ULK1 が p62 と直接相互作用し、p62 をリン酸化することが明らかになりました (図 1)。さらに、光退色後蛍光回復や光退色後蛍光損失法^{*8} を駆使し、細胞において ULK1 は p62 顆粒に局在化し、p62 顆粒をリン酸化することで KEAP1 を p62 顆粒内に封じ込めることが分かりました。その結果、p62 顆粒は KEAP1 の酸化修飾がなくとも NRF 2 を活性化する、というこれまで全く知られていなかったストレス応答経路を見出すことに成功し、この経路を「レドックス非依存性ストレス応答」と名付けました (図 2)。

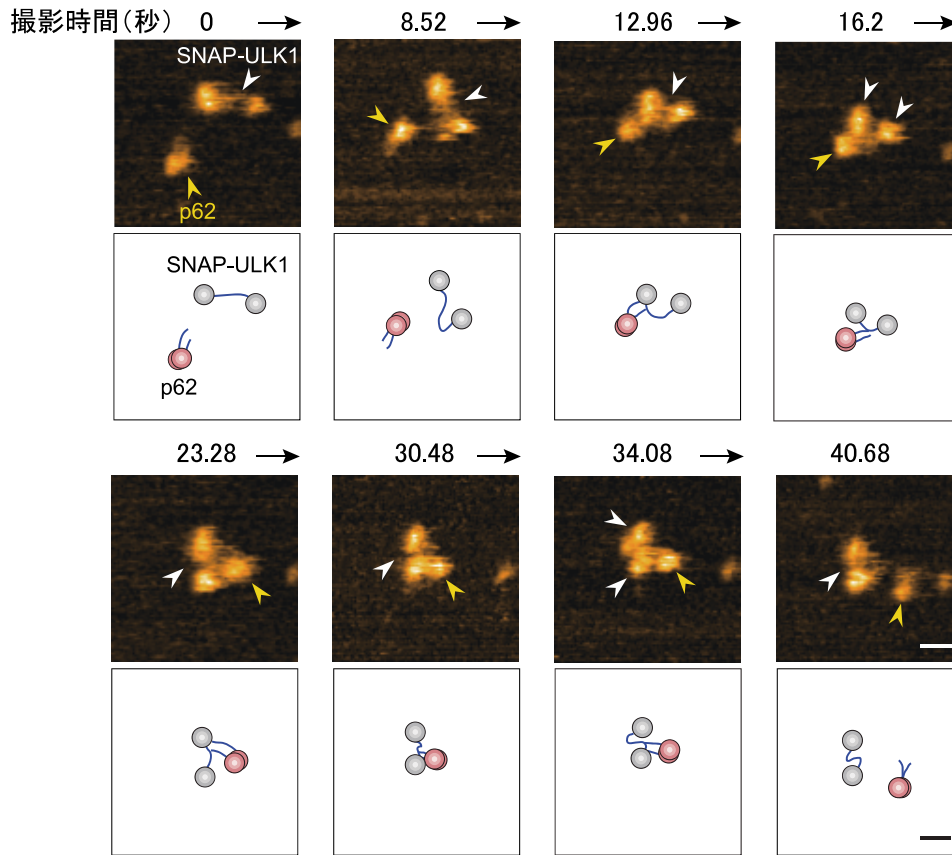
この新たなストレス応答経路の個体における意義を明らかにするため、強制的にレドックス非依存性ストレス応答を活性化するマウスを作製、解析した結果、このマウスは過剰な生体防御反応のために食道や前胃の上皮細胞の過角化を起こし、食道や前胃の閉塞による栄養失調や脱水を引き起こしました。

以上の解析を通じて、細胞内の新たなストレス応答の仕組みとして、KEAP1 をリン酸化 p62 液滴に隔離することで活性化するレドックス非依存性ストレス応答の存在が初めて明らかになりました。

今後の展開

今回の成果は細胞のストレス応答機構や液-液相分離の生理的役割について新たな知見を与えるものです。また、p62 顆粒は肝疾患、神経変性疾患の病変細胞や肝細胞がんにおいて過剰に蓄積することが知られており、これら病態においてレドックス非依存性ストレス応答が調整不全となっていることが強く疑われ、それら重篤な疾患の病態発症機序の解明が期待されます。

