

p62/Sequestosomel の生理機能

藤 栄治

1. はじめに

p62/Sequestosomel (ほかにも A170, ZIP などとも呼ばれる。本稿では以降 p62) は、複数のドメインを有する高等動物に広く保存されたタンパク質である (図 1)。各ドメインを介し複数のタンパク質との相互作用を介して、細胞内シグナル伝達の調節やユビキチンに依存したタンパク質トラフィッキングに関与することで多彩な生理機能を発揮すると考えられている。特に、近年その生理的重要性が次々に明らかになってきた主要なタンパク質分解経路の一つであるオートファジーにおいては、p62 は LC3 (Atg8) との相互作用を介して選択的に分解される基質であることが明らかになっている。現在、p62 はオートファジー不全に関連した神経変性疾患や、肝疾患などでみられる異常タンパク質の蓄積を伴う疾患の発症との関係が注目されている。一方で、p62 遺伝子欠損マウスの表現型の最大の特徴は、意外なことに肥満症、メタボリックシンドロームを呈することである。本稿では、p62 遺伝子欠損マウスの表現型解析から明らかになった p62 の生理機能について紹介する。

2. p62 発見の経緯

p62 は Shin らによりヒトのリンパ球においてチロシンキナーゼ p56lck の SH2 ドメインに結合するタンパク質として 1996 年に報告された¹⁾。ほぼ同時期に、石井らによりマウスマクロファージから酸化ストレス誘導タンパク質として A170 が²⁾、Puls らによりラット脳から PKC ζ 結合タンパク質として ZIP が、p62 のホモログとして報告された³⁾が、その明確な生理機能についてはその後長い間不明のままであった。Shin らは、p62 の C 末端にはユビキチン結合 (UBA) ドメインが存在することからプロテアソームとは異なるタンパク質分解系に関与すると予想し、ユビ

筑波大学医学医療系 (〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1)

The physiological role of p62/Sequestosomel

Eiji Warabi (Faculty of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)

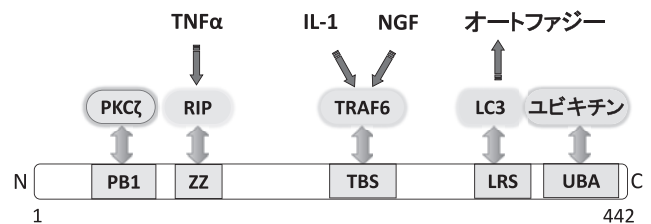


図 1 マウス p62/Sequestosomel タンパク質の構造

442 アミノ酸から構成され、グルタミン酸、プロリン含量が高く、SDS-PAGE では計算値 48 kDa より大きな 60 kDa 付近に検出される。複数のタンパク質との相互作用を介して、さまざまな細胞内シグナル伝達を調節する多機能タンパク質と考えられている。また、LC3 との相互作用により、オートファジーにより分解される選択的基質となる。TNF α : 腫瘍壊死因子 α 、IL-1: インターロイキン 1、NGF: 神経成長因子、PKC ζ : プロテインキナーゼ C ζ 、RIP: 受容体相互作用タンパク質、TRAF6: TNF 受容体関連因子 6、LC3: 微小管結合タンパク質軽鎖 3、PB1: Phox and Bem1、ZZ: ZZ 型ジンクフィンガー、TBS: TRAF6 結合配列、LRS: LC3 結合配列、UBA: ユビキチン結合ドメイン。

キチン化タンパク質を細胞内に隔離しておく構造体として Sequestosome という語句を提案している⁴⁾。p62 の別名である Sequestosomel という名称は Sequestosome に含まれる 1 番目のタンパク質という意味である。したがって、厳密に言えば p62 はヒトにおける Sequestosomel を示すものであるが、オートファジーとの関連が発見され、その重要な役割が見いだされた 2007 年以降、p62 という名称が広く用いられている。

