

令和 6 年 4 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05146

研究課題名（和文）ポストリソソームシグナルを駆動する脂質因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of lipid factors driving post-lysosomal signaling.

研究代表者

西村 多喜（Nishimura, Taki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任講師

研究者番号：70552991

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,500,000円

研究成果の概要（和文）：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に取り組んだ。リソソームからの脂質供給を促進させた脊椎動物モデル生物キリフィッシュ、および培養細胞系を構築した。これらの網羅的なリピドミクス解析と電子顕微鏡を用いた形態観察から、リソソームからの脂質供給を促進させることで、肝臓の脂質代謝が劇的に変化するだけでなく、キリフィッシュの寿命が延伸することを明らかにした。また今後のポストリソソームシグナルの研究において、非常に有用な解析ツールになり得る新たな脂質プローブの作製にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。さらに、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。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to address the key factors responsible for lysosome-derived longevity signals in lysosome-degraded lipid metabolites and lysosomal membrane lipids. A vertebrate model organism, killifish, and cultured cell systems with enhanced lipid supply from lysosomes have been established. Comprehensive lipidomics analysis of these, along with morphological observations using electron microscopy, revealed that enhanced lipid supply from lysosomes not only dramatically changes lipid metabolism in the liver, but also alters the aging phenomena of the killifish. Additionally, we succeeded in producing a new lipid probe that could serve as a highly useful analytical tool in future studies of post-lysosomal signaling.

研究分野：脂質生物学

キーワード：ポストリソソーム 脂質 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

全ての生物には寿命 lifespan と健康寿命 healthspan 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/healthspan 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、カロリー制限や酸化ストレスなどにより life/healthspan の長さが変化すること、さらに最近では脂質代謝が寿命制御に深く関与していることが注目されている。例えば、脂肪酸を多く含む食餌を与えた線虫やショウジョウバエでは、life/healthspan 延長を促進するオートファジー活性の増加が観察される。また、ヒトでも長寿地区でのコホート研究において、血中や肝臓、脳など臓器中の特定の脂質プロファイルの変動が lifespan の長さと強い相関があることが報告されている。このように脂質代謝と寿命の間で興味深い相関関係が報告されているものの、実際には生体内や細胞内のどこで産生された、どのような脂質因子が寄与しているのかその実体は未だ謎に包まれている。

そのような混沌とした状況の中、最近 Wang らのグループから、リソソームで分解された脂質代謝産物が寿命延長作用を示すという報告がなされた。Wang らのグループは lysosomal lipase の一つ *Lip1-4* を過剰発現させることで、リソソームからの脂肪酸供給を増加させた線虫個体の寿命が延長することを示した。さらに、その個体では脂肪酸由来代謝産物の一つである oleoylethanolamide (OEA) が増加しており、OEA 単独処理でも線虫個体の寿命延長が引き起こされることを明らかにした。オートファジー・リソソーム経路が活性化すると線虫個体の寿命が延長することを考慮すると、これらの知見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示唆するものと考えられる(図1)。

