

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	FARUK, Mohammad Omar
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第 1821 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
博士論文名	Phase-separated protein droplets of amyotrophic lateral sclerosis-associated p62/SQSTM1 mutants show reduced inner fluidity (筋萎縮性側索硬化症に関連する p62/SQSTM1 変異体が形成する相分離液滴は内部流動性が低下している)
論文審査委員	主査 教授 竹林 浩秀 副査 教授 藤井 雅寛 副査 准教授 中津 史

博士論文の要旨

背景) FUS、TDP-43、hnRNPA1 などの筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 関連タンパク質は、液-液相分離で形成される液滴から凝集体へ移行することが病態発症に深く関わる。SQSTM1/p62 (以降、p62 とする) は、ストレス誘導性のタンパク質であり、ユビキチン化タンパク質との相互作用を経て液滴を形成する。生じた p62 液滴では KEAP1 との相互作用領域 (KIR) に存在する 349 番目のセリン残基がリン酸化を受け、KEAP1 と強く結合する。その結果、KEAP1 は p62 液滴に隔離される。Cullin3 型ユビキチンリガーゼのアダプタータンパク質である KEAP1 との相互作用から逃れた NRF2 はユビキチン-プロテアソームによる分解を免れ、核内へ移行、生体防御遺伝子群の発現を活性化する。その後、p62 液滴がオートファジーで選択的に分解されると NRF2 の活性化は終結する。p62 液滴には、オートファゴソーム形成の上流因子である FIP200 が結合するとともに、LC3 相互作用領域 (LIR) を介して隔離膜の LC3 が相互作用する。これにより p62 液滴を選択的に取り囲んだオートファゴソームが形成される。すなわち、p62 は KEAP1 相互作用領域 (KIR) と LC3 相互作用領域 (LIR) を介して抗酸化ストレス応答とオートファゴソーム形成のプラットフォームとして機能している。筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭骨変性症 (FTD) 患者において p62 の LIR および KIR での点変異が複数同定されている。しかしながら、それらと病態発症の因果関係については不明である。

目的) 本研究では p62 の LIR および KIR のアミノ酸配列内で同定された ALS/FTD 疾患関連変異に焦点を当て、オートファジーやストレス応答の障害、および p62 液滴の動態と性質を詳細に解析し、病態発症の共通基盤となるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

方法) p62 の LIR および KIR の変異が与えるタンパク質間相互作用の影響を調べるため、(1) p62 変異体と LC3、ないしは KEAP1 からなる複合体の構造モデルを構築。(2) p62- KEAP1, p62-LC3, p62-FIP200 の相互作用を in vivo、および in vitro で解析するため、免疫沈降法と nanoBRET (生物発光共鳴エネルギー転移) アッセイ法を用いて検証。(3) p62 変異体の NRF2 活性化への影響を調べるため、アデノウイルスを介して p62 変異体を導入、強制発現させた細胞を用いて NRF2 の標的遺伝子の発現をリアルタイム PCR で評価。(4) Tet-On 発

現誘導システムを用いて p62 変異体のターンオーバー（オートファジー分解）を調査した。一方、p62 液滴の性質を精査するため、(5) p62 変異体が形成する液滴形態を共焦点定量イメージサイトメーターで解析。(6) p62 変異体が形成する液滴の流動性について FRAP (光退色後蛍光回復法) の手法を用いて調べた。

結果と考察) 本研究で申請者らが解析した p62 の ALS/FTD 疾患関連変異の一部は KEAP1、または LC3 との相互作用を欠失するため NRF2 活性化能の低下や p62 自身のターンオーバーの遅延を示していた。しかし、p62 が関与する KEAP1-NRF2 経路、ないしはオートファジーの障害は一部の変異に限定されたものであり、ALS/FTD 疾患関連変異の共通要素ではなかった。一方、FRAP アッセイにより、p62 変異体は液滴を形成する能力はあるものの、液滴内部の流動性低下が全ての変異体で認められた。以上の結果は、p62 変異による ALS/FTD の主因は、少なくとも選択的オートファジーや抗酸化ストレス応答の障害によるものではなく、むしろ他の ALS/FTD 疾患関連タンパク質と同様に、p62 液滴の質的变化に起因することを示している。長期にわたる p62 液滴の性質変化は、p62 液滴の機能障害と凝集体化を引き起こし細胞毒性に至ると予想される。この仮説は、酵母の選択的オートファジー基質であるアミノペプチダーゼ I の過度な凝集構造体がオートファゴソームへ取り込まれなくなること、さらに ALS/FTD 関連の点変異が p62 の液滴形成に関与する天然変性領域やユビキチン結合ドメインを含む遺伝子全体の領域で確認されていることから示唆されている。

審査結果の要旨

SQSTM1/p62 は、ストレス誘導性のタンパクであり、ユビキチン化タンパク質との相互作用を経て細胞内で液滴を形成する。複数の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 関連タンパクは、液-液相分離で形成される液滴から凝集体へ移行する過程に関わることで病態に関与することが知られている。また、ALS や前頭側頭型認知症 (FTD) 患者において p62 の点突然変異が複数同定されている。しかし、これらと神経病態の発症の因果関係については不明である。そこで本研究では、ALS/FTD 関連の p62 変異体を用いて、その結合因子 LC3 あるいは KEAP1 との複合体形成とそれらに続く p62 変異体のターンオーバー、KEAP1-NRF2 標的遺伝子の発現、さらに p62 液滴の形態や流動性についての多角的な解析を行った。その結果、今回解析した 9 種類の変異型 p62 の一部は、KEAP1 または LC3 との相互作用を欠失しており、NRF2 活性化やオートファジー障害を示した。しかし、これらは共通の機能欠失ではなかった。一方、p62 変異体は、液滴形成能はあるが、液滴内部の流動性の低下が全ての変異体で観察された。

本研究成果は、p62 変異による ALS/FTD 発症の主な要因は、選択的オートファジーや抗酸化ストレス応答の障害によるものではなく、他の ALS/FTD 関連タンパク質と同様に p62 液滴の質的变化によるものであることを示唆している点に新規性があり、学位論文としての価値を認める。