

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06202

研究課題名（和文）筋細胞に見られる管状リソソームの形成メカニズムとその生物学的意義

研究課題名（英文）Functional analysis of the tubular lysosomal network in muscle cell

研究代表者

藤田 尚信（Fujita, Naonobu）

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：00506496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ショウジョウバエ筋細胞の管状リソソームネットワークの形成メカニズムとその生物学的な意義の解明に取り組んだ。筋細胞に見られる管状リソソームの形成は、細胞内の大規模な分解経路であるオートファジーとリソソームの分解活性の双方に依存していた。また、管状のネットワーク構造が形成されることにより、筋細胞内の分解活性が広い範囲でより均質化され、同調した分解が可能になっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リソソームが管状化する現象はこれまでも知られていたが、オートファジーの関与は知られていなかった。今回の研究から、オートファジーに依存した管状リソソームネットワークの存在が初めて明らかになった。また、ライブイメージングを駆使することにより、管状リソソームネットワークの内腔は実際につながっており、ネットワークが形成されることにより広い範囲でリソソームが同調していることが明らかになった。本研究により示された管状リソソームネットワークの「連続性」と「均質性」は、他の管状オルガネラの機能を理解する上でも重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：The shape of lysosomes changes with cellular degradative demands; however, there is limited knowledge about the mechanisms or significance that underlies distinct lysosomal morphologies. Here, we found an extensive tubular autolysosomal network in *Drosophila* abdominal muscle remodeling during metamorphosis. The tubular network transiently appeared and exhibited the capacity to degrade autophagic cargoes. The tubular autolysosomal network formation depended on both autophagic flux and degradative function, with the exception of the Atg12 and Atg8 ubiquitin-like conjugation systems. Among ATG deficient mutants, the efficiency of lysosomal tubulation correlated with the phenotypic severity in muscle remodeling. The lumen of the tubular network was continuous and homogeneous across a broad region of the remodeling muscle. Altogether, we revealed that the dynamic expansion of a tubular autolysosomal network synchronizes the abundant degradative activity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム 筋細胞 オートファジー ショウジョウバエ 分解 管状化

1. 研究開始当初の背景

細胞内の分解の場であるリソソームは球状のオルガネラであるが、特定の条件下では管状になることが知られている。しかしながら、そのメカニズムや生物学的な意義はほとんど明らかにされていなかった。私は、ショウジョウバエの腹部筋細胞が変態期にリモデリングされる際に、管状のリソソームネットワークが筋細胞に張り巡らさせる現象を見出した。筋細胞に見られる管状リソソームネットワークの形成には、細胞内分解経路であるオートファジーが必要であると考えられる結果が得られていたが、その他のメカニズムや機能は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を目的とした。

- (1) 筋細胞に見られる管状リソソームネットワークの性状解析
- (2) 管状リソソームネットワークの形成メカニズムの解析
- (3) 管状リソソームネットワークの機能解析

3. 研究の方法

筋細胞に見られる管状リソソームネットワークは非常に壊れやすい構造体であり、個体の解剖や化学固定により容易に失われてしまうものであった。そこで、本研究では、ショウジョウバエの筋細胞を生きたまま角質越しに共焦点顕微鏡を用いて解析した。管状リソソームネットワークの性状の解析には、光学顕微鏡および電子顕微鏡を利用した。また、リソソーム管状化のメカニズムの解析には、ショウジョウバエの遺伝学的な手法を用いた。さらに、リソソームの管状化を抑えた際に筋細胞に見られる表現型を解析することにより、管状リソソームネットワークの生物学的な意義を解析した。

4. 研究成果

(1) 筋細胞に形成される管状リソソームネットワークの性状解析

経時的な形態観察から、筋細胞の管状リソソームネットワークは一過的に形成される構造であることが判明した。ショウジョウバエの腹部筋細胞は、変態期（蛹の期間）の4日間にリモデリングされる（図1上）。筋細胞の管状リソソームネットワークは変態期を通して見られるわけではなく、蛹になって1日目付近にのみ見られた（図1下）。この時期は、オートファジーが最も亢進している時期である。リソソームの管状化は、蛹化後12時間付近から見られ、蛹化後20時間には発達したネットワーク状の構造が形成された。蛹化後12時間の個体のライブイメージングにより、球状のリソソームが管状化する様子が観察された。また、短い管状リソソーム構造体が互いに融合し、枝分かれしたネットワークを形成する様子も観察された。

