

ポストリソソーム生物学：  
分解の場から始まる高次生命現象の理解

領域番号: 21B306

令和3年度-令和5年度

学術変革領域研究(B)

研究成果報告書

令和6年6月

領域代表者 中村修平

奈良県立医科大学 医学部医学科 教授

## 領域の目的

リソソームは内部に多種の消化酵素を持ち、細胞内外成分の分解を担う酸性オルガネラである。細胞外や細胞膜成分はエンドサイトーシス経路により、細胞内成分はオートファジー経路によって目的地であるリソソームへ運ばれ分解される。従来これら分解経路の研究では、リソソームへの物質輸送のメカニズム解明に焦点が置かれ、事実この数十年でその理解は飛躍的に進んだ。しかし、これまで一般的に知られている細胞内分解機構としての役割はリソソーム本来の機能のほんの一部にしか過ぎないのかもしれない。実際、最近の相次ぐ発見から、リソソームの分解産物や多彩なリソソーム構成要素が細胞内、細胞・組織間での情報伝達に積極的に関与することで細胞・個体の恒常性維持を担うことが明らかになりつつある。すなわち、生物は物質をリソソームに運んだ後のプロセス、‘ポストリソソーム’も細胞・個体の生存戦略の一部に組み込んでいると考えられるが、そこで働くシグナルの実体や作用機序の全容の理解にはまだ程遠い状況にある。本研究では、高次生命現象の中でもポストリソソームの関与が示唆され始めている寿命・老化制御機構に着目し、ポストリソソームシグナルの解明を通して、リソソームを単なる分解産物の終着点とする既存の概念を根本から転換し、多くの生命現象の起点とする新たな研究領域、「ポストリソソーム生物学」の創成につなげる。

## 研究組織

### 計画研究

領域代表者 中村 修平 (奈良県立医科大学・医学部医学科・教授)

### (総括班)

研究代表者 中村 修平 (奈良県立医科大学・医学部医学科・教授)

研究分担者 藤田 尚信 (東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授)

研究分担者 吉川 治孝 (徳島大学・先端酵素学研究所・助教)

研究分担者 永沼 達郎 (北海道大学・薬学研究院・助教)

### (A01 中村班)

研究代表者 中村 修平 (奈良県立医科大学・医学部医学科・教授)

### (B01 西村班)

研究代表者 西村 多喜 (東京大学大学院医学系研究科・特任講師)

研究分担者 大場 陽介 (慶應義塾大学・薬学部・講師)

研究分担者 永沼 達郎 (北海道大学・薬学研究院・助教)

(C03 藤田班)

研究代表者 藤田 尚信 (東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授)

研究分担者 吉川 治孝 (徳島大学・先端酵素学研究所・助教)

(D04 阿部班)

研究代表者 阿部 耕太 (大阪大学・微生物病研究所・特任助教)

**交付決定額 (配分額)**

(単位:千円)

	合計	直接経費	間接経費
令和3年度	45500	35000	10500
令和4年度	45370	34900	10470
令和5年度	45370	34900	10470
総計	136240	104800	31440

## 研究発表

### 雑誌論文(査読あり)

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.** HKDC1, a novel target of TFEB, is essential to maintain both mitochondrial and lysosomal homeostasis, preventing cellular senescence. *PNAS*, 121, e2306454120 (2024).
2. Kakuda, K., \*Ikenaka, K., Kuma, A., Doi, J., Aguirre, C., Wang, N., Ajiki, T., Choong, C., Kimura, Y., Mohamad, S., Badawy, M., Shima, T., **Nakamura, S.**, Baba, K., Nagano, S., Nagai, Y., Yoshimori, T., Mochizuki, H. Lysophagy protects against propagation of  $\alpha$ -synuclein aggregation through ruptured lysosomal vesicles. *PNAS*, 121, e2312306120 (2024).
3. Ogura, M., Kaminishi, T., Shima, T., Torigata, M., Bekku, N., Tabata, K., Minami, S., Nishino, K., Nezu, A., Hamasaki, M., Kosako, H., \*Yoshimori, T., **Nakamura, S.** Microautophagy regulated by STK38 and GABARAPs is essential to repair lysosomes and prevent aging. *EMBO Rep*, e57300, (2023).
4. Shioda, T., Ikenaka, K., **Fujita, N.**, Kanki, T., Oka, T., Mochizuki, H., Antebi, A., \*Yoshimori, T., **Nakamura, S.** Neuronal MML-1/MXL-2 regulates systemic aging via glutamate transporter and cell non-autonomous autophagic and peroxidase activity. *PNAS*, 120, e2221553120, (2023).
5. Shima, T., Ogura, M., Matsuda, R., **Nakamura, S.**, Jin, N., \*Yoshimori, T., \*Kuma, A. The TMEM192-mKeima probe specifically assays lysophagy and reveals its initial steps. *J Cell Biol*, 222, e202204048, (2023)
6. Debès, C., Papadakis, A., Grönke, S., Karalay, Ö., Tain, LS., Mizi, A., **Nakamura, S.**, Hahn, O., Weigelt, C., Josipovic, N., Zirkel, A., Brusius, I., Sofiadis, K., Lamprousi, M., Lu, YX., Huang, W., Esmailie, R., Kubacki, T., Späth, MR., Schermer, B., Benzing, T., Müller, RU., \*Antebi, A., \*Partridge, L., \*Papantonis, A., \*Beyer, A. Ageing-associated changes in transcriptional elongation influence longevity. *Nature*, 616, 814-821, (2023)
7. Oe, Y., Kakuda, K., Yoshimura, S., Hara, N., Hasegawa, J., Terawaki, S., Kimura, Y., **Ikenaka, K.**, Suetsugu, S., Mochizuki, H., \*Yoshimori, T., **Nakamura, S.** PACSIN1 is indispensable for amphisome-lysosome fusion during basal autophagy and subsets of selective autophagy. *PLoS Genet.*, 18(6), e1010264, (2022)

