

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02428

研究課題名（和文）LC3による非オートファジー機能を介した損傷リソソーム修復機構の解明

研究課題名（英文）Lysosomal damage response mechanism through autophagy independent function of LC3

研究代表者

中村 修平（Nakamura, Shuhei）

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00510611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：傷ついたリソソームは細胞にとって有害となる。我々は以前、リソソーム損傷時にリソソーム生合成のマスター転写因子TFEBが活性化し、これが損傷リソソーム修復に必須であること、この活性化にオートファジー制御因子LC3の非オートファジー機能が必要であることを見出していたが(Nat Cell Biol, 2020)、その詳細は不明であった。本研究で、LC3のパラログが、ESCRT複合体と共に損傷膜の修復を担うことを見出した(EMBO Rep, 2023)。また、TFEBの新規ターゲットHKDC1を同定し、これがリソソームとミトコンドリアの恒常性維持に働くことも見出した(PNAS, 2024)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化過程や様々な加齢性疾患で損傷リソソームの増加が見られているが、損傷リソソームが老化の原因なのか結果なのかはよく分かっていない。本研究で新たに明らかにしたLC3パラログやHKDC1の抑制によって損傷リソソームが増加し、個体老化あるいは細胞老化の亢進がみられたことから、損傷リソソームが老化の要因の一旦になっている可能性が示唆された(EMBO Rep, 2023; PNAS, 2024)。今後これら因子の機能解析をさらに進めることでリソソーム損傷を伴う老化や加齢性疾患を抑制する新たな手法の確立につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Damaged lysosomes are detrimental to cells. While we had previously found that the master transcription factor for lysosomal biogenesis, TFEB, is activated upon lysosomal damage, that this is essential for damaged lysosome repair, and that this activation requires a non-autophagic function of the autophagy regulator LC3 (Nat Cell Biol, 2020), the details of this function remained unclear. In this study, we found that LC3 paralogues, together with the ESCRT complex, are responsible for repair of damaged membranes (EMBO Rep, 2023). We also identified a novel target of TFEB, HKDC1, and found that it acts in lysosomal and mitochondrial homeostasis (PNAS, 2024).

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム LC3 TFEB オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

傷ついたリソソームは細胞にとって有害となるが、細胞がこれにどう対処しているか不明である。我々は最近、リソソーム損傷時に、オートファジー・リソソーム生成のマスター転写因子 TFEB が活性化し、このことが損傷リソソームの修復に必須であることを見出した (Nakamura et al., *Nat Cell Biol*, 2020)。興味深いことにこの TFEB の活性化にはオートファジーで必須な働きをする LC3 タンパク質のオートファジー以外の機能が必要であることが分かった。しかし LC3 による非オートファジー機能がどのように TFEB を活性化し最終的にリソソーム恒常性維持に寄与するか不明であり、本研究でこの詳細を明らかにする。

### 2. 研究の目的

リソソーム損傷時の TFEB の活性化にはオートファジーで必須な働きをする LC3 タンパク質のオートファジー以外の機能が必要であることが分かった。リソソームが損傷を受けると LC3 はリソソームへ局在し、カルシウムチャネルの TRPML1 の機能を介して TFEB を活性化することを新たに発見した。しかし、LC3 がどのようにリソソームに局在し、最終的になぜ TFEB 活性化に繋がるのか、TFEB はどのようにして損傷したリソソームを修復するのか等全く不明であり、本研究でこれらの点を明らかにする。

### 3. 研究の方法

インタラクトーム解析によりリソソームに局在した脂質化 LC3 の相互作用パートナーの探索を行う。得られた候補因子のノックダウンによるスクリーニングを行い、リソソーム損傷時の脂質化 LC3 の局在化メカニズム解明の足がかりとする。TFEB 活性はリン酸化により制御されるため、脱リン酸化酵素をターゲットとした siRNA スクリーニングを行い、リソソーム損傷時の TFEB 活性を制御する新規の脱リン酸化酵素を同定する。これがリソソームに局在した LC3 によりどう制御されるのか明らかにする。リソソーム損傷時に TFEB 依存的に変動する下流の因子を RNAseq により探索し、スクリーニングにより損傷リソソーム修復に関与する因子を特定する。