A



B

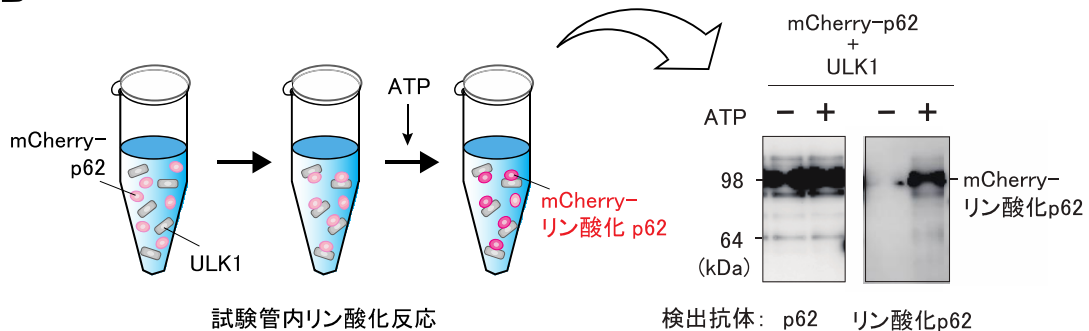


図1：高速原子間力顕微鏡による解析と試験管内リン酸化反応

A. 高速原子間力顕微鏡による ULK1 (SNAP-ULK1) と p62 の分子間の直接相互作用。高速原子間力顕微鏡で撮影した動画のコマ送り画像 (上図) とその模式図 (下図)。白矢頭は ULK1、黄色矢頭は p62 を指す。ULK1 と p62 の動的な結合と解離が観察された。

B. 試験管内リン酸化反応。ULK1 リン酸化酵素による試験管内 p62 たんぱく質のリン酸化反応の模式図 (左図)。精製 ULK1 リン酸化酵素 (ULK1) と精製 p62 たんぱく質 (mCherry-p62) を試験管内で混合し、リン酸基の供与体基質である ATP を添加した。反応産物をウエスタンブロットで解析した (右図)。その結果、ATP 存在下においてリン酸化された p62 が検出された。以上の結果は、ULK1 リン酸化酵素が直接 p62 と結合し、リン酸化することを示している。