8. Nakamura, J., Yamamoto, T., Takabatake, Y., Namba-Hamano, T., Minami, S., Takahashi, A., Matsuda, J., Sakai, S., Yonishi, H., Maeda, S., Matsui, S., Matsui, I., Hamano, T., Takahashi, M., Goto, M., Izumi, Y., Bamba, T., Sasai, M., Yamamoto, M., Matsusaka, T., Niimura, F., Yanagita, M., **Nakamura, S.**, Yoshimori, T., Ballabio, A., Isaka, Y. TFEB-mediated lysosomal exocytosis alleviates high-fat diet-induced lipotoxicity in the kidney. *JCI Insight* 22;8(4):e162498. (2023)
9. Tsujimoto, K., Jo, T., Nagira, D., Konaka, H., Park, JH., Yoshimura SI., Ninomiya, A., Sugihara, F., Hirayama, T., Itotagawa, E., Matsuzaki, Y., Takaichi, Y., Aoki, W., Saita, S., **Nakamura, S.**, Ballabio, A., Nada, S., Okada, M., Takamatsu, H., Kumanogoh, A. The lysosomal Ragulator complex activates NLRP3 inflammasome in vivo via HDAC6. *EMBO J.* 4;42(1):e111389. (2023)
10. Yamamoto-Imoto, H., Minami, S., Shioda, T., Yamashita, Y., Sakai, S., Maeda, S., Yamamoto, T., Oki, S., Takashima, M., Yamamuro, T., Yanagawa, K., Edahiro, R., Iwatani, M., So, M., Tokumura, A., Abe, T., Imamura, R., Nonomura, N., Okada, Y., Ayer, E D., Ogawa, H., Hara, E., Takabatake, Y., Isaka, Y., \***Nakamura, S.**, \*Yoshimori, T. Age-associated decline of MondoA drives cellular senescence through impaired autophagy and mitochondrial homeostasis. *Cell Rep.*, 38(9): 110444, (2022)
11. Yamamuro, T., \***Nakamura, S.**, Yanagawa, K., Tokumura, A., Kawabata, T., Fukuhara, A., Teranishi, H., Hamasaki, M., Shimomura, I., \*Yoshimori, T. Loss of Rubicon in adipocytes mediates the upregulation of autophagy to promote the fasting response. *Autophagy*, 14: 1-11, (2022)
12. Jia, X., Knyazeva, A., Zhang, Y., Castro-Gonzalez, S., **Nakamura, S.**, Carlson, L.A., Yoshimori, T., Corkery, D.P., Wu, YW. *V. cholerae* MakA is a cholesterol-binding pore-forming toxin that induces non-canonical autophagy. *J Cell Biol.*, 221, e202206040, (2022)
13. Yoshida, G., Kawabata, T., Takamatsu, H., Saita, S., **Nakamura, S.**, Nishikawa, K., Fujiwara, M., Enokidani, Y., Yamamuro, T., Tabata, K., Hamasaki, M., Ishii, M., Kumanogoh, A., \*Yoshimori, T. Degradation of the NOTCH intracellular domain by elevated autophagy in osteoblasts promotes osteoblast differentiation and alleviates osteoporosis. *Autophagy*, 13: 1-10 (2022)
14. Zhang, W., **Nishimura, T.**, Tooze SA. Real-Time Monitoring of ATG8 Lipidation in vitro Using Fluorescence Spectroscopy. *Bio Protoc.*, 14: e4917, (2024)

15. **Nishimura, T.**, Lazzeri, G., Tooze, S.A., \*Covino, R. ATG3 proteins possess a unique amphipathic  $\alpha$ -helix essential for the Atg8/LC3 lipidation reaction. *Autophagy*, 20: 212-213 (2024)
16. \*Tooze, S.A., Zhang, W., Lazzeri, G., Gahlot, D., Thukral, L., Covino, R., **Nishimura, T.** Membrane association of the ATG8 conjugation machinery emerges as a key regulatory feature for autophagosome biogenesis. *FEBS Lett.* 598: 107-113 (2024)
17. **Nishimura, T.**, #Lazzeri, G., Mizushima, N., \*Covino, R., Tooze, S.A. Unique Amphipathic alpha-helix Drives Membrane Insertion and Enzymatic Activity of ATG3. *Sci. Adv.*, 9: eadh1281 (2023)
18. #Zhang, W., **Nishimura, T.**, Gahlot, D., Saito, C., Davis, C., Jefferies, H.B.J., Schreiber, A., Thukral, L., \*Tooze SA. Autophagosome membrane expansion is mediated by the N-terminus and cis-membrane association of human ATG8s. *eLife*, 12: e89185 (2023).
19. **Abe, K.**, Ino, H., Niwa, T., Semmy, D., Takauchi, A., Nishimura, T., Mogi, C., Uenaka, M., Ishii, M., Tanaka, K., Ohkawa, Y., Ishitani, T. Sex-dependent regulation of vertebrate somatic growth and aging by germ cells. *Science Advances*, 10: eadi1621 (2024)
20. Oginuma, M., Nishida, M., Ohmura-Adachi, T., **Abe, K.**, Ogamino, S., Mogi, C., Matsui, H., and Ishitani, T. Rapid reverse genetics systems for *Nothobranchius furzeri*, a suitable model organism to study vertebrate aging. *Scientific reports* 12: 11628 (2022)
21. Murakawa, T., Nakamura, T., Kawaguchi, K., Murayama, F., Zhao, N., Stasevich, T., Kimura, H., **Fujita, N.** A Drosophila Toolkit for HA-tagged Proteins Unveiled a Block in Autophagy Flux in the Last Instar Larval Fat Body. *Development*, 149 (6): dev200243 (2022)