### 4. 研究成果

LC3 やそのパラログのリソソーム局在機構について解析を進めたところ、リソソームから流出するカルシウムが重要な働きをすることがわかった。さらに、これらの相互作用解析から得た因子が TFEB の働きとも独立して損傷リソソーム修復に関わることを新たに見出した。具体的には LC3 のパラログである GABARAPs が、AGC キナーゼのひとつ STK38 とともに働き、ESCRTs 複合体のリクルートを介して損傷したリソソーム膜の修復に必須の働きを持つことを見出した (Ogura et al., *EMBO Rep*, 2023)。またこのことが細胞や個体老化の抑制に必須であることを見出した。さらに、リソソーム損傷時に LC3 下流で働く TFEB 活性制御に必須な脱リン酸化酵素の候補を同定することができた。現在この候補因子については引き続き機能解析を進めている。加えて RNAseq や ChIP-qPCR を通してリソソーム損傷時の TFEB 下流で働く新規ターゲット HKDC1 を発見し、これがリソソームに加えミトコンドリアの恒常性維持に必須の働きを持つことを見出した (Cui et al., *PNAS*, 2024)。HKDC1 は PINK1/Parkin 依存性マイトファジーの初期段階で働くこ

とを明らかにした。さらに HKDC1 はミトコンドリアとリソソームのコンタクトサイトの制御を介して損傷したリソソームの膜修復に寄与することが分かった。また HKDC1 によるこれらミトコンドリアとリソソームのクオリティコントロールが細胞老化の抑制に必要であることを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 .Cui, M., Yamano, K., Yamamoto, K., Yamamoto-Imoto, H., Minami, S., Yamamoto, T., Matsui, S., Kaminishi, T., Shima, T., Ogura, M., Tsuchiya, M., Nishino, K., Layden B., Kato, H., Ogawa, H., Oki, S., Okada, Y., Isaka, Y., Kosako, H., Matsuda, N., *Yoshimori, T., *Nakamura, S.	4. 巻 121
2. 論文標題 HKDC1, a target of TFEB, is essential to maintain both mitochondrial and lysosomal homeostasis, preventing cellular senescence	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2306454120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2306454120	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 該当する

1. 著者名 Kakuda Keita, Ikenaka Kensuke, Kuma Akiko, Doi Junko, Aguirre C?sar, Wang Nan, Ajiki Takahiro, Choong Chi-Jing, Kimura Yasuyoshi, Badawy Shaymaa Mohamed Mohamed, Shima Takayuki, Nakamura Shuhei, Baba Kousuke, Nagano Seiichi, Nagai Yoshitaka, Yoshimori Tamotsu, Mochizuki Hideki	4. 巻 121
2. 論文標題 Lysophagy protects against propagation of -synuclein aggregation through ruptured lysosomal vesicles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2312306120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2312306120	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 Ogura Monami, Kaminishi Tatsuya, Shima Takayuki, Torigata Miku, Bekku Nao, Tabata Keisuke, Minami Satoshi, Nishino Kohei, Nezu Akiko, Hamasaki Maho, Kosako Hidetaka, Yoshimori Tamotsu, Nakamura Shuhei	4. 巻 24
2. 論文標題 Microautophagy regulated by <sc>STK38</sc> and <sc>GABARAPs</sc> is essential to repair lysosomes and prevent aging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e57300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202357300	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 Shima Takayuki, Ogura Monami, Matsuda Ruriko, Nakamura Shuhei, Jin Natsuko, Yoshimori Tamotsu, Kuma Akiko	4. 巻 222
2. 論文標題 The TMEM192-mKeima probe specifically assays lysophagy and reveals its initial steps	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202204048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202204048	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 Shioda Tatsuya, Takahashi Ittetsu, Ikenaka Kensuke, Fujita Naonobu, Kanki Tomotake, Oka Toshihiko, Mochizuki Hideki, Antebi Adam, Yoshimori Tamotsu, Nakamura Shuhei	4. 巻 120
2. 論文標題 Neuronal MML-1/MXL-2 regulates systemic aging via glutamate transporter and cell nonautonomous autophagic and peroxidase activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2221553120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2221553120	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 該当する