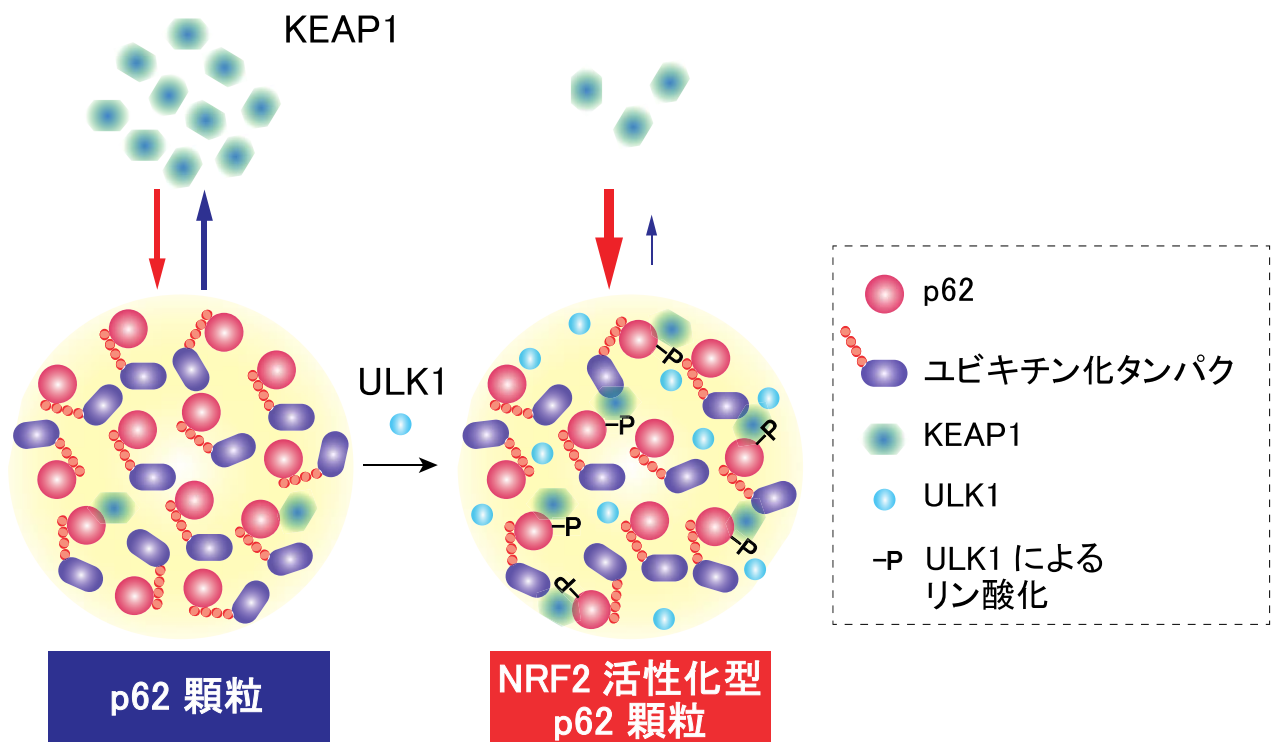


図2：レドックス非依存的ストレス応答機構

ULK1 が p62 顆粒に局在化することで p62 顆粒がリン酸化されると、KEAP1 が p62 顆粒内に封じ込められストレス応答転写因子 NRF2 が活性化される。

用語解説

*1 p62 顆粒： 肝細胞がんや神経変性疾患の病変細胞では巨大な構造体である p62 顆粒を形成する。p62 は、たんぱく質恒常性の破綻、酸化ストレス、あるいは炎症性ストレスなどにより発現誘導される多機能たんぱく質である。最も代表的なオートファジー選択的分解基質であり、ユビキチン化たんぱく質と結合することで液-液相分離を起こす。

*2 KEAP1-NRF2 経路： NRF2 は酸化ストレス応答を制御する主要な転写因子である。通常は、KEAP1 が結合することでユビキチン化され、プロテアソームで恒常的に分解されている。一方、細胞が酸化ストレスを感知すると KEAP1 が酸化修飾を受けて NRF2 から解離する。その結果、NRF2 は核内へ移行し、様々な生体防御遺伝子群の発現を誘導する。レドックス異常を伴わない変性したたんぱく質が蓄積した場合も NRF2 が活性化されることが知られているが、その制御機構は不明のままであった。

*3 リン酸化酵素： たんぱく質は遺伝子の転写、翻訳により作られ、その後、化学修飾を受けて機能が調節されることもある。リン酸化は最も多くのたんぱく質で行われる翻訳後修飾であり、リン酸化を担う酵素をリン酸化酵素と呼ぶ。

*4 レドックス： 英語の Reduction (還元) と Oxidation (酸化) を合わせた言葉で酸化還元を意味する。通

News & Information

常、細胞内は様々な抗酸化酵素の作用で還元状態が維持されている。ミトコンドリアの酸素呼吸、あるいは外的要因で酸化状態に陥ると細胞を保護するための酸化ストレス応答が発動される。

*5 過角化： 上皮細胞の異常な分化などにより上皮最表面の扁平上皮が肥圧化した状態を過角化と呼ぶ。食道上皮細胞の過剰な角化は扁平上皮がんを確認される癌真珠と呼ばれる構造体の形成につながる。

*6 選択的オートファジー： 細胞内の特定のたんぱく質や細胞小器官（ミトコンドリアや小胞体など）を選択的にオートファゴソームに取り込み、リソソーム（分解酵素を格納している細胞小器官）で分解する作用。選択的オートファジーの異常はがんや神経変性疾患と関連すると考えられている。

*7 高速原子間力顕微鏡： 原子間力顕微鏡 (AFM) は、走査 (スキャン) によってカンチレバー探針 (プローブ) と試料 (サンプル) とを力学的に接触させ、溶液中の生体分子をナノメートル (nm=10Å) の分解能で直接観察できる顕微鏡。高速 AFM は、従来型の AFM に比べ、画像取得に必要な時間を数百分の1に短縮・高速化した装置。1枚の画像取得に要する時間は従来型の AFM では数分以上を要していたが、高速 AFM ではミリ秒程度の短時間でできる。そのため、生体分子の反応や構造変化をリアルタイムで観察できる。