日本語総説(著者、タイトル、雑誌名、号数、ページ、発行年月日)

**中村修平**「概論 -種々の生命現象に関わるリソソームの新たな姿-」*実験医学* 7月号 2023年  
(リソソーム特集企画を担当)

小倉もな美、吉森 保、**中村修平**「リソソーム損傷応答とその生理学的意義」*実験医学* 7月号 2023年

**中村 修平**、井本 ひとみ、吉森 保「(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」*Geriatric Medicine* 61(1) 45-49 2023

年

小倉もな美、吉森 保、中村修平「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」**生体の科学** 73, 3, 221-225, 2022 年

中村修平、吉森保「オートファジーと老化・神経変性疾患」**老年精神医学雑誌** 33, 79-86, 2022 年

中村 修平、小倉もな美、吉森 保「リソソーム損傷応答におけるリソファジーの制御と生理的意義」**実験医学** Vol. 39, No. 13, 2067-2072, 2021 年

中村修平、吉森保「老化機構の新たな視点 -加齢に伴うオートファジー低下は老化の要因となる-」**Geriatric Medicine (老年医学)** 59(7), 659-664, 2021 年

阿部耕太、石谷太「臨床に役立つ Q&A 超短命魚キリフィッシュはどのように老化研究に役立つか教えてください」**Geriatric Medicine (老年医学)** 59(7), 703-705, 2021 年

藤田 尚信 「リソソームの形態変化：機能制御の新たなかたち」**実験医学** Vol. 41, No. 11, 1721-1726, 2023 年

藤田 尚信 「脂肪体における“変態ホルモン誘導性オートファジー”」**生化学** Vol. 94, No. 5, 711-714, 2022 年

学会発表(発表者名、タイトル、学会名、年月日)

中村修平「オートファジー・リソソーム分解系の制御機構と老化における役割」大阪大学 循環器内科 セミナー 2023 年 12 月 13 日

中村修平 「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」第 13 回腎不全研究会 指定公演 (東京、日比谷国際ビル コンファレンス スクエア) 2023 年 12 月 9 日

中村修平「オートファジーによる寿命・老化制御メカニズム」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(神奈川、資生堂グローバルイノベーションセンター) 2023 年 11 月 22 日

中村修平「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」第 96 回日本生化学会大会 シンポジウム(福岡、福岡国際会議場) 2023 年 10 月 31 日

Shuhei Nakamura, “Molecular Mechanisms Maintaining Lysosomal Homeostasis and Its Roles in Aging” Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN) Webinar Series 2023 年

9月26日

**Shuhei Nakamura**, Microautophagy is essential to repair damaged lysosomes and prevent aging, Gordon Research Conference, Biology of Aging conference, 2023年7月6日

**中村修平** 「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」第22回日本メンズヘルス医学会シンポジウム(東京、早稲田大学) 2023年9月9日

**中村修平** 「リソソーム恒常性維持の分子機構と老化における役割」第75回日本細胞生物学会大会シンポジウム、2023年6月28日

**中村修平** 「オートファジー・リソソーム機能の制御機構と老化における役割」名古屋大学 GTR セミナー、2023年3月3日

**中村修平** 「オートファジー・リソソーム機能の理解に基づく老化メカニズムの解明」群馬大学生体調節研究所セミナー、2023年1月30日

**中村修平** 「オートファジー・リソソーム機能の制御機構と老化における役割」徳島大学 第51回先端酵素学研究所セミナー、2023年1月26日

**中村修平** 「リソソーム損傷応答の分子機構とその生理学的意義」第95回日本生化学会大会、2022年11月9日

**Shuhei Nakamura**, Novel regulatory mechanism of TFEB essential for lysosomal homeostasis. 第86回日本循環器学会学術集会、2022年3月13日

**西村多喜** 「リソソーム膜脂質を可視化する脂質プローブの作製」第23回日本蛋白質科学会年会(名古屋)、シンポジウム、2023年7月6日

**西村多喜** 「オンデマンド脂質プローブ作製技術」第96回日本生化学会大会(福岡)、シンポジウム、2023年10月31日

**Taki Nishimura**, Deciphering the Secret Code Hidden in the ATG3 Amphipathic alpha-helix. The 25<sup>th</sup> iCeMS International Symposium (Kyoto), January 11, 2024, (Invited)

