

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 永野 敦嗣  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 694 号  
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 during autophagy and under stress conditions in living cells.  
(Sqstm1-GFP ノックインマウスが明らかにした、オートファジーとストレス条件での Sqstm1 の動態)

論文審査委員 主査 教授 神吉 智丈  
副査 教授 成田 一衛  
副査 教授 福住 好恭

### 博士論文の要旨

【目的】Sqstm1/p62(以後、Sqstm1 と表記)遺伝子はオートファジーと関連し後生生物で高度に保存されている。Sqstm1 は、Phox1 and Bem1p (PB1) ドメイン, ジンクフィンガー (ZZ) ドメイン, TRAF6 結合 (TB) ドメイン, LC3 結合領域 (LIR), Keap1 結合領域 (KIR), そしてユビキチン会合 (UBA) ドメインなどさまざまなドメインを持っている。これらを介して、Sqstm1 は他の分子との相互作用を持つことで、シグナリングハブとしての役割や、ユビキチン化された物質を選択的オートファジーで分解するアダプター分子としての役割も担っている。また、Sqstm1 はストレス応答反応により、特に転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)により、その発現が調整されている。そのため、Sqstm1 の異常調節がシグナル伝達経路やタンパク質恒常性の異常を引き起こし、様々な疾患の要因となることが報告されている。周囲のストレスによる Sqstm1 の発現やオートファジーでの分解などが Sqstm1 のレベルに影響を与え、Sqstm1 の細胞内局在にも変化をもたらす。また Sqstm1 は自己凝集を起こす特徴を有するため、これまで Sqstm1 の動態と役割をはっきりと解析することは難しかった。

【方法】本研究では、Sqstm1 の C 末端に green fluorescence protein (GFP)を融合させたタンパク質 (Sqstm1-GFP)を発現するマウスを作製した。さらにマウスをかけあわせることで Sqstm1-GFPKI/+マウス、Sqstm1-GFPKI/KI マウスを作製した。これらと野生型マウスからマウス胎児線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts (MEFs))を取り出して、不死化することにより細胞レベルでの Sqstm1 の動態解析を行った。また、飢餓状態でオートファジーを誘導させたり、ヒ素暴露を行いストレス環境に置いたりして、Sqstm1 の解析を行った。さらに、Atg7f/f マウス、Albumin-Cre マウスなどとかけあわせ、肝臓器特異的オートファジー欠損マウスでの Sqstm1-GFP の解析を行った。

【結果】Sqstm1-GFPKI/+ マウスの MEF を用いて、生細胞での飢餓誘導オートファジーにおける細胞内 Sqstm1 の動態を初めて明らかにした。Sqstm1-GFP は細胞内の LC3 陽性の膜構造上の限局された部分に移行され、その多くはオートファゴソームのカップ状構造で囲まれた内側と関連しており、その結果として

Sqstm1 はオートファジーで分解された。飢餓に応じて出現する Sqstm1 陽性の構造体(オートファゴソーム)の持続時間は、LC3 陽性のオートファゴソームとほぼ同じ  $9.49 \pm 6.46$  min であった。さらに MEF を亜ヒ酸ナトリウム(As[III])に暴露させて、生細胞がストレス環境下に置かれると、その反応として Sqstm1-GFP の発現が促進され、Sqstm1-GFP が細胞質内に蓄積することで大きな凝集体を形成した。この凝集体は As[III] を除去すると、大きな凝集体が小さく分裂し、カップ状構造となり、消失していった。また、As[III] 暴露下で、Sqstm1 の Ser351 がリン酸化され、転写因子 Nrf2 のユビキチンリガーゼ複合体のアダプターである Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) との結合親和性が上がり、Nrf2 と Keap1 の相互作用を競合的に阻害することで、転写因子 Nrf2 の核内移行が促され、そのターゲットとなる遺伝子発現が促進させられた。Sqstm1-GFPKI/+マウスの肝臓で特異的にオートファジーを欠損させることで Sqstm1-GFP 陽性の凝集体が形成され、肝腫大、肝障害、Nrf2 のターゲット遺伝子の発現上昇が引き起こされた。

【まとめ】これらの結果から、Sqstm1-GFPKI/+ ノックインマウスは Sqstm1 の動態を生細胞とマウス個体において解析するために利用できるツールとなりえることを示している。

#### 審査結果の要旨

オートファジーは飢餓応答のみでなく、様々な生命現象や疾患に重要な役割を果たしている。Sqstm1/p62 は、シグナリングハブ、選択的オートファジーのアダプターで、Sqstm1 はストレス応答、特に転写因子 Nrf2 で、発現が調整され、その異常調節がシグナル伝達やタンパク質恒常性の異常を起し、疾患の原因となると考えられているが、Sqstm1 自体の発現変化、オートファジーでの分解、自己凝集能などで、解析が困難であった。

そこで申請者は、Sqstm1-GFP を持つマウスを作製し、その胎児線維芽細胞の Sqstm1 の動態を解析した。飢餓状態でオートファジーを誘導または、ヒ素暴露によりストレス応答反応を観察した。また肝臓器特異的オートファジー欠損マウスで解析した。

Sqstm1-GFPKI/+ MEF で、飢餓誘導オートファジーにおける Sqstm1 の動態を初めて明らかにした。飢餓に応じた GFP シグナル陽性構造体の持続時間は、 $9.49 \pm 6.46$  min であった。ヒ素暴露は Sqstm1-GFP の発現を促進し、蓄積して凝集体を形成した。またヒ素暴露は Nrf2 と Keap1 の相互作用を阻害し、Nrf2 の核内移行を観察できた。Sqstm1-GFPKI/+マウスの肝臓で特異的にオートファジーを欠損させると Sqstm1-GFP 陽性の凝集体ができ、肝腫大、肝障害、Nrf2 のターゲットの発現上昇を認めた。

以上より、Sqstm1-GFPKI/+マウスが、今まで解析が困難であった Sqstm1 の動態の解析に有用であることを示した点で、学位論文の価値があると判断した。