*8 光退色後蛍光回復と光退色後蛍光損失法： 細胞内の観察対象となる特定領域に存在する蛍光分子に対して、強い励起光を照射し退色させ、その後の蛍光回復を計時的に測定する手法を光退色後蛍光回復と呼ぶ。逆に、観察対象以外の部分を退色させ後、観察対象の蛍光損失の計時変化を測定する手法を光退色後蛍光損失法と呼ぶ。これらの解析を用いることで細胞内の分子の移動速度や流動性を知ることができる。

原著論文

本研究は The EMBO Journal 誌のオンライン版に 2023 年 6 月 12 日付で公開されます。

英文タイトル： Phosphorylation of phase-separated p62 bodies by ULK1 activates a redox-independent stress response

タイトル(日本語訳)：相分離した p62 顆粒の ULK1 によるリン酸化は、酸化還元非依存的なストレス応答を活性化する

著者：Ryo Ikeda^{1,2}, Daisuke Noshiro³, Hideaki Morishita¹, Shuhei Takada¹, Shun Kageyama¹, Yuko Fujioka³, Tomoko Funakoshi¹, Satoko Komatsu-Hirota¹, Ritsuko Arai⁴, Elena Ryzhii⁴, Manabu Abe⁵, Tomoaki Koga⁶, Hozumi Motohashi⁷, Mitsuyoshi Nakao⁶, Kenji Sakimura⁵, Arata Horii², Satoshi Waguri⁴, Yoshinobu Ichimura^{1,*}, Nobuo N Noda^{3,*} and Masaaki Komatsu^{1,*}

著者 (日本語表記)：池田良^{1,2}、能代大輔³、森下英晃¹、高田周平¹、蔭山俊¹、藤岡優子³、船越智子¹、小松(廣田) 聡子¹、荒井律子⁴、Elena Ryzhii⁴、阿部学⁵、古賀友紹⁶、本橋ほづみ⁷、中尾光善⁶、崎村建司⁵、堀井新²、和栗聡⁴、一村義信^{1,*}、野田展生^{3,*}、小松雅明^{1,*}

*共同責任著者

著者所属：1)順天堂大学大学院医学研究科器官・細胞生理学分野、2)新潟大学大学院医歯学総合研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野、3)北海道大学遺伝子病制御研究所生命分子機構分野、4)福島県立医科大学医学部解剖・組織学講座、5)新潟大学脳研究所モデル動物開発分野、6)熊本大学発生医学研究所発生制御部門細胞医学分野、7)東北大学加齢医学研究所加齢制御研究部門遺伝子発現制御分野

DOI: 10.15252/emj.2022113349

News & Information

本研究は JSPS 科研費 (20K06549, 21K06178, 21H04163, 20H03213, 20K06644, 19H05707, 19H05706, 21H004771)、革新的先端研究開発支援事業 AMED-PRIME (21gm6410019h0001)、戦略的創造研究推進事業 JST-CREST (JPMJCR20E3)、生命科学・創薬研究支援基盤事業 AMED-BINDS (JP19am0101001_support no. 0002)、革新的先端研究開発支援事業 AMED-CREST (22gm1410004h0003)、日本学術振興会 A3 フォーサイト事業、稲盛財団、武田科学振興財団などの支援を受け実施されました。なお、本研究にご協力いただいた皆様には深謝いたします。

<研究内容に関するお問い合わせ先>

順天堂大学大学院医学研究科器官・細胞生理学

教授 小松 雅明 (こまつ まさあき)

TEL: 03-5802-1029 E-mail: mkomatsu@juntendo.ac.jp

URL: https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/kikan_saibou/

北海道大学 遺伝子病制御研究所 生命分子機構分野

教授 野田 展生 (のだ のぶお)

TEL: 011-706-5069 E-mail: nn@igm.hokudai.ac.jp

URL: <https://mechanism.igm.hokudai.ac.jp/>

<取材に関するお問い合わせ先>

順天堂大学 総務局 総務部 文書・広報課

TEL: 03-5802-1006 E-mail: pr@juntendo.ac.jp 大学 HP: <https://www.juntendo.ac.jp>

北海道大学 社会共創部 広報課

TEL: 011-706-2610 E-mail: jp-press@general.hokudai.ac.jp 大学 HP: <https://www.hokudai.ac.jp>