3. オートファジーにおける p62 の役割

オートファジーにおける p62 の関与が報告されて以降、その意義が精力的に研究され、興味深い知見が次々に明らかになってきた。肝疾患にみられるマロリー体、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患にみられる細胞内タンパク質凝集体は、本来分解されるべき異常タンパク質が細胞内における処理能力低下に伴い蓄積するものと考えられており、その機序としてオートファジー活性の低下があげられる。実際のところ、肝、中枢組織特異的にオートファジー必須因子を欠損させた動物モデルでは、凝集体の形成とともに肝障害、神経細胞の脱落が認められ、これらの病態の原因としてのオートファジーの機能異常が

注目を集めている。異常タンパク質凝集体の構成物にはユビキチン化タンパク質が認められるが、p62はそのユビキチンとの結合活性により凝集体を形成する主要因子として決定的な役割を果たしている。

p62 それ自体はオートファジーに必須な因子ではなく、p62欠損細胞においてもオートファジーは正常に起こるが、小松らとPankivらはp62がオートファゴソーム膜の形成に必須なLC3と相互作用し、オートファジーにより選択的に分解される基質であることを明らかにし^{5,6)}、選択的オートファジーという新しい概念を発表した。この発見により、p62はユビキチン化タンパク質をオートファジーにより選択的に分解する機能があることが推測される。さらに、オートファジー不全状態でみられる異常タンパク質凝集体の形成にはp62の存在が必須であることも明らかとなった。

現在、細胞内p62タンパク質のレベルはオートファジー活性を表すマーカーとして用いられることが多いが、この解釈には注意が必要である。石井らの報告にあるように、p62遺伝子は酸化ストレス誘導性であり、酸化ストレス応答に中心的役割を果たす転写因子Nrf2の制御を受けている⁷⁾。すなわち、Nrf2が活性化する条件ではp62遺伝子は正の制御を受け発現の上昇することがありうるため、このような条件下でp62の蓄積をもってオートファジー活性が低下しているものと安易に結論づけるのは、真の現象を見逃している可能性がある。

また、p62はNrf2の抑制因子であるKeap1と相互作用し、Nrf2のKeap1との結合を抑制することでNrf2を活性化する新たな機序が存在することが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。このp62とKeap1間の相互作用は、p62のmTORC1依存的なSer351のリン酸化により亢進することも明らかになっている¹¹⁾。これらの知見はオートファジー不全状態で生じる異常タンパク質の蓄積の機序として重要である。しかし、少なくとも我々の解析では、p62欠損細胞や組織においてNrf2の活性化状態に変化は認められないことから、この新たなNrf2活性化機序はあくまでオートファジー不全のようなp62が過剰に蓄積した場合にみられる現象であり、生理的な条件下におけるp62のNrf2-Keap1系への関与は低いと考えられる。

4. p62欠損マウスの表現型

著者らは、p62の生理機能を明らかにするために全身欠損(null)マウスを作製した。その結果nullマウスは意外なことに、目に見える表現型として加齢とともに著しい肥満症を呈した。また、それに加え高血圧症、単離血管平滑筋細胞の増殖異常、血管リモデリング異常を呈することが明らかとなった。著者らの報告以外では、高齢時において

中枢神経細胞に高度リン酸化tauタンパク質の蓄積に伴う神経変性がみられ、不安、うつ症状の出現、記憶力の低下、アルツハイマー様の病態を示すことも報告されている¹²⁾。

1) 肥満症

Rodriguezらは2007年にp62-nullマウスが加齢とともに肥満症を呈することを報告した¹³⁾。彼らのp62-nullマウスでは、脂肪細胞の分化に関わるMAPキナーゼErkのリン酸化亢進がみられ、これにより脂肪前駆細胞の分化が促進すること、さらに基礎代謝量の低下が肥満症の大きな要因としている。我々も独自にp62-nullマウスを作製し、肥満症を呈するのを見いだしたが、その機序はRodriguezらとは異なり、最大の要因は過食であると考えている¹⁴⁾。

