

2023年5月15日

”

”

”

”

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、森下英晃 准教授らの研究グループは、細胞の恒常性（正常な働き）*1を維持する仕組みとして、新たなオートファジー経路を発見しました。研究グループは、細胞内の大規模な分解システムとして知られるオートファジーによって分解されるたんぱく質を効率よく精製し同定する革新的手法を開発しました。その結果、細胞内の巨大なたんぱく質複合体「ヴォルト」が新たなオートファジー経路により分解されること、ヴォルトの分解不全は肝細胞がんに関連することを見出しました。本研究成果はがんや神経変性疾患などのオートファジー関連疾患の発症機序の解明につながることを期待されます。

本研究成果のポイント

- ’
- ’
- ’

背景

オートファジー（自食作用：細胞が自己成分を分解する機能）は、細胞内のたんぱく質や細胞小器官などをリソソームに輸送し、それらを分解する仕組みです（図1）。近年、オートファジーは細胞内を無作為に分解するだけでなく、細胞内の特定のたんぱく質を効率良く分解する作用を有することが明らかになり、この作用は「選択的オートファジー*2」と呼ばれています。選択的オートファジーの代表的な標的として知られているのが「p62 顆粒*3」です。p62 顆粒は、p62 と呼ばれるたんぱく質とユビキチン化タンパク質などの他の様々なたんぱく質が液-液相分離*4して形成された、膜に包まれていない細胞小器官であり、p62 顆粒の分解不全はがんや神経変性疾患の病態に関与すると考えられています。しかし、これまで p62 顆粒に含まれるたんぱく質を同定する手法が存在しなかったため、p62 顆粒の構成成分やその分解の意義は不明でした。

内容

今回、研究グループは p62 顆粒を介して選択的オートファジーで分解されるたんぱく質の同定を目的として、まず蛍光標識した p62 顆粒をセルソーター*5を用いて効率よく精製する手法を確立しました（図2）。次に、精製した p62 顆粒に含まれるたんぱく質を質量分析により網羅的に同定しました。さらに、革新的な選択的オートファジー阻害マウスの肝臓を用いて、選択的オートファジーで分解されるたんぱく質も網羅的に同定しました（図2）。これら二つの革新的手法で得られた結果を統合的に解析した結果、巨大なたんぱく質複合体ヴォルト（vault）*6が p62 顆粒を介して選択的オートファジーで分解されるというこれまで全く知られていなかった新たなオートファジー経路を見出すことに成功し、この分解経路を「ヴォルトファジー（vault-phagy）」と名付けました（図2）。

<研究内容に関するお問合せ先> 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 [TEL : 03-5802-1029]

<取材に関するお問合せ先> 順天堂大学 総務部文書・広報課 担当：濱田 [TEL : 03-5802-1006]

この新たなオートファジー経路の意義を明らかにするため、p62 顆粒の分解不全を伴う非アルコール性脂肪性肝炎*7 由来のヒト肝細胞がん検体を解析した結果、肝細胞がんの腫瘍部において肝細胞内にヴォルトが蓄積していることを見出しました。さらにこの時ヴォルトは「マロリー・デンク体*8」と呼ばれる p62 陽性構造体に集積していることもわかりました。これまでにヴォルトの蓄積は肝細胞がんを促進することが報告されていることから、以上の結果は、ヴォルトファジーの障害が肝細胞がんの発症に関連することを強く示唆しています。

以上の解析を通じて、細胞内の恒常性維持を担う新たな仕組みとして、細胞内の巨大なたんぱく質複合体ヴォルトを選択的に分解するオートファジー経路の存在が初めて明らかになりました。

