

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07380

研究課題名(和文) リソソームアミノ酸輸送体Spns1によるmTORC1およびオートファジー制御

研究課題名(英文) Regulation of mTORC1 and autophagy by the lysosomal amino acid transporter Spns1

研究代表者

葛城 美德 (Katsuragi, Yoshinori)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60401759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： オートファジーで得た産物を細胞質に供給する仕組みは不明な点が多く、我々はSpns1が、この役割に關与することを示す以下の結果を得た。すなわち、(1) Spns1がリソソーム膜に局在し、オートファジー回復期のmTORC1の再活性化に必要であり、(2) Spns1の肝臓特異的欠損マウスでは肝臓の炎症や肝肥大を伴い、この肝細胞内で異常オートファジーに特徴的なp62の蓄積等を認めた。さらに、(3)メタボローム解析を行った上で、Spns1の輸送基質同定を試みた。  
p62によるユビキチン化蛋白質凝集や、ストレス顆粒の形成にUSP10やG3BP1が關与し、いくつかの神経変性疾患に關与することを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞生物学および実験動物病理的な結果から、Spns1がオートファジーに關与することを強く示唆する結果を示した。また、本研究で作成したSpns1KOマウスやfloxマウスは、有用な研究リソースとなりうる。USP10やp62がどのようにして神経変性疾患(パーキンソン病やアルツハイマー病)に關与するのかはまだよくわかっていない。USP10に注目しているのはほぼ当グループのみで、先行研究はない。さらにUSP10やp62などの働きに注目して研究を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)： The mechanism of supplying the product obtained by autophagy to the cytoplasm is not well understood. We have found that Spns1 is involved in this role as below. (1) Spns1 is localized in the lysosomal membrane and is required for reactivation of mTORC1 during autophagy recovery. (2) liver-specific Spns1-KO mice showed liver inflammation and liver hypertrophy, and p62-accumulated autolysosome-like structures, which is characteristic of abnormal autophagy. Furthermore, (3) we attempted to identify the transport substrate of Spns1, which was inferred from metabolome analysis of Spns1-cKO mice.

We also reported that USP10 and G3BP1 are involved in the formation of ubiquitinated protein aggregates by p62 and are involved in several neurodegenerative diseases.

研究分野：細胞生物学、がん

キーワード：オートファジー トランスポーター p62 Spns1 マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーによって生じたアミノ酸などの自己消化産物は、リソソームから各種トランスポーターを介して細胞質に供給される。しかし、リソソームから細胞質へのアミノ酸輸送の分子メカニズムや、その後のアミノ酸の運命はほとんど分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

我々は、リソソーム膜に存在するトランスポーター Spns1 が特定のアミノ酸と強い親和性を持つこと、Spns1 の欠損により mTORC1 の活性が著しく減弱することを見出した。本課題では、Spns1 の輸送基質を決定し、Spns1 による mTORC1 制御機構の解明を目指すとともに、Spns1 遺伝子改変細胞およびマウスを駆使して、Spns1 を介した細胞質への輸送基質の生理的意義の検証を目指した。

### 3. 研究の方法

単離リソソームを用いた解析: Spns1 欠損細胞ではリソソーム内に Spns1 輸送基質の顕著な蓄積が起きていると推測される。そこで、一晩絶食した野生型および肝臓特異的 Spns1 欠損マウスの肝臓から密度勾配遠心によりオートリソソームを精製し、アミノ酸分析およびメタボローム解析を用いてリソソーム内の各種アミノ酸量や代謝産物の蓄積傾向を調べた。さらに、Spns1 欠損がリソソーム活性に影響を与えている可能性もあるため、肝臓から精製したリソソームないしオートリソソームの活性(カテプシン活性)も調べた。Spns1 の基質同定とその輸送活性の検証と Spns1 の構造解析: 応募者は HEK293 系で大量に Spns1 タンパク質を精製する系を確立し、この系を用いてその輸送基質の同定および活性の定量、さらに Spns1 の X 線構造解析を試みた。Spns1 の基質同定実験には、人工脂質二重膜であるリポソームに精製 Spns1 を組み込んだ無細胞完全再構成系を用いた。このプロテオリポソームに、放射性標識した輸送基質候補アミノ酸や候補輸送基質を添加し、ベシクル内に移行できるか否かを調べた。Spns1 による mTORC1 活性制御機構: 質量分析により、Spns1 結合タンパク質として mTORC1 関連因子を同定した。さらにアミノ酸飢餓オートファジー後の mTORC1 再活性化に Spns1 が必要であったことから Spns1 による mTORC1 活性制御機構の解明を試みようとした。

