

運動によるミトファジーの活性化に対するp62の役割

名古屋市立大学 山田麻未
(共同研究者) 同 奥津光晴

The Role of p62/SQSTM1 in Exercise Training Induced-Mitophagy

by

Mami Yamada, Mitsuharu Okutsu
*Graduate school of Sciences,
Nagoya City University*

ABSTRACT

Regular exercise improves mitochondrial quality and quantity that contribute to maintain skeletal muscle homeostasis. Mitophagy, a mitochondrial quality control system by degradation of dysfunctional or superfluous mitochondria, is a major mechanism to maintain mitochondrial quality and quantity. Autophagy adaptor protein, p62/SQSTM1, regulates mitophagy and exercise increases p62 and phosphorylated p62 protein in muscle. However, role of p62 to control mitophagy in skeletal muscle is not well understood. In this study, we hypothesized that phosphorylated p62 induces mitophagy in skeletal muscle and contribute to maintain muscle homeostasis. Here, we demonstrated that regular exercise increases autophagy and mitophagy protein expression in oxidative soleus muscle. These autophagy and mitophagy protein expression in muscle specific-p62 knockout mice were consistent with the wild-type littermate mice. Muscle specific-p62 transgenic mice inhibited LC3-I and Pink1 proteins, on the other hand, increased Binip3 protein expression in compare to the wild-type littermate mice. These results suggest that p62 phosphorylation by gene transfer

induces mitophagy but not exercise-induced p62 phosphorylation in oxidative soleus muscle.

要 旨

定期的な運動は、ミトコンドリアの品質を向上することで筋量の維持に貢献する。ミトコンドリアの品質は、不要なミトコンドリアを分解するマイトファジーを活性化することで維持することができる。オートファジー基質として知られているp62/SQSTM1は、リン酸化することでユビキチン化した不要なミトコンドリアを認識し、オートファゴソームに移行させ分解するが、運動による骨格筋のマイトファジーの活性化に対するp62の役割について詳細に検討した報告は無い。そこで本研究では、運動によるマイトファジーの活性化に対するp62やリン酸化p62の役割の解明を目的とした。実験には、運動を負荷した筋特異的なp62欠損マウスと野生型同腹子マウスの骨格筋、筋特異的なp62発現増強マウスと野生型同腹子マウスの骨格筋を使用し、マイトファジーに関連する複数のタンパクの発現とミトコンドリアの量に関連するタンパクの発現を評価した。その結果、運動はp62のリン酸化を誘導したが、筋特異的p62欠損マウスでは運動によるマイトファジーの活性化に影響は及ぼさなかった。また、筋特異的p62発現増強マウスは複数のマイトファジー関連因子の発現が有意に変動した。これらの結果は、骨格筋のp62はマイトファジーを制御するが、運動によるマイトファジーの活性化には関与しない可能性を示唆している。

緒 言

心臓疾患、肥満や加齢は骨格筋の恒常性を破綻し筋の量と機能の低下(筋萎縮)を引き起こす¹⁻³⁾。ミトコンドリアは、骨格筋の恒常性維持に

貢献する重要な細胞内小器官である。疾患や加齢による筋萎縮はミトコンドリアの悪化が要因であることから、ミトコンドリアを正常に維持することで疾患や加齢による筋萎縮を軽減できる可能性がある。

ミトコンドリアを正常に維持する分子機構としてマイトファジーがあげられる。マイトファジーは、不要なミトコンドリアを分解する選択的オートファジーであり、この分子機構を調節することでミトコンドリアの品質を管理できる。代表的なマイトファジーの調節機構として、Parkin/PINK1経路とBNIP3経路があげられる。ParkinとPINK1は、マイトファジーを調節する主要なタンパクであるが、若年性のパーキンソン病発症の原因遺伝子としても知られている^{4,5)}。Parkin/PINK1経路では、膜電位が消失し機能が低下したミトコンドリアの外膜にPINK1が集積し、PINK1により活性化されたParkinがミトコンドリアに蓄積することで不要なミトコンドリアを分解する⁶⁾。骨格筋の恒常性維持においてもこれらのタンパクの重要性が報告されており、Parkinを欠損したマウスの骨格筋は、ミトコンドリアの機能が低下し筋萎縮を誘導する⁷⁾。一方、BNIP3経路は、Parkin/PINK1に依存しないマイトファジー経路として報告されており⁸⁾、BNIP3は低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor: HIF)の標的遺伝子としても知られている⁹⁾。BNIP3は、ミトコンドリアの外膜に発現している受容体であり、マイトファジー以外にもアポトーシスを制御する因子として知られており、BNIP3を欠損した細胞ではマイトファジーの他、アポトーシスも低下することが報告されている^{10,11)}。骨格筋のミトコンドリアの品質と量を調節する因子としてperoxisome proliferator-

activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) は広く知られているが、このPGC-1 α を筋特異的に増強したマウス骨格筋では、BNIP3の発現が有意に増加することが報告されており¹²⁾、このことはPGC-1 α によるミトコンドリアの品質の向上にもBNIP3が関与する可能性を示唆している。これらの報告を統合すると、Parkin/PINK1経路やBNIP3経路の活性化によるマイトファジーの促進は、骨格筋のミトコンドリアの品質を向上し筋萎縮を抑制する可能性がある。

定期的な運動はミトコンドリアの量や機能を向上し骨格筋の恒常性維持に貢献する。運動によるミトコンドリアの量や機能の向上には、マイトファジーの活性化が関与する可能性が報告されており、実際に運動はParkin/PINK1経路やBNIP3を活性化する^{13,14)}。しかしながら、運動がParkin/PINK1経路やBNIP3の活性化を誘導する分子機構は未だ不明な点が多い。そこで本研究ではp62/SQSTM1に着目した。p62は選択的オートファジーのアダプターとして知られており、リン酸化することでユビキチン化したタンパクに結合し、p62のUBAドメインを介してユビキチン化タンパクと結合しオートファジーにて分解する¹⁵⁾。近年、我々は運動が骨格筋のp62のリン酸化を促進することを報告しており¹⁶⁾、このことは運動による骨格筋のマイトファジーの誘導には、p62のリン酸化が関与する可能性が考えられる。

そこで本研究では、骨格筋のp62のリン酸化に着目し、筋特異的p62欠損マウスと筋特異的p62発現増強マウスを用い、運動による骨格筋のマイトファジーの活性化に対するp62のリン酸化の意義の立証を目的とする。

1. 方法

1. 1 実験動物

実験には、雄性C57BL/6マウス、8～12週齢の筋特異的p62欠損マウスと野生型同腹子マウス、
デサントスポーツ科学 Vol.43

筋特異的p62発現増強マウスと野生型同腹子マウスを使用した。マウスは、名古屋市立大学実験動物研究教育センターにて室温23℃、湿度50%、12時間の明暗サイクル(明期:8時～20時、暗期:20時～8時)の環境下にて飼育した。

1. 2 遺伝子組換えマウスの作成

筋特異的p62欠損マウスの作成は、組織特異的に標的遺伝子を欠損することが可能なcre-loxpシステムを使用して作成した。筋特異的p62欠損マウスの作成にはp62 floxマウスとmlc1f creを使用した。筋特異的p62発現増強マウスの作成は、筋クレアチニンキナーゼで(muscle creatine kinase: MCK)でp62を制御するプラスミドを用いて作成した。作成したそれぞれの遺伝子組換えマウスは、尾部よりDNAを抽出しPCRにて表現型を確認した後、ウェスタンブロットにてp62タンパクの発現変動を確認した後に解析に使用した(図1)。

1. 3 運動方法

マウスは、体重が均等になるよう筋特異的p62欠損マウスの安静群と運動群および野生型同腹子マウスの安静群と運動群の4群に分けた。運動群は、4週間の自発走行トレーニングを実施した。運動群は、トレーニング期間中の走行距離を測定し、運動量を十分に確認できたマウスのみを解析に使用した。安静群は運動群の運動期間が終了するまで通常飼育した。