我々はまず、一日摂餌量と基礎エネルギー代謝量を調べた。その結果、p62-nullマウスは若齢時から摂餌量が多く、それは加齢とともに増大した(図2A)。また、酸素消費量から見積もられる基礎代謝量に差異はなかった。そこで、一日摂餌量を野生型マウスと同等に制限して長期間飼育したところ、p62-nullマウスの体重増加曲線は野生型とほぼ同等の経過をたどり、内臓脂肪の蓄積、耐糖能異常も正常となった。つまり、p62-nullマウスが呈する肥満症、メタボリックシンドロームは過食が原因と考えられた。そこで著者らは、p62は摂食調節に関与しているものと考え、その制御の中心となる脳に着目して解析した。p62はほとんどの臓器で発現が認められるが、中枢では視床下部神経細胞に強い発現を認めるタンパク質である。我々はp62^{flax/flax}マウスとNestin-Creマウスを用いて中枢神経特異的p62欠損マウスを作製した。解析の結果、このマウスは全身欠損マウスと同様に加齢とともに有意な体重増加、肥満症を呈することが明らかとなった。このことから、p62は中枢で摂食調節を制御する機能があり、その欠損により過食が引き起こされ、肥満となることが予想された。そこで次に、過食を引き起こす機序をより詳細に探るために、種々の摂食調節ホルモンの作用を解析した。その結果、摂食抑制に働くホルモンであるレプチンの作用がp62-nullマウスでは減弱していることが明らかとなった(図2B)。その後のレプチンシグナル伝達の解析から、レプチンの摂食行動抑制作用に必須である転写因子Stat3の核移行の効率性が、p62-nullマウスの視床下部神経細胞では低下していることが明らかになった(図2C)。p62がどのようにレプチン-Stat3シグナルを調節しているのか、その分子メカニズムについてはほかのシグナル伝達調節とのクロストークなどが考えられ、今後のさらなる解析が必要である。

