様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：２４６０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2023～2024
課題番号：２３Ｋ１８１４０

研究課題名（和文）「ミクロ」オートファジーによるリソソーム膜修復を介した老化抑制機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism to prevent aging through microautophagy dependent lysosomal membrane repair.

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）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ミクロオートファジーを制御する新規因子としてAGCキナーゼの一つSTK38を同定し、この働きがリソソームの恒常性、並びに個体や細胞老化の抑制に必須であることを見出した(Ogura et al., EMBO Rep, 2023)。また、オートファジー・リソソーム生合成のマスター転写因子TFEB下流で働く新たな因子としてミトコンドリアに局在するHKDC1を同定、これが損傷ミトコンドリアの除去を担うマクロオートファジーと損傷リソソームの膜修復を担うミクロオートファジーの両方に必須の役割をもつこと、またこの機構が細胞老化の抑制に寄与することを見出した(Cui et al., PNAS, 2024)。

研究成果の学術的意義や社会的意義
真核生物に共通して存在する細胞内分解システム、オートファジーは、細胞質成分をオートファゴソームによって囲い込みリソソームに運んで分解するマクロオートファジーと、リソソームが細胞質の一部分を直接取り込んで分解するミクロオートファジーの大きく2つに大別される。マクロオートファジーの理解はこの20年で大きく進展した一方、多細胞生物でのミクロオートファジーの分子メカニズムや生理学的意義はほとんど分かっていない。このような中、ミクロオートファジーによるリソソーム恒常性維持の新たな分子機構と老化抑制の役割を明らかにした本研究成果は学術的にも社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We identified STK38, an AGC kinase, as a novel regulator of microautophagy and found that it is essential for lysosome homeostasis and inhibition of individual and cellular senescence (Ogura et al., EMBO Rep, 2023). We also identified mitochondria-localized HKDC1 as a new downstream target of TFEB, a master transcription factor for autophagy and lysosome biosynthesis, which is essential for both the removal of damaged mitochondria by macroautophagy and the membrane repair of damaged lysosomes by microautophagy. We further showed that this HKDC1 function is critical to inhibit cellular senescence (Cui et al., PNAS, 2024).

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミクロオートファジー　老化　リソソーム

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

オートファジーとは真核生物に普遍的に存在するリソソームに依存した細胞内の分解システムである。一般的にオートファジーと言った場合、九分九厘「マクロ」オートファジーを指す。マクロオートファジーとは、必要に応じて作られるオートファゴソームと呼ばれる小胞が、細胞質の様々な成分を取り囲み、リソソームへ運んで分解するシステムである。しかし、オートファジーにはもう一つ**「ミクロ」**オートファジーとよばれる経路が存在する。ミクロオートファジーは細胞質の「小さな」部分がリソソームに直接取り込まれ分解される系として、1966 年に Christian de Duve によって初めて名付けられた。マクロオートファジーの分子メカニズムや生理的意義の解明は東京工業大学の大隅良典博士が酵母遺伝学を用いて同定されたオートファジー関連因子(Atg)を皮切りに飛躍的に進んだ一方で、ミクロオートファジーの理解は大きく遅れており、とりわけ哺乳類を含めた多細胞生物での分子機構や生理的意義は全く分かっていない。ミクロオートファジーを制御する特異的因子が見つかっていないこと、マクロオートファジーとの区別が困難で、リソソームが非常に小さい(0.1-1.2μm)ため適切な検出系がないこと、生理的意義がまったくわからないこと、が相互に大きな障壁となりこの分解系の理解は遅々として進んでいない。しかし、ミクロオートファジーの理解無くしてオートファジーの全容理解には到底及ばないと考えられる。

２．研究の目的

私たちはごく最近 STK38 という因子がミクロオートファジーと思われる方法でリソソームの恒常性を維持し、これが生物の老化を抑制するという極めて重要な役割を担うことを見出した。STK38 はリソソームの膜が加齢などで傷ついた際に速やかに損傷箇所に集積し、マクロオートファジーとは独立して損傷箇所を陥入させて分解し、リソソーム膜を修復する働きをもつ。即ち本因子が不明であったミクロオートファジーの特異的制御因子の一つであることが示唆された。さらに、STK38 を欠損したモデル生物の線虫では発生や成長には影響がないが、寿命だけが短縮するという興味深い表現系を示した。同様に STK38 が哺乳類の細胞老化を抑制するという結果も得ており進化的に保存された機能を有する可能性がある。これら背景を踏まえ、本研究では以下大きく２つの目的のもと、鍵因子 STK38 の機能解析を通して、ミクロオートファジーの分子機構と生理的意義の解明に挑戦する。