**西村多喜** 「レドックス研究における人工脂質プローブの可能性」レドックス R&D 戦略委員会 第4回春のシンポジウム(東京)、招待講演、2024年3月16日

**西村多喜** 「オルガネラ QX における人工脂質プローブの可能性」オルガネラ QX 研究集会

(東京)、シンポジウム、2024年3月29日

**Kota Abe**, Tohru Ishitani, Sex-dependent regulation of vertebrate somatic growth and aging by germ cells. 第56回日本発生生物学会大会、2023年7月24日

**阿部耕太**、石谷太「生殖細胞が体の成長・老化を制御する性特異的メカニズム」日本動物学会 第94回山形大会、2023年9月9日

**Kota Abe**, Tohru Ishitani, Germ cells regulate vertebrate body size and health span in a sex-dependent manner. 第28回 小型魚類研究会、2022年9月1日

Ayami Takauchi, **Kota Abe**, Tohru Ishitani, A gut ceramidase activity determines the species- and strain-specific aging speed. 第28回 小型魚類研究会、2022年9月1日

**阿部耕太**、石谷太「脊椎動物における生殖細胞を介したボディーサイズおよび健康寿命の性依存的制御」第45回 日本分子生物学会年会、2022年11月30日

Ayami Takauchi, **Kota Abe**, Tohru Ishitani, A gut ceramidase activity determines the species- and strain-specific aging speed. 第45回 日本分子生物学会年会、2022年11月30日

**阿部耕太**、石谷太、Investigation of the role of germ cells in the regulation of organismal aging using a shortest-lived vertebrate model. 第54回 日本発生生物学会年会

**藤田尚信** 「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」第23回日本蛋白質科学会年会 (名古屋)、シンポジウム、2023年7月6日

**藤田尚信** 「ショウジョウバエ幼虫筋細胞の生き残りリモデリング」第31回日本 Cell Death 学会 (東京)、招待講演、2023年7月15日

**藤田尚信** 「ショウジョウバエにおけるリソソーム系の生理機能」第95回日本生化学会大会 (名古屋)、シンポジウム、2022年11月9日

**藤田尚信** 「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」第74回日本細胞生物学会大会 (東京)、シンポジウム、2022年6月29日

**藤田尚信** 「多細胞生物にみられる組織をまたいだオートファジー経路」第44回日本分子生物学会 (横浜)、招待講演、2021年12月2日

**吉川治孝** 「Co-Fractionation MS による細胞内巨大タンパク質複合体の解析」第71回質量

分析総合討論会 (大阪)、シンポジウム、2023 年 5 月 17 日

吉川治孝 「Co-Fractionation MS (CF-MS) による細胞内巨大タンパク質複合体の解析」第 23 回日本蛋白質科学会年会 (名古屋)、シンポジウム、2023 年 7 月 6 日

吉川治孝 「定量プロテオミクスによる核小体リボソーム生合成過程の解明」日本プロテオーム学会 2023 年大会 (新潟)、シンポジウム、2023 年 7 月 26 日

## 研究成果

### (総括班)

研究課題名 ポストリソソーム生物学研究領域の創成支援

研究代表者 中村 修平 (奈良県立医科大学・医学部医学科・教授)

研究分担者 藤田 尚信 (東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授)

研究分担者 吉川 治孝 (徳島大学・先端酵素学研究所・助教)

研究分担者 永沼 達郎 (北海道大学・薬学研究院・助教)

総括班では「ポストリソソーム生物学」の創成に向け、領域方針の策定・企画・評価を行った。特に A01 中村班、B02 西村班、C03 藤田班、D04 阿部班の 4 班間で行う領域内融合研究において大きな成果を上げられるような体制を整えることに注力した。本領域の大きな特徴として、様々なモデル生物とバックグラウンド(遺伝学、細胞生物学、発生生物学、脂質生物学、プロテオミクス)を持つ研究者によるチーム編成が挙げられる。そのため、総括班はお互いの研究をよく理解し、これらが円滑に推進され、最大限の成果が得られるようにプラットフォームとしての機能を積極的に果たすことを目的として活動した。また、研究成果の発信や領域外研究者との連携を促進することで、将来の分野拡大につなげる取り組みを進めた。以下に具体的に行った総括班の活動と成果を挙げる。

#### 1. 領域運営方針の策定:

約 3 ヶ月に 1 回の領域メンバーによる web および対面 ミーティングを行い、進捗報告をするとともに、以降の研究の計画について話し合った。また slack を使った情報交換、最新の論文情報の共有などを行った。

#### 2. 全体領域会議の開催:

領域全体の会議を年 1 回、合計 3 回東京大学、徳島大学、北海道大学で開催した。領域会議では領域アドバイザー、外部の先生からのフィードバックをいただき、次の年の計画につなげた。

#### 3. ホームページ・SNS での発信:

ポストリソソーム生物学の領域ホームページを作成し(<https://post-lysosome.jp/>)、領域の研究目的、研究成果、領域会議、シンポジウム等の情報発信を行った。日本生化学会、日本細胞生物学会、日本蛋白質学会で領域主催のシンポジウムを開催し、本領域の目的や成果の一部について紹介した。

(A01 中村班)

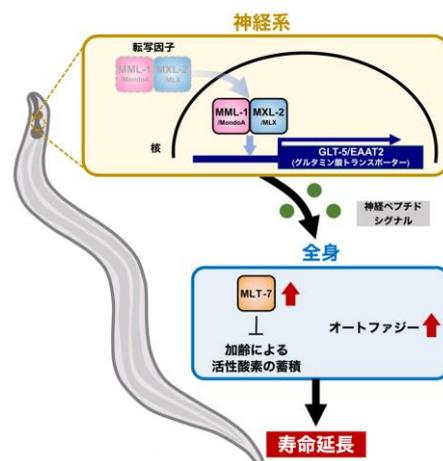
研究課題名 TFEB 依存的・非依存的ポストリソソームシグナルによる個体および生殖寿命制御機