管状ネットワークが実際に分解能を持つかどうか検討するために、プロテアーゼにより切断されることで蛍光を発するようになる DQ Red BSA を蛹化後20時間の個体に微量注入した。その結果、DQ Red BSA がエンドサイトーシスされ、分解されることにより生じた蛍光が管状リソソーム構造に観察された。また、酸性コンパートメントを特異的に標識する LysoTracker を微量注入した際にも管状リソソームは染色された。これらの結果より、管状リソソームネットワークは、酸性の分解コンパートメントであることが明らかになった。

(2) 管状リソソームネットワークの形成メカニズムの解析

オートファゴソームの形成に働く ATG 遺伝子群を網羅的にノックダウンし、管状リソソームネットワークの形態に与える影響を検討した。ATG9 や FIP200 をはじめとする ATG 遺伝子をノックダウンすると、管状リソソームはほぼ完全に失われた（図2A）。一方、ユビキ

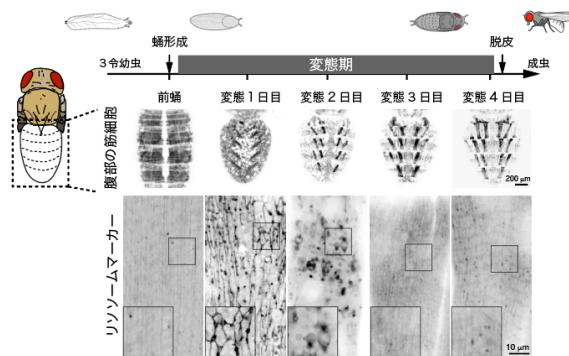


図1. 変態期の腹部筋細胞に見られる管状リソソーム

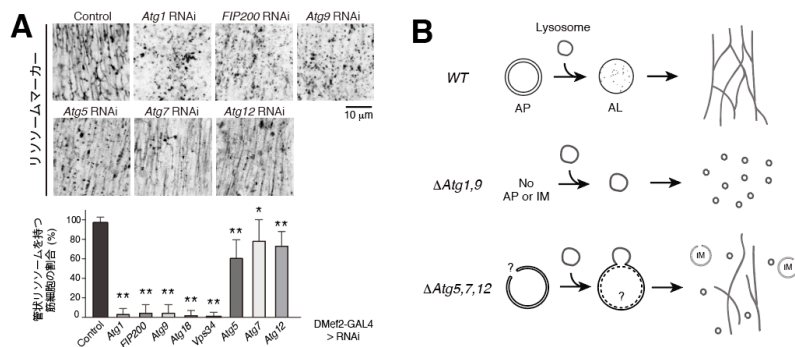


図2. リソソーム管状化はオートファジーに依存している

チン様タンパク質 ATG5 の結合系に関わる一群の遺伝子(ATG5, ATG7, ATG12)は管状リソソームの形成には必須ではなく(図2A)、ATG5 をノックアウトした筋細胞でもリソソームの管状化は見られた。これまでの報告と一致して、ATG5 結合系に働く遺伝子をノックダウンすると隔離膜の蓄積が見られた。オートファジー関連構造体とリソソームの融合に働く SNARE タンパク質である Syntaxin17 を ATG5 と同時にノックダウンすると、リソソームの管状化が抑えられた。これらの結果より、管状リソソームネットワークの形成には、リソソームにオートファジー関連膜構造体が融合することが必要であると考えられる(図2B)。

RNAi スクリーニングから、管状リソソームネットワークの形成に関わる遺伝子として、リソソーム膜上のトランスポーターである Spinster、リソソーム膜上のチャネルである TRPML、またリソソームの酸性化に働く液胞型 H⁺-ATPase サブユニットなどを同定した。これらの遺伝子を筋細胞でノックダウンすると、

リソソームは肥大し管状構造が失われた(図3)。また、肥大した球状のリソソームを電子顕微鏡により観察すると、その内部には分解されずに蓄積した内容物が確認された。よって、筋細胞で見られるリソソームの管状化には、リソソームの分解活性も必要であることが判明した。