1. 4 検体の採取

運動期間終了後、筋特異的p62欠損マウスと野生型同腹子マウスから実験に使用する検体を採取した。検体は運動期間最終日の一過性の運動の影響を取り除くため、運動期間最終日に自発走行システムをケージから取り除き、運動期間終了24時間後に採取した。マウスはイソフルラン麻酔下にて頸椎脱臼により安楽死させた後、運動筋優位な

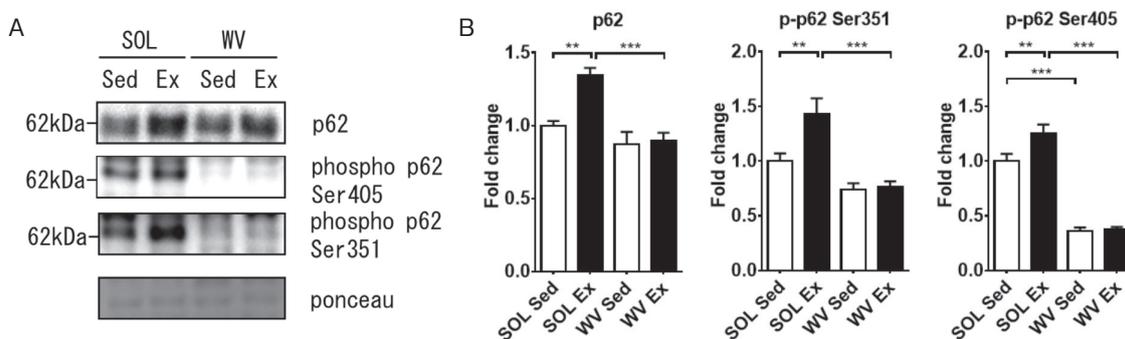


図1 運動によるヒラメ筋と白色広筋のp62とリン酸化p62タンパクの発現変動

A) ウェスタンブロットの代表的な撮影像。B) p62, phospho p62の変動。

SOL: ヒラメ筋, WV: 白色広筋, Sed: 安静群, Ex: 運動群, **P<0.01, ***P<0.001.

ヒラメ筋と速筋優位な白色広筋を採取した。筋特異的p62発現増強マウスと野生型同腹子マウスは、同様の方法で安楽死した後に足底筋を採取した。採取した骨格筋組織は液体窒素で素早く凍結し、実験に使用するまでの間-80℃で保存した。

1.5 タンパクの評価

タンパクは、ウェスタンブロットにて評価した。方法は、凍結保存したヒラメ筋、白色広筋と足底筋をタンパク抽出用の溶液に懸濁しタンパクを抽出した。抽出したタンパクはLowry法を用いてタンパク濃度を測定した。濃度を測定したタンパクはアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し分離し、PVDFメンブレンに転写した。メンブレンはponceau Sにて染色し、タンパクが適切に転写されていることを確認した。確認後、メンブレンは、p62 (P0067, sigma), phospho p62 Ser405 (D343-3M, MBL), phospho p62 Ser351 (PM074, MBL), LC3 (4108, CST), Parkin (sc-32282, santa cruz), PINK1 (BC100-494, Novus), BNIP3 (3769, CST), PGC-1 α (3242, Millipore), COX IV (4844, CST), MnSOD (ab13534, abcam) の一次抗体にて4℃で1晩反応させた。反応後、メンブレンをそれぞれの一次抗体に対応したhorseradish peroxidase標識の二次抗体と室温で1時間反応させた。反応後、メンブレンを化学発光検出試薬にて発色しイメージアナライザ (ImageQuant LAS

500, GE) で撮影し解析した。

1.6 統計

筋特異的p62欠損マウスおよび野生型同腹子マウスの安静群と運動群の骨格筋タンパクの発現の比較は2元配置分散分析を使用した。筋特異的p62発現増強マウスと野生型同腹子マウスの骨格筋タンパクの発現の比較は、対応のないT検定を使用した。有意水準は危険率5%未満とした。

2. 結果

2.1 運動によるp62のリン酸化の評価

4週間の自発運動トレーニングによる骨格筋のp62とp62のリン酸化をヒラメ筋と白色広筋で比較した。その結果、p62のリン酸化はヒラメ筋で有意に増加したが、白色広筋では増加しなかった(図2)。