研究代表者 中村 修平 (奈良県立医科大学・医学部医学科・教授)

リソソームの機能亢進が動物の寿命延伸につながるということが報告され、リソソームを起点としたシグナル(ポストリソソームシグナル)の寿命制御における関与が示唆されているが、その実体・作用機序は不明である。本研究では寿命制御に関わる新たなポストリソソームシグナルを同定し、その作用機序を解明することを目的とした。特に、近年の線虫などのモデルを用いた研究から、リソソーム生合成のマスター因子であり、自身もポストリソソームシグナルとして働く転写因子 TFEB の活性化と、これに伴うリソソーム機能亢進が個体寿命の延長に必須であることが示されている。しかし、TFEB の制御機構やリソソーム機能亢進が何故個体寿命延長に繋がるかは不明であり、本研究でこのメカニズム解明を目指した。また TFEB 非依存的にリソソーム機能亢進を介して個体寿命や生殖寿命制御に関わる因子もいくつか同定しており、これらの解析も進めた。

TFEB のインターラクトーム解析により同定した因子の機能解析を進め、TFEB の活性制御の新たな仕組みを明らかにすることができた(論文投稿中)。また、トランスクリプトームおよび ChIP-qPCR 等の解析から TFEB の下流で働く新たな因子としてヘキソキナーゼファミリーに属する HKDC1 を同定した(Cui et al., *PNAS*, 2024)。HKDC1 の抑制によって、特にストレスを受けた際のミトコンドリアとリソソームの恒常性維持が破綻してしまい、個体老化の要因にもなる細胞老化が亢進してしまうことを見出した。HKDC1 の作用機序として、自身のヘキソキナーゼ活性とは独立して、損傷したミトコンドリアの除去やコンタクトサイトを介したリソソームの恒常性維持を担うことが明らかとなった。

また、TFEB とは独立してオートファジー・リソソーム分解系を制御する転写因子 MML-1 の作用機序について線虫をモデルとして用いて解析を進めたところ、特に MML-1 の神経系での働きが生殖細胞を除去した際の寿命延長に必須であることを見出した(Shioda et al., *PNAS*, 2023、図)。さらに、MML-1 の神経系での働きが、他の組織のオートファジーやペルオキシダーゼの活性化に必須であり、これが生殖細胞除去に伴う寿命延長に重要な働きを持つことを示した。また、リソソームは細胞老化や加齢性疾患等で損傷を受けることがわかっており、この損傷を受けたリソソームに対処する応答経路をポストリソソームと位置付け、解析を進めた。本研究で新たに、



(Shioda et al., *PNAS*, 2023)

リソソームが損傷した際に AGC キナーゼのひとつ STK38 が損傷膜にリクルートされ、ミクロオートファジーと呼ばれるオートファジーの一経路を介して膜修復を行うこと、そしてこのことが個体老化や細胞老化の抑制に寄与することを発見した (Ogura et al., *EMBO Rep*, 2023)。TFEB 非依存的にリソソーム機能亢進を介して個体寿命や生殖寿命制御に関わる因子の機能解析は引き続き進める予定である。

#### (B01 西村班)

研究課題名 ポストリソソームシグナルを駆動する脂質因子の解析

研究代表者 西村多喜 (東京大学大学院医学系研究科・特任講師)

研究分担者 大場陽介 (慶応義塾大学薬学部・専任講師)

研究分担者 永沼達郎 (北海道大学大学院薬学研究院・助教)

全ての生物には寿命 lifespan と健康寿命 health span があり、酵母からマウスなどの哺乳類まで高度に保存された遺伝子による寿命制御機構が明らかになっている。その一方で、life/health span は栄養条件などの環境的要因によっても大きな影響を受けることが知られており、脂質代謝なども寿命制御に深く関与していることが分かってきている。さらに最近ではオートファジー依存的な寿命制御や、リソソームリパーゼ Lipl-4 の過剰発現によりリソソームからの脂肪酸供給を増加させると、線虫個体の寿命が延長することが報告されている。これらの一連の結果は生体内に存在する脂質の中でも、特に、リソソーム経路で分解された脂質代謝産物が寿命制御に関与していることを意味している。しかしながら、実際にはリソソーム由来のどのような脂質因子が寄与しているのか、脊椎動物などの高等生物でも同様の現象が見られるのか、またその作用機序など、不明な点が多く残されている。

このような学術的な背景のもと、本計画研究ではリソソームで分解された脂質代謝産物やリソソーム膜脂質の中から、リソソームを起点とした寿命制御シグナルの責任因子を明らかにすることを目指した。以下に、本研究課題から得られた知見を列挙する。

- (1) **A01 中村班と連携して**、過去の研究で用いられたリソソームリパーゼ Lipl-4 を過剰発現した線虫(Lipl-4 TG、寿命が延伸している線虫ライン)のリピドミクス解析を行なった。その結果、過去の知見と概ね一致する脂質変動が確認され、一部の N-アシルエタノールアミン分子種が増加していることが確認された。その一方で、過去の知見とは異なり、オレオイルエタノールアミド(OEA)はそれほどはっきりとした増加が見られず、寿命延長作用には OEA 以外の、未知の脂質代謝産物の関与が示唆された。
- (2) **D04 阿部班と連携して**、リソソームリパーゼを全身で過剰発現した脊椎動物モデル生物