目的 1. STK38 によるミクロオートファジーを介したリソソーム膜修復機構の解明

目的 2. STK38 によるミクロオートファジーを介した老化抑制機構の解明

３．研究の方法

目的 1. STK38 によるミクロオートファジーを介したリソソーム膜修復機構の解明

ミクロオートファジーを検出する方法として、特定のリソソーム膜タンパク質に GFP を繋いだプローブを用いてリソソーム内腔への取り込みを評価する方法、蛍光寿命イメージングによる膜張力変化を指標とする方法を確立した。各種マクロオートファジー不全細胞と組み合わせることでミクロをマクロと区別して評価することが初めて可能となった。これらを駆使して STK38 による膜修復の作用機序解明を進める。STK38 はリソソーム膜が様々な要因で損傷を受けた時のみ損傷箇所へリクルートされるが、この仕組みを得られている手がかりをヒントに明らかに

する。STK38 は AGC キナーゼファミリーに属し、下流因子をリン酸化することでミクロオートファジーを調節することが予測される。膜の変形にかかわる ESCRT タンパク質複合体と協調して働いている可能があり、これを踏まえて既に得ているリン酸化プロテオミクスデータから下流因子を特定、作動原理を解明する。

目的 2. STK38 によるミクロオートファジーを介した老化抑制機構の解明

STK38 の線虫ホモログ遺伝子の欠損により線虫の寿命が短縮すること、また哺乳類で STK38 の抑制により個体老化と密接に関連する細胞老化が亢進することを見出している。STK38 によるミクロオートファジーの破綻がなぜ老化につながるのか、これらモデルを用いて明らかにする。リソソームは寿命や老化制御にも必須の役割をもつ栄養センサーmTOR などが働くシグナル伝達のプラットホームとして働くため、ミクロオートファジーの破綻によってこれら多くのシグナル伝達が乱れ、老化につながっている可能性がある。また、リソソーム内部は酸性に保たれているが、ミクロオートファジーによる膜修復がうまくいかないと、これら酸性の内容物が漏れ出てしまうことで過剰な炎症、酸化ストレス、細胞死を引き起こし、これらが老化を早めている可能性もある。これらの検証に加え、STK38 抑制個体や細胞を用いたオミクス解析等も参考に STK38 による老化抑制の分子機構を明らかにする。

４．研究成果

リソソーム損傷時に STK38 はリソソームからのカルシウムに依存して損傷リソソームに集積することがわかった。また STK38 ノックダウン細胞において ESCRT 複合体の disassembly に関わる VPS4 のリソソームへのリクルートが低下することがわかった。またリン酸化プロテオミクス解析から STK38 の基質として DOK1 を同定し、このリン酸化が VPS4 のリクルートに必須であることを明らかにした。一方初期の ESCRT 因子のリクルートに GABARAPs(GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2)の働きが必須であることを見出した。GABARAPs は LCs(LC3A, LC3B, LC3C)とともに ATG8 ファミリーに属するタンパク質サブファミリーで、オートファゴソームに局在することが知られているが、リソソーム損傷時には損傷リソソームに局在し、この non-canonical な機能が ESCRT のリクルートやミクロオートファジーによる損傷リソソーム膜修復に必須であることが明らかとなった。GABARAPs および STK38 のノックダウンにより損傷リソソーム増加をともない、哺乳類の細胞老化や線虫の個体老化が亢進することが明らかとなった(Ogura et al., *EMBO Rep*, 2023)。これと並行して、オートファジー・リソソーム生合成のマスター転写因子の新規下流因子としてヘキソキナーゼファミリーに属する HKDC1 を同定し、この働きが損傷リソソーム膜の修復を担うミクロオートファジーや損傷ミトコンドリアを除去するマクロオートファジーを制御し、細胞老化抑制に寄与することも見出した(Cui et al., *PNAS*, 2024)。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計8件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 1.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 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 <scp>STK38</scp> and <scp>GABARAPs</scp> 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 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 井本 ひとみ，中村 修平	4．巻 42
2．論文標題 細胞機能と細胞老化 細胞老化におけるオートファジーの制御と役割	5．発行年 2024年
3．雑誌名 実験医学	6．最初と最後の頁 3127-3132
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 －

〔学会発表〕　計9件（うち招待講演　7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

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

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
Cold spring harbor laboratory, New York, USA（国際学会）

４．発表年
2024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リソソーム恒常性維持機構および神経・筋疾患との関連

３．学会等名
日本神経治療学会学術集会（招待講演）

４．発表年
2024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および老化・神経変性疾患との関連
３．学会等名 日本神経組織培養研究会（招待講演）
４．発表年 2024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・老化の制御のメカニズム
３．学会等名 令和６年度 L0 皮膚科学研究会（招待講演）
４．発表年 2025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〕

―

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