

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02473

研究課題名（和文）管状リソソームネットワークの形成メカニズムと機能の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of tubular lysosome formation

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） 9,600,000円

研究成果の概要（和文）：リソソームは球状のオルガネラであるが、環境の変化に応じて管状化することが知られている。管状化は、リソソーム活性を調節するメカニズムの1つであると考えられているが、管状リソソームは壊れやすく解析が困難なこともあり、その形成メカニズムは不明な点が多く残されていた。本研究では、蛹期ショウジョウバエの腹部筋細胞に形成される管状リソソームをモデルに、リソソーム管状化のメカニズムの解明に取り組んだ。トランスクリプトーム解析とRNAiスクリーニングから、リソソーム管状化に必要な遺伝子を同定した。さらに、それらの機能解析から、管状リソソームネットワークの主要な膜供給源は小胞体であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりリソソーム管状化に関わる新たな因子が複数同定された。リソソーム管状化に関わる一連の遺伝子が同定されたことにより、今後、リソソーム形態調節メカニズムの理解が比較的に進むと期待される。管状リソソームネットワークの形成は、オートファジーに依存していることから、本研究から得られた知見は、オートファジーの制御機構に関しても新たな知見を提供するものである。さらに、筋細胞に見られるT管などの他の管状オルガネラとの共通点と相違点が明らかになったことにより、膜管状化メカニズムのさらなる理解につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lysosomes are generally considered spherical organelles but are tubulated in response to environmental stimuli. Tubulation is thought to be one of the mechanisms regulating lysosome activity; however, its mechanisms have remained poorly understood. This study aims to elucidate the mechanism of lysosomal tubulation using the tubular lysosomal network formed in *Drosophila*'s pupal abdominal muscle cells as a model. A combination of transcriptome analysis and RNAi screening identified a series of genes required for lysosomal tubulation. Furthermore, their functional analysis revealed that the endoplasmic reticulum is the primary membrane source for tubular lysosomal network formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム 管状化 筋細胞 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

酸性加水分解酵素を内含するリソソームは、真核細胞に普遍的に存在する“分解”の場である。一般に、リソソームは球状のオルガネラであると考えられているが、環境の変化に応じて管状化することが知られている。1970年代には、マクロファージ、神経細胞、また隣細胞など多様な細胞種に、低頻度ながらも管状のリソソームが観察されている。管状化は、リソソームの活性を調節するメカニズムの1つであると予想されているが、非常に壊れやすく解析が困難なこともあり、管状リソソームの形成メカニズムとその生物学的な意義は不明であった。

私は、ショウジョウバエの蛹期に幼虫の筋細胞が成虫の腹部筋細胞へリモデリングされる際に、オートファジーに依存して管状のリソソームネットワークが張り巡らされる新たな現象を見出した。この現象を利用し、管状リソソームの形成メカニズムの解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、筋細胞に形成される管状リソソームネットワークをモデルに、リソソーム管状化の分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

ショウジョウバエでは全遺伝子に対する RNAi 系統が整備されていることから、ゲノムワイド RNAi スクリーニングも可能ではあるが、管状リソソームの解析系のスループットを考えると現実的ではない。そこで、本研究では、管状リソソームネットワークが形成される特定の筋細胞の経時的なトランスクリプトーム解析を実施し、得られたデータの主成分分析から、リソソーム機能に関わる遺伝子を選別した。それらの候補遺伝子を Spinster-RFP をリソソームマーカーに用いた *in vivo* RNAi スクリーニングに供して、管状リソソームの形成に関わる遺伝子を同定した。さらに、新たに得られたリソソーム管状化に関わる遺伝子の機能を、細胞生物学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 筋細胞リモデリングのトランスクリプトーム解析