キリフィッシュの作製に取り組んだ。まず全ゲノムシーケンス解析により、リソソームリパーゼが挿入された位置を特定し、既存の寿命関連因子や脂質代謝関連因子には影響がないことを確認した。また肝組織の生化学的な解析からも、リソソームリパーゼ活性が増加していることも確認できた。これらの結果から、リソソームリパーゼを過剰発現させたキリフィッシュ過剰発現(TG)ラインが計画通りに作製出来たと結論付けた。

- (3) **D04 阿部班と連携して**、リソソームリパーゼ過剰発現によるキリフィッシュの寿命への影響を解析した。その結果、オスではTGの方が10%程度、寿命 lifespan が伸びることが分かった。一方で、メスでは野生型とTGで寿命 lifespan に差は見られず、寿命への影響に性差が見られた。
- (4) キリフィッシュ組織の詳細なリピドミクス解析を行った。まず、N-アシルエタノールアミン分子種が豊富に存在する脳組織でターゲットリピドミクス解析を行い、リソソームリパーゼ過剰発現によるN-アシルエタノールアミン産生系への影響を調べた。その結果、キリフィッシュのTGラインの脳組織で検出される量は野生型と同レベルであり、線虫で観察されるようなN-アシルエタノールアミン分子種の増加は見られなかった
- (5) 網羅的なノンターゲットリピドミクス解析では、TGラインで有意に増加している脂質分子種群Xを新しく見出した。興味深いことに、この現象は他の組織では見られず、肝臓でのみ観察された。培養細胞を用いた解析でも、肝臓由来の細胞系であるHepG2でのみ、リソソームリパーゼ過剰発現依存的な脂質分子種群Xの増加が観察されたことから、ユビキタスな現象というよりは、比較的、肝臓特異的なシステムが存在することが示唆された。
- (6) キリフィッシュには遺伝学的には近縁であるものの、SNPsなどの違いから短命系統と長命系統の異なる系統がある。しかしながら、その寿命の違いが何に起因するのか、よく分かっていない。そこで**D04 阿部班と連携して**、これらの2系統を若い個体と老齢個体の2つのtime pointで各組織を回収し、網羅的なノンターゲットリピドミクス解析を行なった。その結果、両系統においてトリアシルグリセロールが老化とともに減少することを見出した。この加齢に伴うトリアシルグリセロールの減少は、系統によらない、キリフィッシュ特有の現象であると考えられた。その一方で系統による違いも観察され、一部の脂質分子種は長命系統でのみ増加しているものがあつた。この中にはリソソームリパーゼTGラインでも共通して増加している脂質分子種群Xが含まれていることが分かった。以上の結果より、脂質分子種群Xは寿命延伸に関与する脂質因子の有力な候補であることが示唆された。

- (7) 電子顕微鏡 (TEM & 3次元 SEM)を用いた形態学的な解析にも取り組んだ。若齢のキリフィッシュ肝臓で多数の脂肪滴が蓄積しているのに対し、老齢のキリフィッシュでは脂肪滴が著しく減少していた。これらの一連の結果は、リポドミクス解析の結果と概ね一致する結果であり、加齢に伴う細胞内脂質代謝の変化を反映しているものと考えられた。
- (8) 独自に開発した、脂質結合 binder のスクリーニング/改変技術を使うことにより、リソソーム膜脂質の一つである、ホスファチジルイノシトールリン脂質 PI3,5P<sub>2</sub> に対するプローブ作製に取り組んだ。PI3,5P<sub>2</sub> に *in vitro* で結合するだけでなく、*in vivo* でも使えるような有用な binder を数クローン取ることに成功した。
- (9) リソソームへ分解産物を輸送する経路である、オートファジーの分子機構に関する解析にも取り組んだ。オートファジー関連分子の一つである ATG3 は LC3 脂質化の最終ステップに関与する分子であるが、非常にユニークな両親媒性  $\alpha$  ヘリックスを有していることを新しく見出した。Python を使った教師なし機械学習により、ATG3 の両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが一般的なもの比べて、かさが小さく、疎水性が低いという物理化学的な性質を有しており、その特徴が効率的な LC3 脂質化反応に重要であることを明らかにした(Nishimura et al., *Sci Adv*, 2023)。また、脂質化された LC3 の N 末端はオートファゴソーム膜上でシス型の膜相互作用をすることも見出した。興味深いことに、このシス型膜相互作用が阻害された変異体では小さいオートファゴソームが増加していた(Zhang, Nishimura et al., *eLife*, 2023)。

このように本研究課題を通して、線虫などの無脊椎動物を用いた研究から見出されたリソソームを起点とする脂質分解依存的な寿命制御シグナルが、キリフィッシュなどの脊椎動物にも保存されていることが分かってきた。しかしながら、関連する脂質代謝産物は線虫とキリフィッシュでは一部異なっており、寿命制御に関わる未知の脂質代謝シグナル経路が存在する可能性が考えられた。本研究はまだ萌芽的なステージではあるものの、学術的に新たな脂質研究分野、および寿命研究分野の創成に繋がる興味深い知見であるとともに、超高齢化社会という喫緊の課題の解決の糸口にもなり得る研究成果であると考えられる。