2.2 筋特異的p62欠損マウスへの自発運動負荷に対するマイトファジーの評価

2.1において、p62の増加やリン酸化はヒラメ筋のみで有意に増加していたことから、p62はヒラメ筋のマイトファジーを制御する可能性がある。そこで本実験では、筋特異的p62欠損マウスと野生型同腹子マウスの安静群および運動群のヒラメ筋のマイトファジーとミトコンドリアに関連するタンパクの発現を評価した。その結

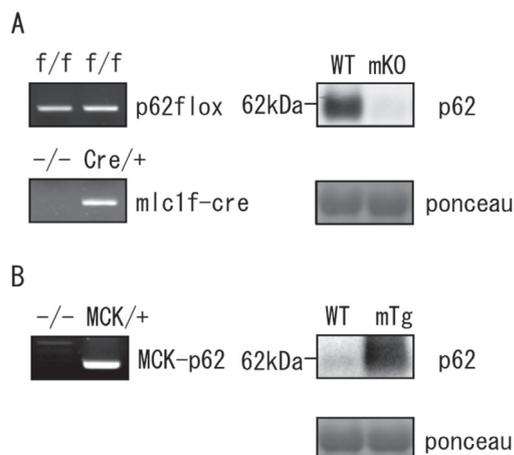


図2 遺伝子組換えマウスの遺伝子型決定および p62タンパクの発現

A) 筋特異的 p62欠損マウスの遺伝子型決定および p62タンパクの発現. B) 筋特異的 p62発現増強マウスの遺伝子型決定および p62タンパクの発現. WT: 野生型マウス, p62mKO: 筋特異的 p62欠損マウス, p62mTg: 筋特異的 p62発現増強マウス.

果, 筋特異的 p62欠損マウスのヒラメ筋は野生型マウスと比較してマイトファジーに関連するタンパクである BNIP3, PINK1や Parkin およびミトコンドリアの量や機能に関連する COX4, PGC-1 α や MnSOD の発現変動に有意な違いは観察されなかった (図3).

2. 3 筋特異的 p62 発現増強マウスのマイトファジーの評価

我々が作成した筋特異的 p62 発現増強マウスは p62 とリン酸化した p62 が増加している. そこで本実験では, 筋特異的 p62 発現増強マウスと野生型同腹子マウスの骨格筋のマイトファジーとミトコンドリアに関連するタンパクの発現を評価した. その結果, マイトファジーに関連する BNIP3