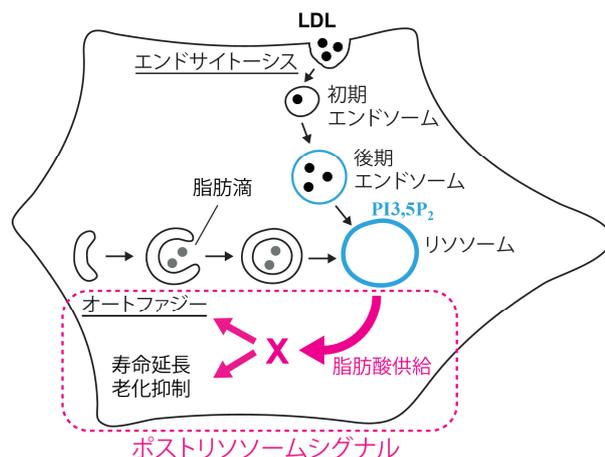


図1 リソソームで分解された脂質代謝産物 X が寿命制御や老化抑制に関与する

2. 研究の目的

本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主な目的とする(図1)。これまでの脂質研究のブレークスルーとなるものの多くは脂質メディエーターなどの活性脂質を同定したものであり、それらの発見が産生経路や作用機構の研究など、その後の研究に大きな波及効果を示してきたという経緯がある。本研究もそのような先駆的な成果や重要な発見に繋げることで、ポストリソソーム研究領域の創成に貢献することを目指す。また本研究では、線虫やキリフィッシュといった異なるモデル生物の長所を組み合わせる事で、単独のモデル生物の一般的な解析では不可能であった寿命制御関連脂質因子のスクリーニングを行う。これは本研究領域内の共同研究により初めて実現出来るものであり、非常に創造性の高い研究と考えられる。さらに、本研究で実施予定の新規脂質プローブの開発は類似報告がなく世界的に見ても独自性の高いアプローチであると言える。いずれも挑戦的ではあるものの、目標を達成出来れば大きな成果と波及効果が期待できるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1)リソソーム内に局在する加水分解酵素を過剰発現させることにより、リソソームからの脂肪酸供給を促進させた脊椎動物モデルを作製する。これまでの寿命研究の多くは線虫がモデル生物として用いられてきたが、線虫の脂肪酸代謝系は脊椎動物とは一部異なっており、また in vitro で活性を示すのに十分な量の脂質因子を線虫から調製するのは難しい。一方でマウス(寿命-3年)やゼブラフィッシュ(寿命-4年)などの一般的な脊椎動物モデルでは、寿命が長いため解析に時間がかかるという欠点がある。そこで、短寿命モデル生物ターコイズキリフィッシュ(寿命-4ヶ月)を導入し、リソソームからの脂肪酸供給を促進させた脊椎動物モデルを構築した。まず Tol2 transposon system を使ってリソソーム局在性の脂質分解酵素のうち、遊離脂肪酸を生成する酵素である Lysosomal lipase (LIPA) を全身で過剰発現させたキリフィッシュのトランスジェニックラインを作製し、寿命への影響を調べる。トランスジェニックラインにおいて healthspan の延長が確認された場合は、特に変化の差が大きい臓器に絞って、特定の脂質分子種を選択的かつ高感度に検出するターゲット質量分析と、標的分子を特定しないノンターゲット質量分析を組み合わせた網羅的なリポミクス解析を行う。すでに寿命延長が確認されている線虫 *Lip14 TG line* のリポミクス解析も同時並行で行うことで、線虫と脊椎動物で共通に

変動するものや大きな違いがあるかどうかも詳細に調べていく。

(2) ホスファチジルイノシトールリン脂質の一つである PI3,5P₂ はリソソーム膜上での mTORC1 活性制御に関与していることから、リソソームを起点とするポストリソソームシグナルにおいて重要な役割を果たしているものと考えられる。しかしながら、一般的に用いられる PI3,5P₂ の脂質プローブは PI3P など他のホスファチジルイノシトールリン脂質とも結合することから、リソソーム膜上の PI3,5P₂ 量を正確に解析することは技術的にまだ難しい。そこで本計画研究では、PI3,5P₂ を特異的かつ高感度に認識する脂質プローブの開発を行う。

4. 研究成果

(1) リソソームリパーゼ Lip1-4 を過剰発現した線虫 Lip1-4 TG のリピドミクス解析を行なった。その結果、ノンターゲット解析では遊離脂肪酸に限らず、一部のホスファチジルコリンやトリアシルグリセロール分子種などの増加が観察された。また N-アシルエタノールアミン類に焦点を当てたターゲット解析では、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。しかし過去の知見とは異なり、オレオイルエタノールアミド(OEA)はそれほどはつきりとした増加が見られず、寿命延長作用には OEA とは異なる未知の脂質代謝産物が関与していることが強く示唆された。解析した線虫サンプルは大阪大学高等共創研究院の中村修平先生(現・奈良県立医科大学)にご供与いただき、線虫の脂質解析は分担者である慶應大学薬学部の永沼達郎先生(現・北海道大学大学院薬学系研究科)(分担研究者)に解析して頂いた。

(2) リソソームからの脂質供給を促進させた脊椎動物モデル生物キリフィッシュを樹立した。このキリフィッシュは、蛍光蛋白質が付加したリソソームリパーゼを全身で過剰発現するトランスジェニックラインであり、リソソームリパーゼが実際に過剰発現していることを蛍光顕微鏡で確認した。また、肝組織のホモジネートを使って、野生型と比べてリソソームリパーゼの活性が増加していることも生化学的に確認出来た。キリフィッシュのトランスジェニックラインの作製と飼育は、大阪大学大阪大学微生物病研究所の阿部耕太先生にお願いした。

(3) キリフィッシュ組織の網羅的なノン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脂質代謝への影響を詳細に調べた。その結果、リソソームリパーゼの基質となるトリグリセリドなどの脂質分子種群が分解され、劇的に減少していることを確認できた。一方、野生型と比べて、リソソームリパーゼトランスジェニックラインで増加しているような脂質分子種も新しく見出した。この網羅的なノンターゲットリピドミクス解析は、慶應大学薬学部の大場陽介先生(分担研究者)に実施して頂いた。

(4) リピドミクス解析の結果から、野生型のキリフィッシュの肝臓では加齢に伴いトリグリセリドが減少することが分かってきた。他の生物種は、加齢に伴って中性脂質が増加することが一般的に知られているので、これは予想外の結果であった。電子顕微鏡を用いて、肝組織の形態学的な解析を実施したところ、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おり、リピドミクス解析による生化学的なデータと一致する結果であった。キリフィッシュ特有の加齢による脂質代謝系の変動が存在しているのかもしれない。

(5) ナノボディや脂質結合ドメインを基本骨格とするペプチドライブラリーを使って、ホスファチジルイノシトールリン脂質 PI3,5P₂ に対するプローブ作製に取り組んだ。in vitro だけでなく、in vivo でも PI3,5P₂ に特異的に結合するクローンを複数単離することに成功した。今後、これらの新規脂質プローブはポストリソソームシグナルの実態解明において、非常に有用な解析ツールになるものと期待される。

