

研究区分	一般共同研究	
研究課題	mTORC1によるオートファジー選択的基質 p62 のリン酸化制御	
研究代表者	所属・職名・氏名	公益財団法人東京都医学総合研究所・副参事研究員・小松雅明
研究分担者	所属・職名・氏名	公益財団法人東京都医学総合研究所・主席研究員・一村義信
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	<p>オートファジー障害ないしは p62 遺伝子発現上昇により p62 タンパク質が過剰に蓄積すると、p62 が Nrf2 を分解へと導く Keap1 に結合し、生体防御転写因子 Nrf2 が活性化する。ヒト肝細胞がん細胞においては、過剰な p62 に蓄積により Nrf2 が恒常的に活性化しており、これががん細胞の増殖に寄与する。重要なことに、この機構の律速は p62 の Keap1 結合領域のリン酸化であり、このリン酸化が Keap1 との結合を増強させることを見出した。つまり、p62 のリン酸化制御は、肝細胞がんの創薬ターゲットとなり得る。本研究では、p62 と相互作用するキナーゼ mTORC1 ないしは ULK1/2 が p62 のリン酸化、Nrf2 の活性化に関与するか否かを検証する。</p>	
【研究内容・成果】	<p>受入担当教員である金沢大学がん進展制御研究所・がん幹細胞プロジェクトの平尾敦教授らにより作成された mTORC1 複合体のサブユニット Raptor cKO および ULK1/2 ノックアウト MEFs を利用し mTORC1 および ULK1/2 の p62 のリン酸化の関与を検討した。具体的には</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. mTORC1 特異的阻害剤 (Rapamycin や Torin) を用いて、p62 リン酸化の有無をウエスタンブロットにて検証した。 2. Raptor cKO MEFs に 4-hydroxytamoxifen を添加し、Raptor を欠損させた後、p62 リン酸化の有無をウエスタンブロットにて検証した。 3. ULK1、2 欠損、ULK1/2 二重欠損 MEFs における p62 リン酸化の有無をウエスタンブロットにて検証した。 4. 精製 mTOR キナーゼおよび p62 ドメインを用いた in vitro リン酸化アッセイ系を構築し、直接的なリン酸化か否かを検討した。 <p>これらの実験から、ストレスに応じて mTORC1 が直接に p62 の 351 番目のセリン残基をリン酸化すること、その結果、Keap1 と p62 との相互結合が著しく増強され Nrf2 が活性化することが明らかになった。このリン酸化は p62 がオートファジー選択的基質 (変性タンパク質凝集体、異常ミトコンドリア、細胞内侵入細菌) に移行した時に起こり、リン酸化 p62 および Keap1 はオートファジー選択的基質とともに分解された。一方、ULK1/2 は S351 のリン酸化には関与しなかった。さらに、肝細胞がん細胞においては恒常的に p62 の 351 番目のセリン残基がリン酸化され Nrf2 が活性化していることも明らかにした。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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, and Komatsu M. Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. <i>Mol Cell</i> 51: 618-631 (2013) 2. Ishimura R, Tanaka K, and Komatsu M. Dissection of the role of p62/Sqstm1 in activation of Nrf2 during xenophagy. <i>FEBS Lett.</i> 588: 822-828 (2014) <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Komatsu M. "Liver Autophagy" <i>Asian Pacific Association for the Study of the Liver</i> Brisbane, Australia, 2014, 3.12-15. 2. Komatsu M. "Coupling of the Keap1-Nrf2 system to autophagy" <i>The Environmental Response 2014</i> Sendai, Japan, 2014, 2.28-3.2. <p>【その他特筆事項】 なし</p>	