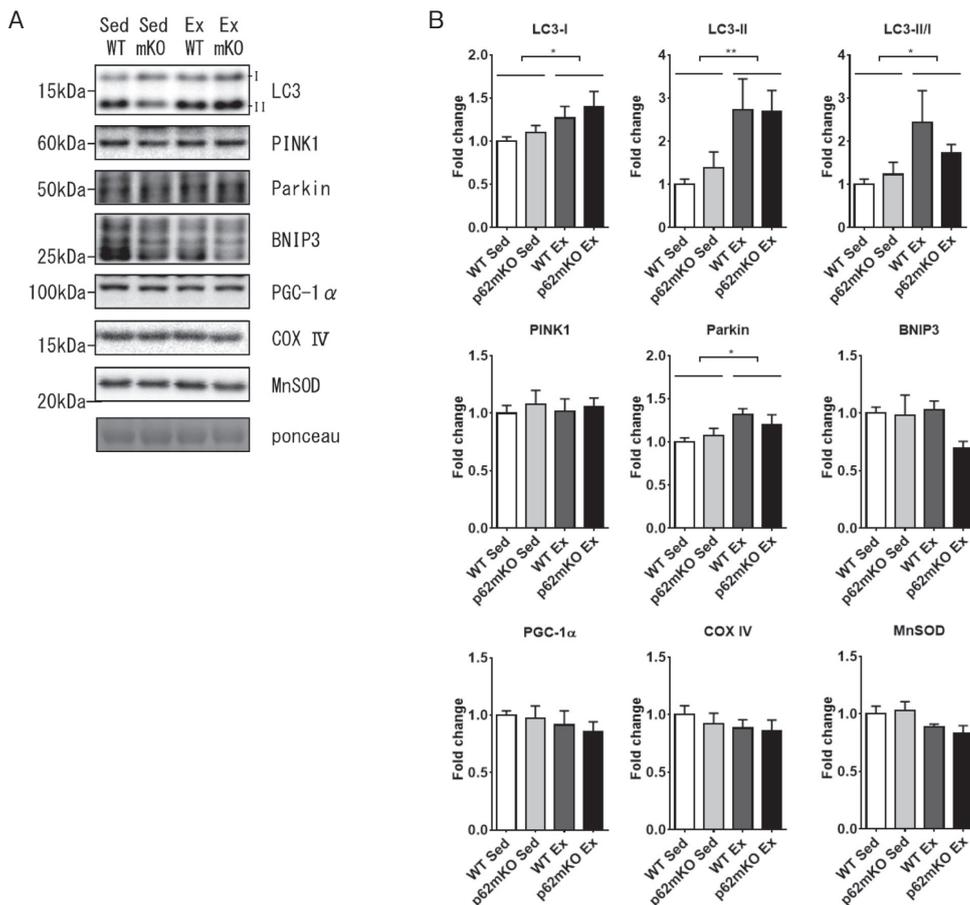


図3 運動によるヒラメ筋のマイトファジー関連タンパクの発現変動
A) ウェスタンブロットの代表的な撮影像. B) マイトファジー関連タンパクの変動. *P<0.05, **P<0.01.

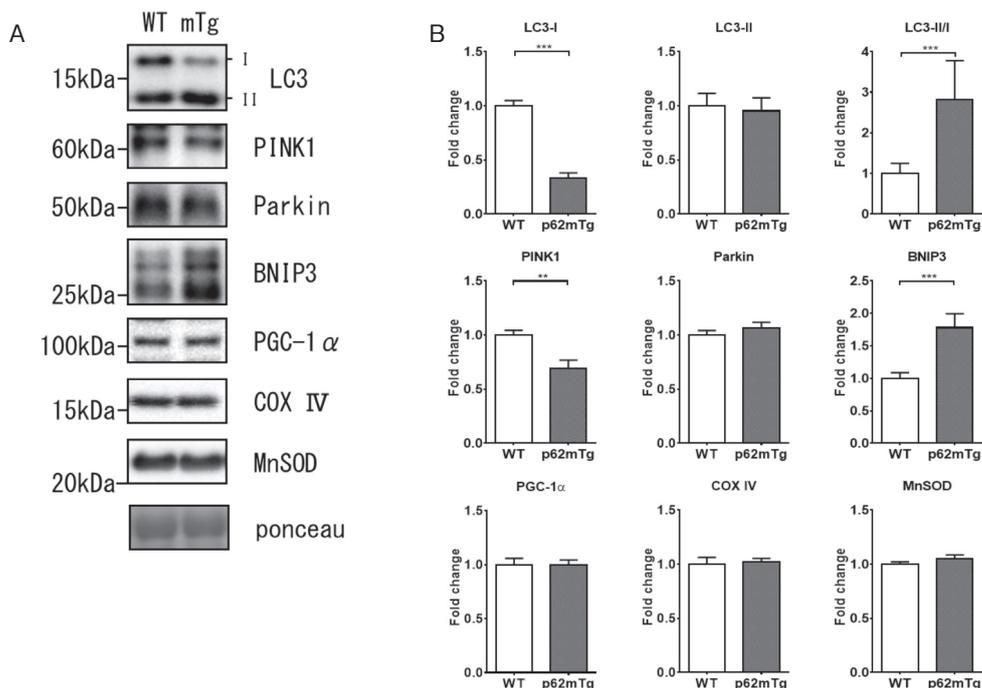


図4 筋特異的p62発現増強マウスのミトファジー関連タンパクの発現
A) ウェスタンブロットの代表的な撮影像. B) ミトファジー関連タンパクの変動. **P<0.01, ***P<0.001.