### (C03 藤田班)

研究課題名

研究代表者 藤田尚信 (東京工業大学 科学技術創成研究院・准教授)

研究分担者 吉川治孝 (徳島大学 先端酵素学研究所・助教)

血液やリンパ液をはじめとした『体液』は、動物の組織間や体腔内を満たしており、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。体液はすべての臓器と接しており、その中には、インスリン様成長因子やスベルミジンをはじめとした、老化・寿命を制御する多くのメディエーターが存在する。それらのメディエーターは起点となる臓器から産生され、体液を介して他の臓器へと送り届けられ作用する。一方、真核細胞に普遍的に存在する分解の場であるリソソームの活性化が個体の生存期間を延長させることが続々と報告されており、リソソームは生存・寿命を制御する重要なオルガネラであるという新しいコンセプトが生まれつつある。したがって、体液中には、生存・寿命を司るリソソーム由来の因子“ポストリソソームメディエーター”が数多く存在すると予想される。しかしながら、どの臓器からどのようなポストリソソームシグナルが発信されているのか、その実体は明らかにされていない。本研究課題では、ショウジョウバエをモデルに用いて、寿命延伸につながるポストリソソーム経路の実体解明を目指し、ポストリソソームシグナルの起点となる臓器の同定と、体液中のポストリソソームメディエーターの網羅的同定の2つの解析に取り組んだ。これらの解析から、『ポストリソソーム生物学』創成の基盤となるデータを取得することを目的とした。

寿命延伸につながるポストリソソームシグナルの起点となる臓器を同定するため、オートファジー・リソソーム経路の活性を制御するマスター転写因子である TFEB, 線虫において過剰発現による寿命延伸が報告されているリソソームリパーゼ Lipl-4 のハエオーソログの臓器特異的な発現を試みた。それらの発現には、ショウジョウバエに整備されている異所的な遺伝子発現系である GAL4/UAS システムを用いた。TFEB もしくは Lipl-4 を全身 (da-GAL4)、脂肪体 (Cg-GAL4)、筋 (Mef2-GAL4)、腸 (NP1-GAL4)、脳神経 (elav-GAL4, GMR-GAL4) にそれぞれ発現させたが、有意な寿命延伸効果は認められなかった。GAL4/UAS システムを用いた場合、TFEB や Lipl-4 の発現レベルが高すぎる可能性がある。今後は、他の発現システムを用いて再度検討する予定である。

ポストリソソームシグナルを解析する際の課題として、生体内におけるオートファジー・リソソーム活性の評価が困難であることがあった。そこで、HA エピトープタグに対する遺伝子コード型の抗体プローブである Frankenbody を利用した新たなシステムの構築を試みた。GFP は中性付近に pKa 値をもつため酸性のリソソーム内腔で消光する一方、RFP は低い pKa 値をもつためリソソームの内腔でも発光する。よって、Frankenbody に GFP と RFP をタンデムにつなぐことにより、HA タグ付きコンストラクトのリソソーム分解を評価することが可能である。ショウジョウバエには各遺伝子に HA タグを付加したゲノムワイドな UAS-ORF の組換え体ライブラリーが整備されつつある。この UAS-ORF の組換え体ライブラリーと、Frankenbody に GFP と RFP をタンデムにつないだコンストラクトの組換え体を組み合わせることにより、生体内の任意の場所で任意のタンパク質のリソソーム分解を評価可能な新たなシステムの構築に成功した (Murakawa et al., *Development*, 2022)。

ポストリソソームシグナルにおいて、オートファジーは中心的な役割を果たしている。そこで、体液中のポストリソソームメディエーターの網羅的同定をめざし、オートファジーに必須な遺伝子である *FIP200* もしくは *Atg9* の欠損が体液プロテオームおよびメタボロームに与える影響を網羅的に解析した。なお、遺伝学的なバックグラウンドを揃えるために、*FIP200* 欠損変異体と *Atg9* 欠損変異体を野生型のハエと十分に戻し交配した後に実験に用いた。体液サンプル中に同定されたおよそ 1,300 種類のタンパク質のうち、野生型と比べて、*FIP200* 欠損変異体と *Atg9* 欠損変異体に共通して変動する体液中のタンパク質を 51 種同定した。また、水溶性代謝産物を対象としたメタボロミクスからは、オートファジーの欠損により変動するメタボライトを 24 種同定することに成功した。このように本研究により、ポストリソソーム生物学研究の基盤となるデータセットを取得することができた。今後は、得られた候補因子と寿命との関連を解析する予定である。

#### (D04 阿部班)

研究課題名 腸内細菌叢とポストリソソームの連関が駆動する脊椎動物個体老化制御メカニズムの解明

研究代表者 阿部耕太 (大阪大学微生物病研究所・特任助教)