2) 血管リモデリング異常

p62-nullマウスから単離した腹部大動脈由来の血管平滑

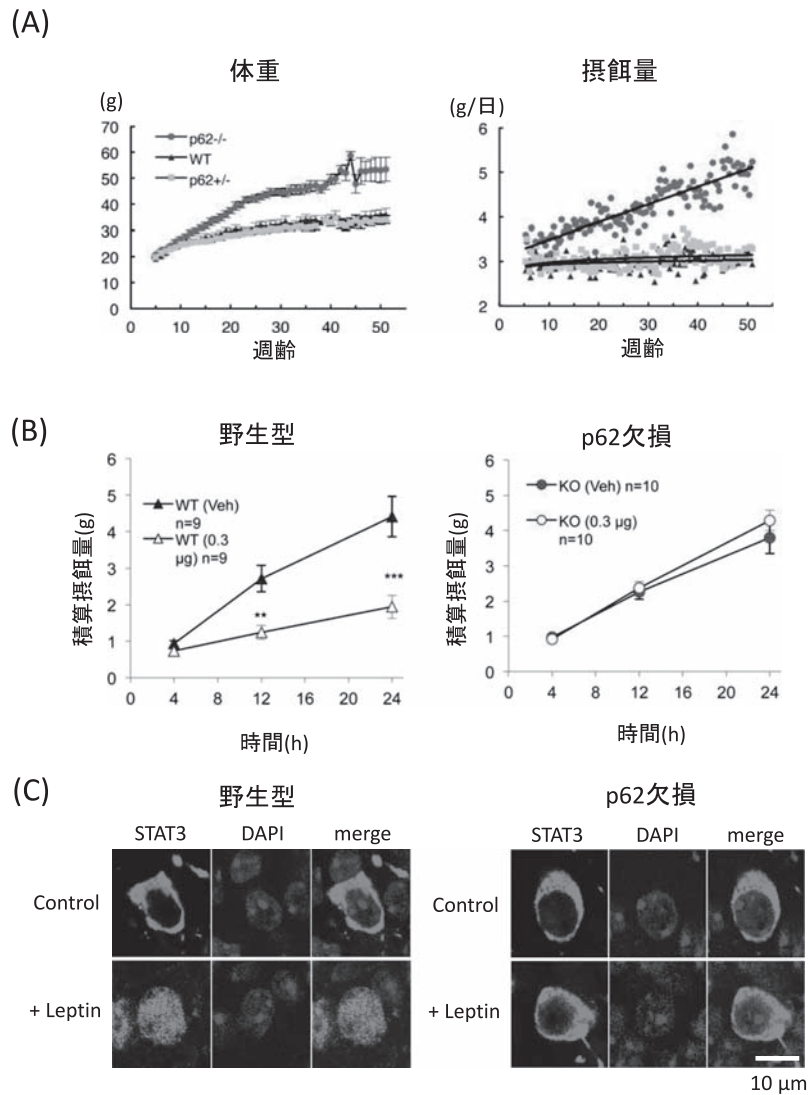


図2 p62欠損マウスの肥満症とレプチン抵抗性

(A) 体重, 摂取量の変化. p62 欠損マウスは加齢とともに体重増加, 摂取量の増大がみられ, 肥満症となる. (B) p62 欠損マウスにおけるレプチン作用の低下. 肥満発症前の若齢マウス脳室内にレプチンを投与し, 継続的に摂取量を測定した. 野生型マウスではレプチンの投与により摂取量の抑制がみられるが (△), p62 欠損マウスでは効果がほとんどなく (○), レプチン抵抗性となっていることがわかる. Veh: Vehicle. (C) レプチン投与による視床下部神経細胞内 Stat3 の挙動. 野生型マウスではレプチン投与により Stat3 は核へ移行するが, p62 欠損マウスではほとんど移行が起きない.

筋細胞には, 野生型と比べて著しい増殖速度, 遊走能の亢進がみられる¹⁵⁾ (図 3A). これらの現象には血清による MAP キナーゼの持続的な活性化が関与しており, p62 には増殖シグナルを抑制する機能があることが予想される¹⁵⁾. そのメカニズムとして, p62 が増殖因子受容体のインターナリゼーションや, 分解によるシグナル伝達の終結に関与するなどが推測されるが, 詳細は不明である.

p62-null マウスには血管系の組織学的な異常はみられないが, 血管構造がダイナミックに変化する血管リモデリン

グ時においては野生型と異なる応答がみられる. 著者らは血管リモデリングモデルとして頸動脈の結紮を施し, その後に観察される内膜肥厚の程度を観察した. 頸動脈の結紮により結紮部には平滑筋の遊走, 増殖が起き, 血管内膜肥厚が惹起されるが, その程度は p62-null マウスで著しく亢進していた¹⁵⁾ (図 3B). 血管結紮時に起きる平滑筋細胞の遊走, 増殖は血小板由来増殖因子 (PDGF) などの作用によると思われるが, p62-null マウスでは *in vitro* でみられた血清依存的な増殖亢進と同様に, PDGF シグナルの持

