

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15464

研究課題名(和文) リソソーム分布制御に基づく新規オートファジー誘導機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanisms on autophagy based on the lysosomal distribution.

研究代表者

笹澤 有紀子 (Sasazawa, Yukiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20594922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)は異常タンパク質蓄積を伴う神経細胞死を特徴とする神経変性疾患であり、根本的な治療法の解明が切望されている。その治療標的として注目されているのが、タンパク質分解系の一つであるオートファジーである。我々はPD患者血清中代謝産物を網羅的に解析し、ポリアミン代謝変動を見出した。さらに、ポリアミンを細胞に処理するとリソソームが核近傍に移動しオートファジーが誘導されることを見出した。そのメカニズムを解析した結果、カルモジュリンキナーゼにより、タンパク質Xがリン酸化されることでリソソーム分布が変化し、オートファゴソーム-リソソームの融合が促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果はリソソーム分布制御、リソソーム-オートファゴソームの融合促進に関わる新しい経路を提示するものである。近年、オートファジーは神経変性疾患だけでなくがんや糖尿病、炎症性腸疾患など、様々な病気に関与することが報告され治療薬開発の標的として注目されているが、実際にオートファジーの経路を特異的に調節する薬剤は少ない。本経路はこれらのオートファジー関連疾患の治療薬開発のための新しいアプローチを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We recently reported that polyamine metabolism was significantly altered in the serum of Parkinson's disease patients. To understand its significance, we analyzed the cellular response of polyamine in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. We showed that treatment with polyamine changed the lysosomal distribution toward the perinuclear region, and promoted autophagosome-lysosome fusion. Knockdown experiments revealed that one protein X mediated lysosomal distribution change in polyamine-treated cells. Moreover, protein X was phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in polyamine-treated cells. These data indicated that phosphorylation of protein X is a novel regulatory mechanisms on the lysosomal distribution change.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー リソソーム 細胞内分布 メンブレントラフィック

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マクロオートファジー(以下オートファジー)は、大規模な細胞内のタンパク質やオルガネラの分解経路であり、細胞の恒常性維持に極めて重要である。まずオートファゴソームで細胞内の一部が隔離され、リソソームと融合することで内部のタンパク質・オルガネラが分解される。異常タンパク質の蓄積を特徴とするパーキンソン病(PD)の治療標的として近年オートファジーが着目されている。

オートファジーの分子機構として、Atgタンパク質群等によるオートファゴソームの形成制御が報告されているが、近年、リソソームの核周囲への局在によっても制御されることが明らかとなった。栄養飢餓等の刺激によりリソソームが核周辺に集まることで①mTORC1抑制を介したオートファゴソーム形成促進、②リソソームとオートファゴソームの会合機会の増加によるオートリソソーム形成が促進されることが報告された(図1; Nat Cell Biol 13:453-60, 2011)。本報告がなされて以来、リソソーム分布制御機構解析が盛んに行われている。逆行輸送に関わる分子としては転写因子TFEB下流で、リソソームCa<sup>2+</sup>チャネルであるTRPML1-ALG2を介した経路(Nat Cell Biol. 18:404-17, 2016)、同じくTFEB下流でリソソーム膜タンパク質TMEM55B-JIP4(Nat Commun 8:1580, 2017)を介した経路が明らかになっている。また、Rab7-RILPを介した逆行輸送(J Cell Biol 176:459-471, 2007)、BORC-ARL8を介した順行輸送(Dev Cell 33: 176-188, 2015)が報告されている。このようにリソソーム分布制御機構が徐々に明らかになりつつあるが、これらのシグナルの上流因子、それらを制御する化合物等は報告されておらず、詳細は未解明な点が多い。

### 2. 研究の目的

申請者はリソソーム分布を制御する条件として、ポリアミンの添加を見出しており、これらの薬剤の作用機序を解明すれば細胞内のリソソーム分布制御機構の一端を解明できると考え、本研究では上述の考えのもと、ポリアミン添加によるリソソーム分布制御機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

リソソーム分布はLAMP2抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察し評価した。ノックダウン実験はSigma-Aldrich社より購入したsiRNAをLipofectamine RNAiMax(Thermo Scientific)を用いて遺伝子導入し、48時間後に実験に用いた。ノックアウト細胞はCRISPR/Cas9システムを用い、CRISPR/Cas9プラスミドとHDRプラスミド(Santa Cruz)を導入し、Puromycinでセレクションを行いクローン化することで樹立した。