1. 著者名 小倉もな美, 吉森 保, 中村修平	4. 巻 41
2. 論文標題 リソソーム損傷応答とその生理学的意義	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1733~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/7277-00001-0000509-00	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 Oe Yukako, Kakuda Keita, Yoshimura Shin-ichiro, Hara Naohiro, Hasegawa Junya, Terawaki Seigo, Kimura Yasuyoshi, Ikenaka Kensuke, Suetsugu Shiro, Mochizuki Hideki, Yoshimori Tamotsu, Nakamura Shuhei	4. 巻 18
2. 論文標題 PACSN1 is indispensable for amphisome-lysosome fusion during basal autophagy and subsets of selective autophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010264	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 Yamamoto-Imoto Hitomi, Hara Eiji, Nakamura Shuhei, Yoshimori Tamotsu	4. 巻 3
2. 論文標題 Measurement of autophagy via LC3 western blotting following DNA-damage-induced senescence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101539 ~ 101539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101539	査読の有無 無
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 小倉 もな美、吉森 保、中村 修平	4. 巻 73
2. 論文標題 特集 リソソーム研究の新展開 . リソソームの恒常性維持機構 損傷リソソーム応答によるリソソーム恒常性の維持機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 221 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201506	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 中村 修平, 井本 ひとみ, 吉森 保	4. 巻 61(1)
2. 論文標題 【抗老化医療の未来をさぐる:哺乳類における老化・寿命制御の理解とその社会実装】オートファジーと老化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Geriatric Medicine	6. 最初と最後の頁 45-49
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 Nakamura Shuhei, Akayama Shiori, Yoshimori Tamotsu	4. 巻 50
2. 論文標題 Non-canonical roles of ATG8 for TFEB activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Society Transactions	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BST20210813	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 Ogura Monami, Shima Takayuki, Yoshimori Tamotsu, Nakamura Shuhei	4. 巻 3
2. 論文標題 Protocols to monitor TFEB activation following lysosomal damage in cultured cells using microscopy and immunoblotting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101018 ~ 101018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.101018	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8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中村修平
2. 発表標題 オートファジー・リソソーム分解系による老化抑制機構の解明
3. 学会等名 第13回腎不全研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村修平
2. 発表標題 オートファジーによる寿命・老化制御メカニズム
3. 学会等名 第3回日本オートファジーコンソーシアムシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村修平
2. 発表標題 リソソーム恒常性維持の分子機構と細胞老化における役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuhei Nakamura
2. 発表標題 Molecular Mechanisms Maintaining Lysosomal Homeostasis and Its Roles in Aging
3. 学会等名 Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN) Webinar Series（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村修平
2. 発表標題 オートファジー・リソソーム分解系の制御機構と老化・寿命制御における役割
3. 学会等名 第22回日本メンズヘルス医学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村修平
2. 発表標題 傷ついたリソソームを除去するメカニズムとその生理学的意義
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村修平
2. 発表標題 傷ついたリソソームを除去するメカニズムとその生理学的意義
3. 学会等名 第29回 cell death 学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Nakamura
2. 発表標題 Novel regulatory mechanism of TFEB essential for lysosomal homeostasis.
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村 修平	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 133
3. 書名 実験医学2023年7月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

オートファジー分解経路を制御する新たな因子を発見 <a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_results/papers/detail/1045">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_results/papers/detail/1045</a>
---

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