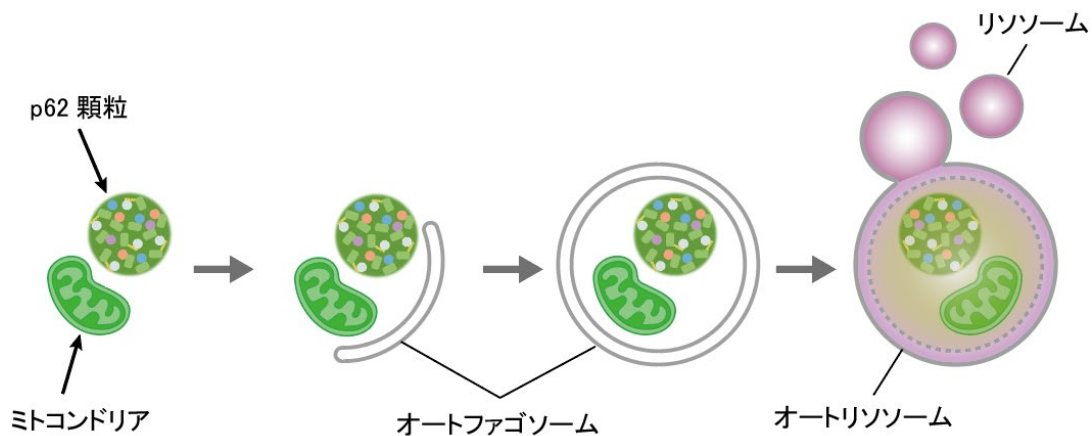
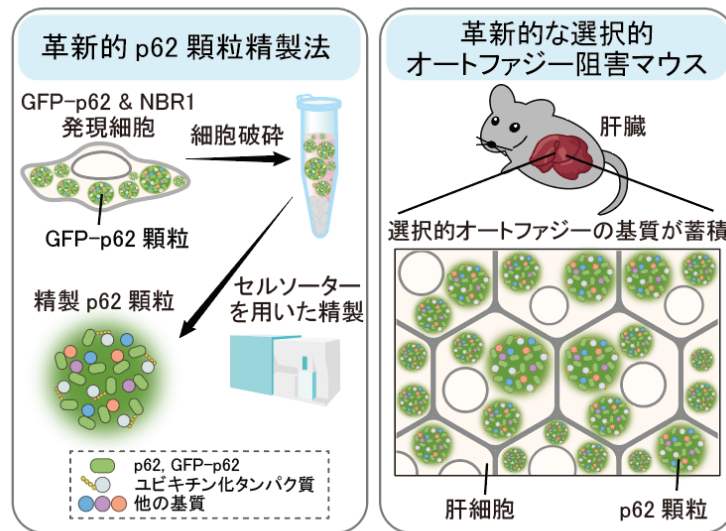


図1：オートファジーの概要

細胞内成分 (p62 顆粒やミトコンドリアなどの細胞小器官) はオートファゴソームに取り込まれる。その後、オートファゴソームはリソソームと融合してオートリソソームとなり、内容物が分解される。

革新的手法を用いたオートファジーの基質の探索



新たなオートファジー経路 (ヴォルトファジー) の発見

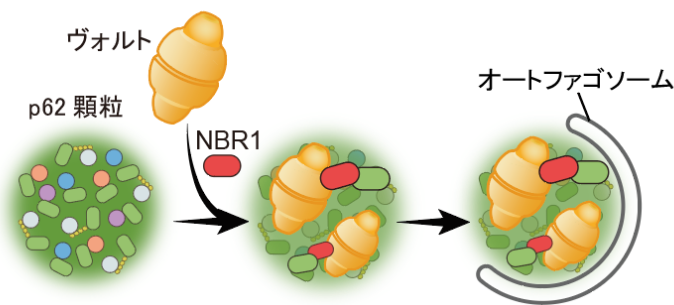


図 2：二つの革新的手法を用いた統合的解析から明らかになった新たなオートファジー経路のモデル図
 本研究ではまず、p62 顆粒を効率的に精製できる方法（セルソーターを用いて GFP-p62 陽性顆粒を精製）と、選択的オートファジー阻害マウス（肝臓特異的に選択的オートファジーを阻害できるマウス。肝細胞内に選択的オートファジーで分解されるたんぱく質が蓄積）という二つの革新的手法を開発した。次に、精製 p62 液滴と選択的オートファジー阻害マウス肝臓の各々に含まれるたんぱく質群を質量分析により網羅的に同定した。これらの解析から得られたデータを統合的に解析した結果、巨大なたんぱく質複合体ヴォルトが p62 顆粒に含まれ、かつ選択的オートファジーで分解されることを新たに見出し、この新たなオートファジー経路を「ヴォルトファジー」と名付けた。本研究ではさらにヴォルトは NBR1（p62 と結合するたんぱく質）と直接結合することで p62 顆粒に集積し、分解されることも明らかにした。

今後の展開

これまでにオートファジーの異常は、がんや神経変性疾患などのオートファジー関連疾患の原因となることが示されています。今回研究グループが確立した手法は、これらの疾患の解析にも適応できることから、将来的にがんや神経変性疾患等の病態や発症機序の解明、そしてそれら疾患の治療につながるものが期待されます。