### 4. 研究成果

#### (1) 様々な細胞におけるポリアミン添加によるオートファジー活性評価

神経芽腫SK-N-SH細胞、IMR-32細胞、NB-1細胞、SH-SY5Y細胞、ラット初代培養神経細胞、ヒトiPS由来神経細胞、その他の臓器由来の細胞として、HeLa細胞、Lovo細胞、HepG2細胞、HCT116細胞、HUVEC、U2OS細胞を用いて、ポリアミンの一つであるスペルミン添加によるオートファジー誘導活性を評価した。その結果、図1に示すように、神経由来細胞で顕著にオートファジーが誘導されることが明らかとなった。

#### (2) ノックダウン実験によるリソソーム分布変化に関与するタンパク質の特定

これまでにリソソーム分布変化やオルガネラの輸送に関与することが報告されている様々な分子をノックダウンし、ポリアミン添加によるリソソーム分布変化に関与する分子を探索した。その結果Protein Xのノックダウンにより顕著にポリアミン添加によるリソソーム分布変化がキャンセルされることを見出した。そこでCRISPR/Cas9システムによりProtein Xのノックアウト

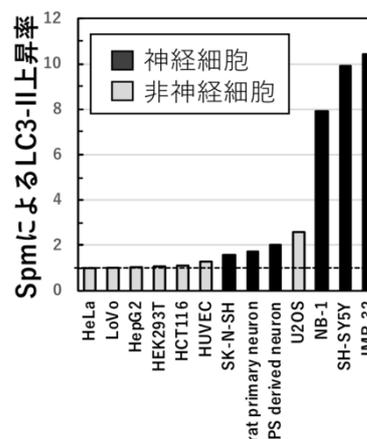


図1 様々な細胞種におけるスペルミン添加によるLC3-IIの変化

(KO)細胞を樹立し、KO細胞ではポリアミン添加してもリソソーム分布が変化しないことを確認した。(図2)

### (2) Protein X のリン酸化の検出

SDS-PAGE を行うとポリアミンの添加により Protein A がバンドシフトすることに着目し、Protein X の翻訳後修飾に着目した。Phostag Page で顕著にバンドシフトが観察されること、Lysate を  $\lambda$ Phosphatase 処理をすることでバンドシフトがキャンセルされたことから、Protein X はポリアミン添加によりリン酸化されていることが明らかとなった。

### (3) Protein X のリン酸化酵素の同定

Protein X のリン酸化がリソソーム分布変化活性に必要か否かを明らかにするために、Kinase inhibitor library を用いてポリアミン添加によるリソソーム分布変化をキャンセルするキナーゼ阻害剤を探索した。数種のキナーゼ阻害剤がポリアミンによるリソソーム分布変化を阻害したが、Mindy I Davis らの報告 (*Nat. Biotechnol.* 29, 1046-1051 (2011)) を参考に、それらの共通標的としてカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼの関与を見出した。実際、本キナーゼのノックダウン時にはポリアミン添加によるリソソーム分布変化がキャンセルされ(図3)、さらに Protein X のリン酸化もキャンセルされた。

また、カルシウムキレーターである BAPTA-AM を処理するとポリアミンによるリソソーム分布変化がキャンセルされたことからカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼの関与が強く示唆された(図4)。

以上の結果よりカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼによる Protein X のリン酸化がリソソーム分布変化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