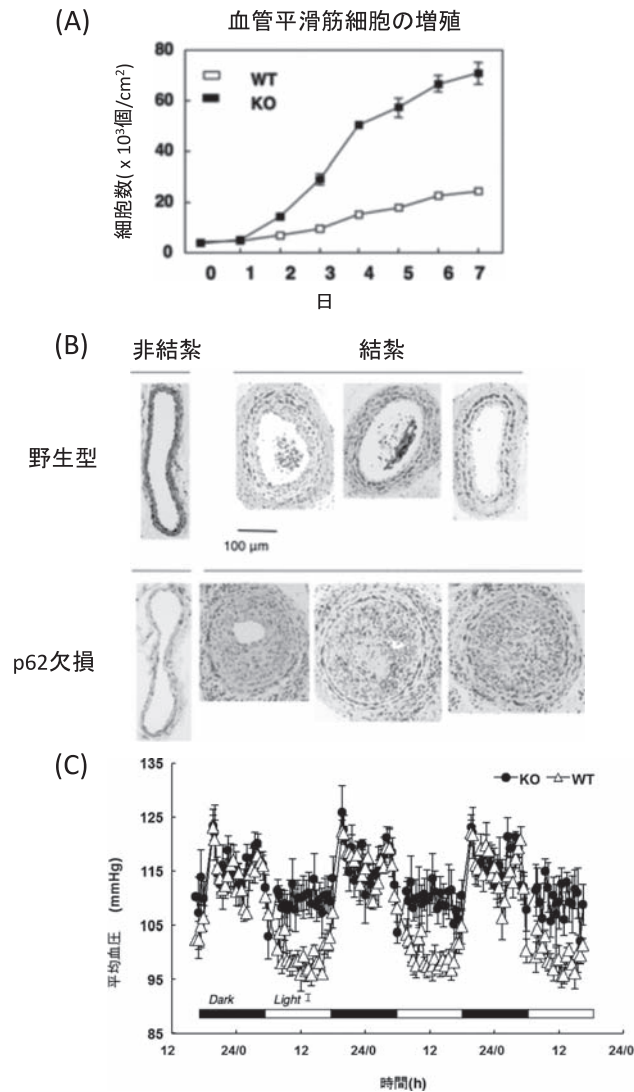


図3 p62欠損マウスの血管における表現型と血圧の日周変動
(A) 腹部大動脈由来平滑筋細胞の増殖速度はp62欠損で著しく亢進する。(B) 頸動脈結紮による血管リモデリング。p62欠損マウスは内膜肥厚の程度が激しく、リモデリングに異常がみられる。(C) テレメトリーによる血圧の解析。p62欠損マウスは明期(安静時、白いバーで示した部分)における血圧が野生型と比べ有意に高い。

統的な活性化によって結紮部位に過剰な血管リモデリングが生じたと考えられる。

3) 高血圧症

著者らは圧力センサーを備えたテレメトリーをマウス頸動脈に埋め込み、血圧変動を詳細に解析した。テレメトリーは覚醒下、自由行動下における種々のパラメーターの変動を常時モニターできる利点があり、動物の血圧変動を正確に測定することができる。その結果、p62-nullマウスの血圧は野生型とは異なる日周変動をしていることを見いだした。通常、マウスの血圧は安静期である明期に低下

し、活動期である暗期に上昇する。しかしp62-nullマウスでは、暗期は野生型と同等であるのに対し、明期の血圧低下がわずかであり、高血圧(non-dipper型)となっていた(図3C)。このタイプの高血圧症はヒトにおける夜間高血圧症に相当するものであり、脳、循環器への悪影響が強いとされる。高血圧症のメカニズムとしては、尿中カテコールアミン分泌量が増加していたことから、交感神経系の活性化の関与が考えられる。興味深いことに、高血圧症は肥満症を呈する前の若齢時から発症しており、メタボリックシンドロームに関連して二次的に発症するものではなく、直接的な表現型として現れるものと思われる。また、血圧の日周変動の異常は、概日リズムの異常とも解釈することもできる。p62が概日リズムの形成に重要な役割を持つ可能性があり、今後の解析が待たれる。

5. おわりに

p62はオートファジーの選択的基質となっていることは間違いないが、遺伝子欠損マウスの表現型から考えられる生理機能は、適正な体重の維持と血圧の日周変動の正常な調節である。また、頸動脈結紮モデルで示された血管平滑筋細胞の増殖異常のように、特定のストレスや病態条件下で初めてその機能がみえてくることもある。さらに、p62は全身の組織で発現しているため、個々の臓器において異なる生理機能を持つことが予想される。p62とLC3との相互作用を介して分解される標的タンパク質を同定することで、p62が持つさまざまな生理作用の分子機序が明らかになっていくことが期待される。