は野生型マウスに比べてp62発現増強マウスで有意に高く、PINK1は有意に低かった。ミトコンドリアの量や機能に関連するタンパクの発現に違いは無かった(図4)。

3. 考察

本研究では、運動による骨格筋のミトファジーの活性化はオートファジー基質であるp62がリン酸化することで制御すると仮説を立て、研究を遂行した。この仮説を立証するため、筋特異的p62欠損マウスと筋特異的p62発現増強マウスを作成し、ミトファジーの活性化に対する骨格筋のp62とp62のリン酸化の役割の検討した。その結果、p62欠損マウスを用いた検討では、複数のミトファジーに関連するタンパクの発現を評価したが、野生型マウスと比較して有意な違いは観察されなかった。また、筋特異的p62発現増強マウスを用いた検討では、LC3-1の有意な減少、BNIP3の有意な増加とPINK1の有意な減少

が観察された。ミトコンドリアの量は筋特異的p62欠損マウスと筋特異的p62発現増強マウスともに野生型マウスと比較して有意な違いは観察されなかった。先行研究では、オートファジー基質として知られているp62がミトファジーを制御することが報告されているが¹⁷⁾、骨格筋におけるミトファジーに対するp62の役割や運動によるミトファジーに対するp62の役割をgain-of-functionとloss-of-functionを用いて検証した報告は無い。これらの成果は、骨格筋におけるp62を増加あるいは活性化することでミトファジーを制御できる可能性を示唆している。

我々は、運動がヒラメ筋のp62の増加とリン酸化を誘導することを報告している¹⁶⁾。この結果は、骨格筋のp62はヒラメ筋のミトファジーの活性を制御する可能性を示唆している。そこで本研究では、p62のリン酸化が誘導されるヒラメ筋を用いて複数のミトファジー関連因子やミトコンドリアの合成関連因子を測定した。その結果、

骨格筋のp62を欠損してもヒラメ筋のミトファジーは抑制されなかった。この結果は、運動によるヒラメ筋のp62のリン酸化は、ミトファジーの活性化やミトコンドリアの合成機構の制御には直接的には関与しないことを示唆している。重要なこととして、運動による骨格筋の適応は遅筋よりも速筋で顕著に観察されることが多い。実際に、4週間の自発走行運動を実施したマウスの遅筋と速筋が混在した足底筋では、ミトファジー関連因子やミトコンドリア合成関連因子の有意な増加が報告されている^{13, 14)}。したがって今後、足底筋や腓腹筋などの速筋線維を含む運動の主導筋を使用し、p62のミトファジーへの影響を確認する必要がある。

筋特異的p62欠損マウスを用いた検討では、ミトファジーの活性に有意な違いは見られなかった。しかしながら、恒常的にp62のリン酸化が高く誘導されているマウスでは、ミトファジー活性に変動がある可能性がある。そこで筋特異的p62発現増強マウスを用いて検討を行った。その結果、オートファジータンパクであるLC3の発現が変動していた。LC3は、LIRドメインを介してp62と結合することが知られている代表的なオートファジータンパクである。また近年では、p62のリン酸がLC3との結合に重要であることも報告されている¹⁵⁾。本研究では、LC3-Iの発現に有意な違いを確認したが、オートファジーの活性化の指標であるLC-IIは野生型マウスとp62発現増強マウスの間に違いはなく、結果的にLC3-II/Iの値はp62発現増強マウスの方が野生型マウスに比べて有意に増加しており、p62の増加はオートファジーの活性が高まる結果を示唆している。しかしながら、LC3-Iは不要なタンパク質やミトコンドリアを分解する際のオートファゴソームの形成に重要である。したがって、p62の発現を増強したマウスではPB1ドメインを介してすでにp62の凝集体が形成されているが、これらを分解するため

のオートファゴソームの形成能が低下している可能性もある。今後、バフィロマイシンやクロロクリンなどを用いてオートファゴソームの形成能を評価するフラックスアッセイを行い検証する必要がある。