用語解説

- *1 細胞の恒常性： 細胞の内部や外部の環境因子の変化にかかわらず、細胞の状態が一定に保たれるという性質。健康を定義する重要な要素でもある。
- *2 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。
- *3 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。p62 は転写因子 Nrf2 を負に制御する Keap1 とも結合することが知られている。
- *4 液-液相分離： 均一に混ぜり合った溶液が、互いに溶け合わない二相に分離する現象。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る。ミトコンドリアなどの膜で包まれた細胞小器官は膜によって区切られることで区画化されるが、p62 顆粒などは液-液相分離によって区切られることで周囲の細胞質から区画化される。
- *5 セルソーター： 特定の細胞や細胞内成分を分取する実験装置。細い管の中を通る細胞懸濁液や細胞破碎液にレーザーを照射し、蛍光や散乱光を測定することで細胞や細胞小器官を分別する。
- *6 ヴォルト (vault)： 1986 年に発見された機能未知の巨大なたんぱく質複合体であり、細胞小器官の一種。形がアーチ型天井に似ていることからボルトと名付けられた。リボソームの約 3 倍のサイズを有する。内部は空洞であるが、ノンコーディング RNA やいくつかのたんぱく質も存在する。ほとんどの組織の細胞に存在し、1 細胞あたり 1000 コピー以上存在する。
- *7 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: nonalcoholic steatohepatitis)： アルコール多飲を原因としない脂肪肝から進行する肝臓病。メタボリックシンドロームの増加に伴って近年増加している。
- *8 マロリー・デンク体： 肝細胞がんなど肝疾患において、肝細胞内に出現する p62 やユビキチン化たんぱく質陽性の構造体。構成成分や病態との関連はほとんど不明。

研究者のコメント

本研究により、これまで全く知られていなかったオートファジー経路「ヴォルトファジー」の存在が初めて明らかになりました。本研究成果は、将来的に肝細胞がんや神経変性疾患等のオートファジー関連疾患の病態解明や治療法開発につながる可能性があります。

なお本研究の共同第一著者である来栖玲央（医学部 5 年生）、藤本侑生（医学部 6 年生）は順天堂大学の基礎研究医養成プログラムに属する医学部生であり、医学部 2 年生から医学部のカリキュラムに加えて基礎研究に取り組み、今回論文出版に至りました。順天堂大学は基礎研究を志望する学生に早期から支援し、将来の医学界を牽引する人材を育成することを目標に今後も教育プログラムの整備を進めていきます。

原著論文

本研究は *Developmental Cell* 誌のオンライン版に 2023 年 5 月 15 日付で公開されました。

英文タイトル: Integrated proteomics identifies p62-dependent selective autophagy of the supramolecular vault complex

タイトル(日本語訳): 統合的プロテオミクス解析を用いた、超分子複合体 vault の p62 依存的選択的オートファジーの発見

著者: Reo Kurusu^{1, #}, Yuki Fujimoto^{1, #}, Hideaki Morishita^{1, #, *}, Daisuke Noshiro², Shuhei Takada¹, Koji Yamano³, Hideaki Tanaka⁴, Ritsuko Arai⁵, Shun Kageyama¹, Tomoko Funakoshi¹, Satoko Komatsu-Hirota¹, Hikari Taka⁶, Saiko Kazuno⁶, Yoshiki Miura⁶, Masato Koike⁷, Toshifumi Wakai⁸, Satoshi Waguri⁵, Nobuo N Noda², Masaaki Komatsu^{1, #, *}

#: co-first authors

*: co-corresponding authors

著者(日本語表記): 来栖玲央^{1, #}、藤本侑生^{1, #}、森下英晃^{1, #, *}、能代大輔²、高田周平¹、山野晃史³、田中秀明⁴、荒井律子⁵、蔭山俊¹、船越智子¹、小松(廣田)聡子¹、高ひかり⁶、數野彩子⁶、三浦芳樹⁶、小池正人⁷、若井俊文⁸、和栗聡⁵、野田展生²、小松雅明^{1, *}

#: 共同筆頭著者

*: 共同責任著者

著者所属: 1) 順天堂大学器官・細胞生理学分野、2) 北海道大学遺伝子病制御研究所、3) 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 難治病態研究部門、4) 大阪大学蛋白質研究所、5) 福島県立医科大学医学部解剖・組織学講座、6) 順天堂大学研究基盤センター生体分子研究室、7) 順天堂大学神経生物学・形態学講座、8) 新潟大学消化器外科

DOI: 10.1016/j.devcel.2023.04.015

本研究は JSPS 科研費 (19H05706, 21H004771, 20H03213, 23H02441)、AMED-PRIME「選択的オートファジーによる *in vivo* でのプロテオスタシス制御とその破綻による病態の理解」(21gm6410019h0001)、AMED-CREST (22gm1410004s0103)、武田科学振興財団、三菱財団、稲盛財団、岸本基金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

准教授 森下 英晃 (もりした ひであき)

TEL: 03-5802-1029 E-mail: h.morishita.hn@juntendo.ac.jp

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

<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 濱田 憲子 (はまだ のりこ)

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

<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 [TEL: 03-5802-1029]

<取材に関するお問い合わせ先> 順天堂大学 総務部文書・広報課 担当: 濱田 [TEL: 03-5802-1006]