謝辞

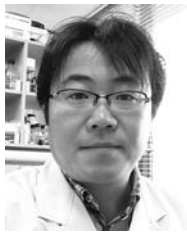
本研究を開始する機会を与えて下さり、以来、多大なるご助言をいただいている筑波大学名誉教授石井哲郎先生、ならびに多くの共同研究者の皆様、当研究室の学生に深く感謝申し上げます。

- 1) Joung, I., Strominger, J.L., & Shin, J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5991-5995.
- 2) Ishii, T., Yanagawa, T., Kawane, T., Yuki, K., Seita, J., Yoshida, H., & Bannai, S. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 456-460.
- 3) Puls, A., Schmidt, S., Grawe, F., & Stabel, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6191-6196.
- 4) Shin, J. (1998) *Arch. Pharm. Res.*, 21, 629-633.
- 5) Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., 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., & Tanaka, K. (2007) *Cell*, 131, 1149-1163.
- 6) Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A.,

- Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., & Johansen, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 24131–24145.
- 7) Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Kato, Y., Bannai, S., & Yamamoto, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 16023–16029.
- 8) 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., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., & Yamamoto, M. (2010) *Nat. Cell Biol.*, **12**, 213–223.
- 9) Lau, A., Wang, X.J., Zhao, F., Villeneuve, N.F., Wu, T., Jiang, T., Sun, Z., White, E., & Zhang, D.D. (2010) *Mol. Cell Biol.*, **30**, 3275–3285.
- 10) Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., & Johansen, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 22576–22591.
- 11) Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y.S., 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, M.S., Yoshimori, T., Tanaka, K., Yamamoto, M., & Komatsu, M. (2013) *Mol. Cell*, **51**, 618–631.
- 12) Ramesh, B.J., Lamar, S.M., Peng, J., Strom, A.L., Kempainen, R., Cox, N., Zhu, H., Wooten, M.C., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., & Wooten, M.W. (2008) *J. Neurochem.*, **106**, 107–120.
- 13) Rodriguez, A., Durán, A., Selloum, M., Champy, M.F., Diez-Guerra, F.J., Flores, J.M., Serrano, M., Auwerx, J., Diaz-Meco, M.T., & Moscat, J. (2006) *Cell Metab.*, **3**, 211–222.
- 14) Harada, H., Warabi, E., Matsuki, T., Yanagawa, T., Okada, K., Uwayama, J., Ikeda, A., Nakaso, K., Kirii, K., Noguchi, N., Bukawa, H., Siow, R.C., Mann, G.E., Shoda, J., Ishii, T., & Sakurai, T. (2013) *J. Neurosci.*, **33**, 14767–14777.
- 15) Sugimoto, R., Warabi, E., Katayanagi, S., Sakai, S., Uwayama, J., Yanagawa, T., Watanabe, A., Harada, H., Kitamura, K., Noguchi, N., Yoshida, H., Siow, R.C., Mann, G.E., & Ishii, T. (2010) *J. Cell Mol. Med.*, **14**, 1546–1554.

著者寸描

● 藤 栄治 (わらび えいじ)



筑波大学医学医療系講師。博士（農学）。

■略歴 1974年千葉県に生る。97年筑波大学第二学群生物学類卒業。2002年同大学院農学研究科応用生物化学専攻修了。同年東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学ラボラトリー研究員。04年筑波大学大学院人間総合科学研究科講師。

11年より現職。

■研究テーマと抱負 ストレスタンパク質の機能解析。特に酸化ストレス応答タンパク質の誘導の機序、機能と種々の疾患との関係。疾患の予防や治療法の開発に繋がるような生命システムを解明したい。

■趣味 スポーツ観戦、テニス。