PINK1は、ミトコンドリアに局在する酵素であり、ユビキチンタンパクのリン酸化を介してParkinを活性化するために必須な因子である。これまでp62は、ユビキチン化したタンパク質に集積し、これらのタンパク質をオートファゴソームに移行させる機能が報告されているが¹⁵⁾、p62がPINK1やParkinの発現を制御している報告は少ない¹⁷⁾。そこでp62発現増強マウスを用いて検討を行ったところ、p62発現増強マウスはPINK1の発現量を減少したが、Parkinの発現は変動しなかった。これらの結果は、p62の増加や恒常的な活性化はPINK1の発現を抑制し、Parkinの活性化を抑制することでParkinのミトコンドリアへの移行を阻害し、ミトファジーを阻害している可能性がある。今後は、ミトファジーの誘導に重要であるPINK1のリン酸化の評価や筋ミトコンドリアのParkinの発現を評価する必要がある。

BNIP3は、ミトコンドリアの外膜に発現するミトファジーの受容体タンパクである。p62発現増強マウスの骨格筋では、BNIP3の発現が有意に増加していた。この結果は、p62が受容体であるBNIP3を増加することでミトファジーを促進している可能性を示唆している。一方で、BNIP3は上述したようにHIFの標的遺伝子としても知られていることから、p62が直接的にBNIP3の発現を制御するのではなく、HIFを介してBNIP3の発現を調節している可能性も考えられる。またBNIP3はリン酸化することでLC3との相互作用が向上することが報告されていることから¹⁸⁾、今後はリン酸化の評価も必要である。

PGC-1 α は、ミトコンドリアの恒常性を維持するために極めて重要な因子として報告されている

19). PGC-1 α を増強したマウスの骨格筋では、ミトコンドリアの機能が向上し筋機能の維持に貢献することがすでに報告されている²⁰⁾. そこで、p62発現増強マウスがPGC-1 α を介してミトコンドリアの品質を管理しているか確認した. その結果、p62はPGC-1 α の発現に違いは無かった. その後の研究では、PINK1がPGC-1 α の発現を制御し、ミトコンドリアの機能維持に貢献することが報告されている²¹⁾. p62発現増強マウスでは、PINK1の発現を有意に減少したがPGC-1 α の発現は変わらなかった. これらの結果は、p62はミトコンドリアの生合成や代謝機能の改善に対する制御機能は無く、ミトコンドリアの分解機構を制御して筋ミトコンドリアの恒常性を維持している可能性が高い. 実際に、COX IVを測定したが発現に違いは見られていないことも一つの要因である.

本研究では、オートファジー基質であるp62の増加やリン酸化に着目しマイトファジーの活性化を評価した. その結果、複数のマイトファジー関連因子の有意な増減を確認した. しかしながら、現時点ではこれらの違いがマイトファジーの活性化を立証するものではない. 今後は、筋管細胞へp62プラスミドを導入し、JC-1色素やCCCP処理など複数の解析を用いてp62の発現増強によるこれらの因子の増減がマイトファジーを制御しているのか詳細に検討を進める必要がある.

これらの実験から得られた成果は、筋ミトコンドリアの新たな品質向上機構の解明に繋がり、新しい運動療法の立案や医薬品の開発が期待できる.

4. 結 論

骨格筋のp62の恒常的な活性化は、マイトファジーの活性化を制御する可能性が示唆された.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます.

また、筋特異的p62欠損マウスの作成にあたり、p62floxマウスを供与頂きました筑波大学 蕨栄治先生、mlc1f creマウスを供与頂きましたNew York City University Medical CenterのSteven Burden先生、筋特異的p62発現増強マウスを作成頂きました名古屋市立大学医学研究科大石久史先生に深く感謝申し上げます.

文 献

- 1) von Haehling S., Ebner N., Dos Santos M. R., Springer J., Anker, S. D., Muscle wasting and cachexia in heart failure: mechanisms and therapies., *Nat. Rev. Cardiol.*, **14**, 323-341 (2017)
- 2) Perry B. D., Caldwell M. K., Brennan-Speranza T. C., Sbaraglia M., Jerums G., Garnham A., Wong C., Levinger P., Asrar Ul Haq M., Hare D. L., Price S. R., Levinger I., Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise., *Exerc. Immunol. Rev.*, **22**, 94-109 (2016)
- 3) Bowen T. S., Schuler G., Adams V., Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training., *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **6**, 197-207 (2015)
- 4) Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N., Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism., *Nature*, **392**, 605-608 (1998)
- 5) Valente E. M., Abou-Sleiman P. M., Caputo V., Muqit M. M., Harvey K., Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A. R., Healy D. G., Albanese A., Nussbaum R., Gonzalez-Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Gilks W. P., Latchman D. S., Harvey R. J., Dallapiccola B., Auburger G., Wood N. W., Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1., *Science*, **304**, 1158-1160 (2004)