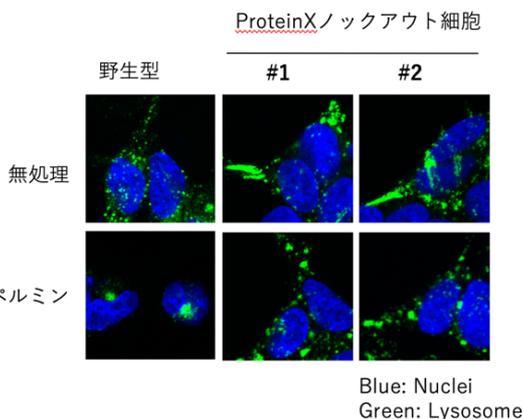


図2 各条件におけるリソソーム分布

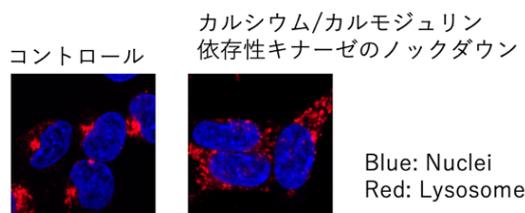


図3 スベルミン添加時のリソソーム分布

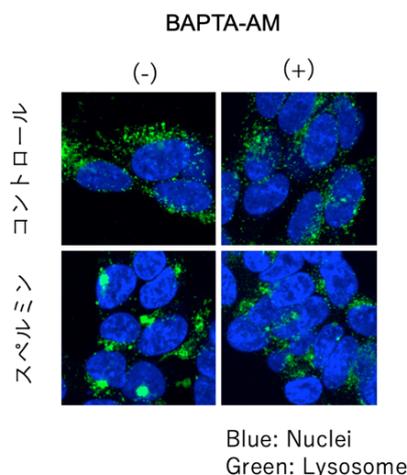


図4 カルシウムキレーターがリソソーム分布に与える影響

今後は、質量分析により Protein X のリン酸化部位の同定、Protein X と相互作用するタンパク質の同定を行い、シグナルの詳細を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Otani K, Niwa Y, Suzuki T, Sato N, Sasazawa Y, Dohmae N, Simizu S.	4. 巻 498
2. 論文標題 Regulation of granulocyte colony-stimulating factor receptor-mediated granulocytic differentiation by C-mannosylation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 466-472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.02.210.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 笹澤有紀子、斉木臣二、井本正哉	4. 巻 35
2. 論文標題 パーキンソン病治療薬の開発展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saiki S, Sasazawa Y, Fujimaki M, Kamagata K, Kaga N, Taka H, Li Y, Souma S, Hatano T, Imamichi Y, Furuya N, Mori A, Oji Y, Ueno SI, Nojiri S, Miura Y, Ueno T, Funayama M, Aoki S, Hattori N.	4. 巻 86
2. 論文標題 A metabolic profile of polyamines in parkinson disease: A promising biomarker.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Neurol.	6. 最初と最後の頁 251-263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ana.25516.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otake K, Yamada K, Miura K, Sasazawa Y, Miyazaki S, Niwa Y, Ogura A, Takao KI, Simizu S.	4. 巻 27
2. 論文標題 Identification of topoisomerases as molecular targets of cytosporolide C and its analog.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem. 3334	6. 最初と最後の頁 3334-3338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2019.06.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirano K, Fujimaki M, Sasazawa Y, Yamaguchi A, Ishikawa KI, Miyamoto K, Souma S, Furuya N, Imamichi Y, Yamada D, Saya H, Akamatsu W, Saiki S, Hattori N.	4. 巻 518
2. 論文標題 Neuroprotective effects of memantine via enhancement of autophagy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 161-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kataura T, Saiki S, Ishikawa KI, Akamatsu W, Sasazawa Y, Hattori N, Imoto M.	4. 巻 -
2. 論文標題 BRUP-1, an intracellular bilirubin modulator, exerts neuroprotective activity in a cellular Parkinson's disease model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14997.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笹澤有紀子、斉木臣二、相馬早苗、角田宗一郎、服部信孝
2. 発表標題 ポリアミンのオートファジー誘導機構解析
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斉木臣二、笹澤有紀子、藤巻基紀、森 聡生、波田野琢、古屋徳彦、王子 悠、石川景一、奥住文美、服部信孝.
2. 発表標題 Serum polyamine metabolic changes in neurodegenerative diseases.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中鏡暁子、青木臣二、藤巻基紀、笹澤有紀子、波田野琢、石川景一、王子 悠、森 聡生、奥住文美、上野真一、服部信孝.
2. 発表標題 Plasma biomarker from L-dopa metabolite for pathological condition assessment of Parkinson's Disease.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大竹慶祐、室井誠、丹羽祐貴、宮寄奏、笹澤有紀子、長田裕之、清水史郎
2. 発表標題 Cytosporolide類の細胞増殖抑制活性における責任分子標的の同定
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----