### 4. 研究成果

単離リソソームを用いた解析: 肝臓特異的 Spns1 欠損マウスの肝臓は肝炎や肝肥大を示し、電子顕微鏡像における高電子密度構造体や免疫染色像での高度な p62 陽性凝集体検出から、オートファジー異常が強く示唆された。Spns1 の輸送基質は、このような肝臓や肝細胞のリソソームないしオートリソソーム分画に蓄積することが予想されたので、蓄積アミノ酸の有無だけでなく、網羅的なメタボローム解析も行なった(未発表)。また、精製リソソームをもちいたカテプシンアッセイの結果から、Spns1 欠損が肝臓リソソームの活性低下をもたらしていることを明らかにした。Spns1 の基質同定とその輸送活性の検証と Spns1 の構造解析: 精製 Spns1 タンパク質を組み込んだプロテオリポソームを作成し、メタボローム解析から類推された代謝産物や複数のアミノ酸を同位体標識し、ベシクル内に取り込むことができるかを調べた。SPA(Scintillation proximity assay)により強く Spns1 と結合していたアミノ酸 X だけでなく、候補としてこれまで実験を行なった代謝産物のいずれも、プロテオリポソームへの取り込みは

確認できなかった。結晶構造解析については、現在条件を検討中である。

以上のように、Spns1の基質同定が困難であったため、我々はp62凝集の制御への関与が示唆されていたUSP10(Ubiquitin specific protease 10)の解析にも取り組んだ。細胞はプロテアソーム阻害剤やROSに晒されると、ストレス顆粒(stress granules, SG)や、p62を介したユビキチン化タンパク質の大きな凝集体(アグリソーム)を形成する。アグリソームへと移行したタンパク質は、通常はオートファジーによって分解される。我々は、USP10がSG形成に関与し、さらに、p62とともにその後のアグリソームへの移行に関与することを報告した。アグリソームはパーキンソン病のレビー小体と同様の構造体と考えられており、実際の病変部でもUSP10のレビー小体への局在を認めた。さらに、USP10はアルツハイマー病における蓄積が顕著なTauなどの凝集性タンパク質の制御に関わることも報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi Masahiko, Kitaura Hiroki, Kakita Akiyoshi, Kakihana Taichi, Katsuragi Yoshinori, Nameta Masaaki, Zhang Lu, Iwakura Yuriko, Nawa Hiroyuki, Higuchi Masaya, Komatsu Masaaki, Fujii Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 USP10 Is a Driver of Ubiquitinated Protein Aggregation and Aggresome Formation to Inhibit Apoptosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 433 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Anisimov Sergei, Takahashi Masahiko, Kakihana Taichi, Katsuragi Yoshinori, Kitaura Hiroki, Zhang Lu, Kakita Akiyoshi, Fujii Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 G3BP1 inhibits ubiquitinated protein aggregations induced by p62 and USP10	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-019-46237-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Piatnitskaia Svetlana, Takahashi Masahiko, Kitaura Hiroki, Katsuragi Yoshinori, Kakihana Taichi, Zhang Lu, Kakita Akiyoshi, Iwakura Yuriko, Nawa Hiroyuki, Miura Takeshi, Ikeuchi Takeshi, Hara Toshifumi, Fujii Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 USP10 is a critical factor for Tau-positive stress granule formation in neuronal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-019-47033-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

パーキンソン病において神経病源性蛋白質を不活化する蛋白質を同定  
[https://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/info/news\\_topics/93\\_index.html](https://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/info/news_topics/93_index.html)

アルツハイマー病の原因蛋白質タウの凝集体形成を開始させる分子を同定  
<https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2019/07/re010724.pdf>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永森 收志  (Nagamori Shushi)  (90467572)	奈良県立医科大学・医学部・教授    (24601)	