(6) 膜脂質環境の変化がオートファジーの活性にどのような影響を与えるのか明らかにするため、オートファジー関連(ATG)分子と膜の相互作用の詳細な解析に取り組んだ。ATG 分子の一つである ATG3 は N 末端に膜結合モジュールである両親媒性 ヘリックスを有している。教師なし機械学習を用いた解析から、この ATG3 の両親媒性 ヘリックスは一般的なものと比べて疎水度が低く、かさの大きな疎水性アミノ酸が少ないという特徴があることを見出した。さらに、このユニークな特徴は ATG3 依存的な ATG8 脂質化反応が効率的に生じるために重要な性質であることを示した(Nishimura, Lazzeri et al., *Science Advances*, 2023)。他の代表的な ATG 分子である ATG8 分子はユビキチンと類似した構造を有するユビキチン様タンパク質であるが、他の分子とは異なり N 末端に 2 つの ヘリックスを有する。私たちは ATG8 分子の C 末が脂質化されると、この N 末端がオートファゴソーム膜とシス型で相互作用することを新しく見出した。ATG8 分子欠損株の電子顕微鏡を用いた CLEM 解析から、オートファゴソーム膜伸長にはこの N 末端とそのシス型相互作用が必要であることを示した(Zhang, Nishimura et al., *eLife*, 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhang Wenxin, Nishimura Taki, Gahlot Deepanshi, Saito Chieko, Davis Colin, Jefferies Harold BJ, Schreiber Anne, Thukral Lipi, Tooze Sharon A	4. 巻 12
2. 論文標題 Autophagosome membrane expansion is mediated by the N-terminus and cis-membrane association of human ATG8s	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e89185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.89185	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
1. 著者名 Nishimura Taki, Lazzeri Gianmarco, Mizushima Noboru, Covino Roberto, Tooze Sharon A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Unique amphipathic helix drives membrane insertion and enzymatic activity of ATG3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadh1281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adh1281	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
1. 著者名 Tooze Sharon A., Zhang Wenxin, Lazzeri Gianmarco, Gahlot Deepanshi, Thukral Lipi, Covino Roberto, Nishimura Taki	4. 巻 598
2. 論文標題 Membrane association of the <sc>ATG8</sc> conjugation machinery emerges as a key regulatory feature for autophagosome biogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14676	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 Nishimura Taki, Lazzeri Gianmarco, Tooze Sharon A., Covino Roberto	4. 巻 20
2. 論文標題 ATG3 proteins possess a unique amphipathic helix essential for the Atg8/LC3 lipidation reaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 212 ~ 213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2023.2255458	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 Zhang Wenxin, Nishimura Taki, Tooze Sharon	4. 巻 14
2. 論文標題 Real-Time Monitoring of ATG8 Lipidation In Vitro Using Fluorescence Spectroscopy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e4917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4917	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10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Taki Nishimura, Gianmarco Lazzeri, Noboru Mizushima, Roberto Covino, Sharon A. Tooze
2. 発表標題 オートファジー関連分子ATG3の両親媒性 ヘリックスはユニークな機能を有する
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taki Nishimura, Gianmarco Lazzeri, Noboru Mizushima, Roberto Covino, Sharon A. Tooze
2. 発表標題 Conserved ATG3 Amphipathic α -helix Ensures LC3 Lipidation Reaction
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taki Nishimura, Wenxin Zhang, Deepanshi Gahlot, Chieko Saito, Colin Davis, Harold B. J. Jefferies, Anne Schreiber, Lipi Thukral, Sharon A. Tooze
2. 発表標題 Human ATG8のN末を介したシス型膜相互作用はオートファジー活性制御に関与する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村多喜, 水島昇
2. 発表標題 多様なオルガネラ膜脂質環境の可視化を目指した脂質プローブ作製技術
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 西村多喜
2. 発表標題 リソソーム膜脂質を可視化する脂質プローブの作製
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村多喜
2. 発表標題 オンデマンド脂質プローブ作製技術
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 西村多喜
2. 発表標題 リソソームでの脂質分解を促進させた脊椎動物モデル
3. 学会等名 [ワークショップ] ポストリソソーム脂肪酸代謝経路の解明
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村多喜, Gianmarco Lazzeri, 水島昇, Roberto Covino, Sharon A. Tooze
2. 発表標題 オートファジー関連分子ATG3の両親媒性 ヘリックスのユニークな性質
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村多喜
2. 発表標題 Deciphering the Secret Code Hidden in the ATG3 Amphipathic α -Helix
3. 学会等名 The 25th iCeMS International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西村多喜
2. 発表標題 レドックス研究における人工脂質プローブの可能性
3. 学会等名 レドックスR&D戦略委員会 第4回 春のシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2024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
研究分担者	大場 陽介 (Yohsuke Ohba) (90968603)	慶應義塾大学・薬学部 (芝共立)・講師 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	永沼 達郎 (Naganuma Tatsuro) (60779619)	北海道大学・薬学研究院・助教 (10101)	

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