- 6) Koyano F., Okatsu K., Kosako H., Tamura Y., Go E., Kimura M., Kimura Y., Tsuchiya H., Yoshihara H., Hirokawa T., Endo T., Fon E. A., Trempe J. F., Saeki Y., Tanaka K., Matsuda N., Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin., *Nature*, **510**, 162-166 (2014)
- 7) Peker N., Donipadi V., Sharma M., McFarlane C., Kambadur R., Loss of Parkin impairs mitochondrial function and leads to muscle atrophy., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **315**, C164-C185 (2018)
- 8) Zhang J., Ney P. A., Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy., *Cell Death Differ.*, **16**, 939-946 (2009)
- 9) Bruick R. K., Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 9082-9087 (2000)
- 10) Tang C., Han H., Liu Z., Liu Y., Yin L., Cai J., He L., Liu Y., Chen G., Zhang Z., Yin X. M., Dong Z., Activation of BNIP3-mediated mitophagy protects against renal ischemia-reperfusion injury., *Cell Death Dis.*, **10**, 677 (2019)
- 11) Choi G. E., Lee H. J., Chae C. W., Cho J. H., Jung Y. H., Kim J. S., Kim S. Y., Lim J. R., Han H. J., BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against glucocorticoid-induced synapse defects., *Nat. Commun.*, **12**, 487 (2021)
- 12) Lira V. A., Okutsu M., Zhang M., Greene N. P., Laker R. C., Breen D. S., Hoehn K. L., Yan Z., Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance., *FASEB J.*, **27**, 4184-4193 (2013)
- 13) Grumati P., Coletto L., Schiavinato A., Castagnaro S., Bertaglia E., Sandri M., Bonaldo P., Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles., *Autophagy*, **7**, 1415-1423 (2011)
- 14) Greene N. P., Lee D. E., Brown J. L., Rosa M. E., Brown L. A., Perry R. A., Henry J. N., Washington T. A., Mitochondrial quality control, promoted by PGC-1alpha, is dysregulated by Western diet-induced obesity and partially restored by moderate physical activity in mice., *Physiol. Rep.*, **3** (2015)
- 15) Matsumoto G., Wada K., Okuno M., Kurosawa M., Nukina N., Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins., *Mol. Cell*, **44**, 279-289 (2011)
- 16) Yamada M., Iwata M., Warabi E., Oishi H., Lira V. A., Okutsu M., p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle., *FASEB J.*, **33**, 8022-8032 (2019)
- 17) Geisler S., Holmstrom K. M., Skujat D., Fiesel F. C., Rothfuss O. C., Kahle P. J., Springer W., PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1., *Nat. Cell Biol.*, **12**, 119-131 (2010)
- 18) Zhu Y., Massen S., Terenzio M., Lang V., Chen-Lindner S., Eils R., Novak I., Dikic I., Hamacher-Brady A., Brady N. R., Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis., *J. Biol. Chem.*, **288**, 1099-1113 (2013)
- 19) Wu Z., Puigserver P., Andersson U., Zhang C., Adelmant G., Mootha V., Troy A., Cinti S., Lowell B., Scarpulla R. C., Spiegelman B. M., Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1., *Cell*, **98**, 115-124 (1999)
- 20) Wenz T., Rossi S. G., Rotundo R. L., Spiegelman B. M., Moraes C. T., Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 20405-20410 (2009)
- 21) Choi J., Ravipati A., Nimmagadda V., Schubert M., Castellani R. J., Russell J. W., Potential roles of PINK1 for increased PGC-1alpha-mediated mitochondrial fatty acid oxidation and their associations with Alzheimer disease and diabetes., *Mitochondrion*, **18**, 41-48 (2014)