寿命や全身レベルの老化の制御メカニズムは未だ謎に包まれている。特に我々ヒトを含む脊椎動物では、マウスなどの従来モデル動物が数年に及ぶ寿命を持ち、解析に膨大な時間がかかるためにメカニズムの理解が遅れている。オートファジー・リソソーム系の活性化は老化抑制手法の非常に有力な候補であるが、実は全身の老化抑制や寿命延伸を引き起こす具体的な分子機構の理解は不十分であった。本研究では、線虫において近年見出された「ポストリソソームシグナル」を全身老化制御のカギを握る分子機構の重要な候補として着目し、新たな老化モデル脊椎動物として注目される超短命モデル脊椎動物「ターコイズキリフィッシュ」(寿命わずか数ヶ月)を用いることで、脊椎動物の老化制御におけるポストリソソームシグナルの機能解明を目指して研究を行った。具体的には、(1) 線虫においてポストリソソームシグナルの直接の活性化因子として同定されたリソソームリパーゼに着目した、脊椎動物におけるポストリソソームシグナルの分子実体の解析、(2) 全身老化と密接な関係があり、オートファジー・リソソーム系の関与が示唆される「腸内細菌叢」に着目した解析、さらに、(3) 線虫において全身のポストリソソームシグナル制御の起点として知られる「生殖細胞」に着目した解析、以上3つを行った。

(1) 線虫では、リソソーム内に局在する脂質の加水分解酵素、リソソームリパーゼを過剰発現させることで、ポストリソソームシグナルが活性化し、寿命が延伸することが報告

されている。しかし、脊椎動物ではその機能の保存性や、シグナルの分子実体は不明である。そこで、Tol2 トランスポゼース法によりリソソームリパーゼを全身で過剰発現させるターコイズキリフィッシュ系統を作出し、老化制御機能の検証や、リピドミクス解析によるシグナルの分子機構解明を進めた。本解析は **B01 西村班との連携** で遂行した。樹立したリソソームリパーゼ過剰発現系統の解析を進めた結果、オス特異的に寿命が延伸し、組織の老化状態も改善することがわかった。また興味深いことに、リピドミクス解析の結果、線虫でポストリソソームシグナルの分子実体として特定された脂質分子種の量には顕著な変動は見られず、それとは異なる脂質分子種の増加を捉えた。この脂質分子種は長命動物で存在量が多いことが知られており、さらに、ターコイズキリフィッシュの超命系統でも増加が見られたことから、これが脊椎動物の寿命延伸作用を担うポストリソソームシグナルの分子実体である可能性が高いと考えられる。今後さらに、キリフィッシュに対する投与実験などにより機能検証を進める予定である。

(2) 研究代表者は、寿命が2倍程度も異なるターコイズキリフィッシュの同種内系統のメタボローム比較解析を行い、ポストリソソームシグナルの分子実体の一つとしても期待されるスフィンゴ脂質代謝経路の産物量が加齢および系統間で顕著に変化することを見出していた。さらに、系統間ゲノム比較解析の結果、腸におけるスフィンゴ脂質の代謝吸収に必要であり、かつ腸内細菌叢をコントロールするセラミド代謝酵素（未発表のため酵素 X とする）に系統間変異があることを突き止めた。長命系統では酵素 X に機能低下型の変異が入っており、興味深いことに、体重に比して寿命が長いコウモリのいくつかの種などでも同型の変異が見つかったことから、これは「長寿変異」である可能性がある。そこで、酵素 X による腸を起点とする老化制御機能を検証するために、ゲノム編集技術により酵素 X のノックアウト系統を作出した。その結果、酵素 X のノックアウト系統では寿命が延伸し、全身組織の老化が抑制される（肝臓の老化細胞蓄積の抑制、脳のタンパク質品質管理機能の維持、運動能力の維持など）ことが確かめられた。

酵素 X は腸管で特異的に発現するため、腸が酵素 X による全身老化制御の起点である可能性が高い。腸の健康指標として腸内細菌叢の多様性（一般に、加齢とともに減少する）を解析したところ、酵素 X ノックアウトでは腸内細菌の多様性が老齢期まで高く維持されることがわかった。さらに、ノックアウトの腸内細菌を野生型に移植した結果、運動能力の改善傾向がみられたため、酵素 X は腸内細菌を介して全身老化をコントロールすることが示唆された。また興味深いことに、野生型では加齢とともに、全身に影響を与える脳の内分泌ホルモンの発現量が異常になるが、ノックアウトでは若齢と同等量を維持していた。以上から、酵素 X は腸の健康状態維持を起点に、脳の内分泌機能制御を介して全身老化を制御するというネットワークが示唆された。今後は、酵素 X が腸内細菌叢を制御する機構解明を目指し、リソソームシグナルの関与も視野に入れ解析を進める。

(3) ポストリソソームシグナルは、線虫における「生殖細胞除去による寿命延伸」という発見から見出された新規シグナル経路である。本研究では、脊椎動物ではその実態がほとんど

ど未解明であるポストリソソームシグナルの手がかりを得るため、ターコイズキリフィッシュにおいて生殖細胞除去を行い、寿命への影響等を解析した。老化に対する生殖細胞の役割に大きな雌雄差が無い無脊椎動物とは異なり、脊椎動物ではオスの生殖細胞は寿命を縮め、メスの生殖細胞は逆に寿命を伸ばすというように、雌雄で全く異なる役割を果たすことがわかった。そして、オスではビタミン D シグナル、メスではエストロゲンシグナルやインスリン/IGF シグナルというように、雌雄で異なる内分泌シグナルが生殖細胞除去によって変動し、全身の老化を制御することが示唆された (Abe et al., *Sci. Adv.*, 2024)。一方、特に生殖細胞除去により寿命が伸びたオスにおいて、上記内分泌シグナルが活性化する上流の機構や、シグナルの下流で寿命を伸ばす直接の機構はわかっておらず、ここにポストリソソームシグナルが関与する可能性がある。今後、リソソーム関連因子の発現変化に着目することによってさらにその可能性を探る。