リソソーム管状化は筋細胞リモデリングの特定の時期にのみ見られることから、リソソームの管状化に関わる遺伝子の発現は特定の時期に亢進すると考えた。そこで、リソソーム管状化に関わる候補遺伝子を選別するために経時的な RNA-seq を実施した。腹部の目的筋細胞を単離し、シングルセル RNA-seq のプロトコルを用いて、筋細胞リモデリングに伴うトランスクリプトームの変動を解析した。先に、管状リソソームネットワークの形成にオートファジーが必要であることを見出していたことから、野生型に加えて、オートファジーを抑制した FIP200 もしくは Atg9 をノックダウンしたサンプルも並行して解析した。この解析から、オートファジーの欠損は筋細胞リモデリングに伴う遺伝子の発現変動にほとんど影響を与えないことがわかった。したがって、オートファジーは遺伝子発現調節を介さずリソソームの管状化を制御していると考えられる。

野生型筋細胞の RNA-seq のデータから、目的筋細胞において、およそ 8,000 遺伝子の発現変動が明らかになった。得られたデータの主成分分析および因子解析から、リソソーム機能に関わる遺伝子が濃縮される領域があることを見出した(図1)。その領域に含まれる遺伝子から、ハウスキーピング遺伝子などを除き RNAi スクリーニングに供する候補遺伝子を選別した。

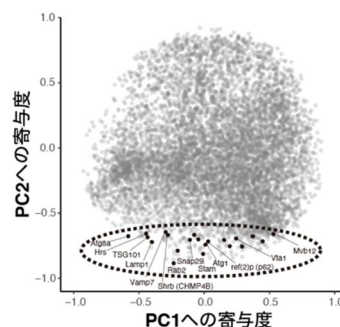


図1. 因子解析による AP-LY 関連遺伝子の濃縮

(2) 管状リソソームの形成に関わる遺伝子の RNAi スクリーニング

リソソーム膜タンパク質である Spinster に RFP を付加したコンストラクトをリソソームマーカーに用いて、*in vivo* RNAi スクリーニングを実施した。GAL4/UAS システムを用いて、Spinster-RFP と RNAi コンストラクトを筋細胞特異的に発現させ、管状リソソームネットワークが形成される蛹化後 20 時間の個体の腹部筋細胞を角質越しに共焦点顕微鏡にて観察した。237 の RNAi 系統を検討し、5 つのヒットが得られた。

(3) リソソーム管状化における SPASTIN の機能

SPASTIN は神経変性疾患のひとつである遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子として知られている。SPASTIN を筋細胞特異的にノックダウンすると管状リソソームの形成が強く抑えられ(図2) ショウジョウバエの運動性の低下も見られた。

SPASTIN はN末端の疎水性ドメイン (HD) を介して膜上に局在し、ESCRT-III や微小管と相互作用するドメインをもつ。また、C末端には微小管切断活性を示す AAA-ATPase ドメインを有している (図2)。リソソームの管状化に微小管が重要であることが示唆されている。しかしながら、SPASTIN をノックダウンもしくは過剰発現させても微小管の形態には大きな影響が見られなかったことから、リソソーム管状化への SPASTIN の直接的な関与が示唆される。そこで、各ドメインを欠失させたコンストラクトの組換えショウジョウバエを作成した。これらを用いることにより、リソソーム管状化における各ドメインの機能を明らかにできると考えられる。

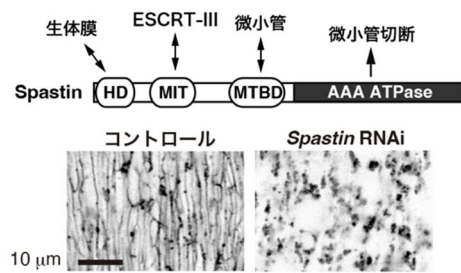


図2. Spastin は管状リソソームの形成に必要である

(4) リソソーム管状化における STX17 の機能

オートファゴソームとリソソームの融合に関わる SNARE である Syntaxin17 (STX17) はリソソームの管状化に必須であった。通常の SNARE タンパク質とは異なり、STX17 は疎水性の膜貫通ドメインがタンデムに並んだヘアピン構造を持つ (図3左)。また、STX17 はオートファゴソームだけでなく、管状化したリソソーム上にも局在した (図3右)。小胞体膜の管状化に働く REEP や Reticulon などの分子は膜貫通ドメインをタンデムに持ち、“くさび”のように働いて膜の曲率を生み出すと報告されていることから、STX17 のヘアピン構造も膜の曲率を生み出しているのではないかと考えた。そこで、STX17 の組換えタンパク質を用いて、膜を変形させる能力を持つかどうか *in vitro* で検討したが、膜を変形させる活性は見られなかった。また、STX17 と SNARE 複合体を形成する SNAP29 をノックダウンした際にもリソソームの管状化が強く抑えられたことから、STX17 は直接的に膜の変形を生み出しているわけではなく、オートファゴソームとリソソームの融合を介した何らかのメカニズムによりリソソームの管状化させていると考えられる。