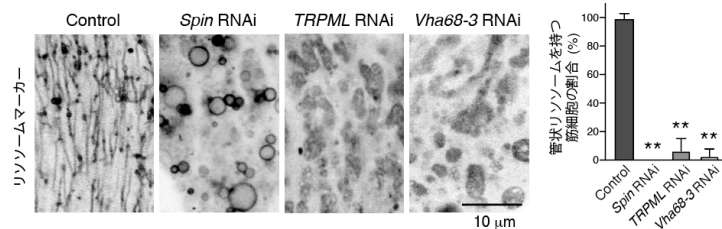


図3. 管状リソソームの形成にはリソソーム活性が必要である

(3) 管状リソソームネットワークの機能解析

ATG5 はオートファジーに必須な遺伝子であるが、管状リソソームの形成には必須ではなかった。したがって、管状リソソームが完全に失われる FIP200 のノックアウトと ATG5 のノックアウトとの間に見られる差は、管状リソソームネットワークの機能を反映していると考えられる。管状リソソームネットワークが形成される腹部の筋細胞は、蛹からの脱皮に重要な機能を果たしている。管状リソソームの形成に必須な FIP200 の機能を抑えると、筋細胞のリモデリングに重篤な影響が見られ、筋機能が失われた。それにより、多くの個体は羽化不全になった。一方、ATG5 の機能を抑制すると筋細胞のリモデリングに影響は見られるものの、筋機能は保たれており、多くの個体は羽化可能であった。これらの結果より、管状リソソームネットワークは筋細胞のリモデリングの前期、オルガネラの分解が見られる段階に重要な働きを持つと考えられる(図4)。

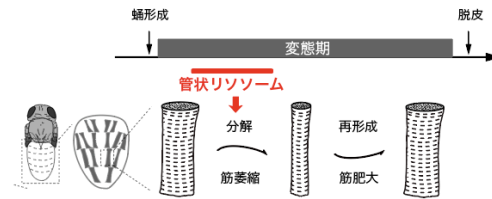


図4. 管状リソソームは筋オルガネラの効率的な分解に働く

次に「球状の不連続なリソソーム」と「管状リソソームネットワーク」との間でどのような差が見られるのか検討した。蛍光タンパク質を付加したリソソーム酵素の光退色後蛍光回復法

(FRAP) により、管状リソソームネットワークの内腔は実際に連続的であることが分かった。球状の不連続のリソソームでは、酸性度や分解活性に大きなバラツキが見られた。一方で、管状リソソームネットワークは、球状のリソソームに比べて、より均質であることが分かった(図5)。したがって、管状ネットワークが形成されることにより、筋細胞内の分解活性が広い範囲でより均質化され同調した分解が可能になっていると考えられる。

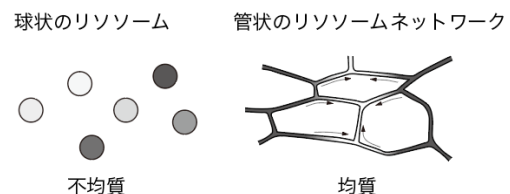


図5. 球状と管状リソソームネットワークの比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murakawa Tadayoshi、Kiger Amy A.、Sakamaki Yuriiko、Fukuda Mitsunori、Fujita Naonobu	4. 巻 133
2. 論文標題 An autophagy-dependent tubular lysosomal network synchronizes degradative activity required for muscle remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.248336	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村川直柔、中村毅、藤田尚信
2. 発表標題 オートファジーを介した分泌経路の解析
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村川直柔、福田光則、藤田尚信
2. 発表標題 筋細胞の再構成に伴い形成される管状リソソームの形成機構
3. 学会等名 日本生化学会 東北支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田尚信、村川直柔、福田光則
2. 発表標題 筋細胞に見られるオートファジー依存的な管状リソソームネットワーク
3. 学会等名 第11回オートファジー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村川直柔、Amy Kiger、酒巻有里子、福田 光則、藤田 尚信
2. 発表標題 ショウジョウバエの筋細胞に見られる管状オートリソソームネットワーク
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田尚信
2. 発表標題 オートファジーを介した分泌のメカニズムと機能
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	カルフォルニア大学サンディエゴ校		