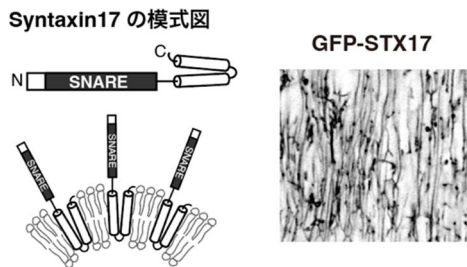


図3. STX17 は管状リソソームに局在する

(5) リソソーム管状化における TANK の機能

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必要な遺伝子として TANK (CG15626) を同定した。ショウジョウバエの TANK はエタノール感受性に関わる遺伝子として先に報告されているが、その機能は不明である。GFP を付加した TANK の組換え体を作成し、筋細胞に発現させたところ筋小胞体に局在した。TANK-GFP は管状リソソーム上には局在しなかったことから、リソソーム管状化に直接的に働く因子ではないと考えられる。筋細胞と脂肪体における TANK の機能解析の結果を合わせると、TANK はオートファゴソームの形成を介して、管状リソソームネットワークの形成に関与していると考えられる。興味深いことに、TANK をノックダウンもしくはノックアウトした個体の筋細胞には、筋小胞体が多層に重なった特徴的な構造が観察された。また、リソソームの分解活性を抑えて、リソソームを肥大化させると、筋小胞体膜タンパク質がリソソーム膜上に局在する様子が観察された。これらの結果より、管状リソソームネットワークの主要な膜の供給源は筋小胞体であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

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 -
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 Fujita Naonobu, Girada Shraavan, Vogler Georg, Bodmer Rolf, Kiger Amy A.	4. 巻 10.1101/2024.01.31.578124
2. 論文標題 PI(4,5)P2 role in Transverse-tubule membrane formation and muscle function	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2024.01.31.578124	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 該当する
1. 著者名 Kawaguchi Kohei, Fujita Naonobu	4. 巻 175
2. 論文標題 Shaping transverse-tubules: central mechanisms that play a role in the cytosol zoning for muscle contraction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 125 ~ 131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad083	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 藤田尚信	4. 巻 41
2. 論文標題 リソソームの形態変化：機能制御の新たなかたち	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1721 ~
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18958/7277-00001-0000510-00	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 藤田 尚信	4. 巻 94
2. 論文標題 脂肪体における“変態ホルモン誘導性オートファジー”	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 711～714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940711	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 Murakawa Tadayoshi, Nakamura Tsuyoshi, Kawaguchi Kohei, Murayama Futoshi, Zhao Ning, Stasevich Timothy J., Kimura Hiroshi, Fujita Naonobu	4. 巻 149
2. 論文標題 A Drosophila toolkit for HA-tagged proteins unveils a block in autophagy flux in the last instar larval fat body	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.200243	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

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤田尚信
2. 発表標題 ショウジョウバエにおけるオートファジー・リソソーム系の生理機能
3. 学会等名 第23回 日本蛋白質科学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田尚信
2. 発表標題 ショウジョウバエ幼虫筋細胞の生き残りとりモデリング
3. 学会等名 第31回 日本Cell Death学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田尚信
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた筋オルガネラの解析
3. 学会等名 第9回 日本筋学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 葛西友梨、藤田尚信
2. 発表標題 オートファゴソーム膜を介した筋小胞体のリモデリング
3. 学会等名 第75回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田尚信
2. 発表標題 ショウジョウバエの変態期にみられるオートファジーを介した筋細胞のリモデリング
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田尚信
2. 発表標題 ショウジョウバエにおけるオートファジー・リソソーム系の生理機能
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 藤田尚信
2. 発表標題 多細胞生物に見られる組織をまたいだオートファジー経路
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021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