

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05147

研究課題名（和文）体液のマルチオミクス解析による寿命を制御するポストリソソーム経路の解明

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of post-lysosome mediators in body fluid

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） 25,500,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内の分解の場であるリソソームが生存・寿命を制御するシグナルを発信するという新しいコンセプトが生まれつつある。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かった。本研究では、ポストリソソームシグナルの起点となる臓器を探索すると共に、開放血管系を持つショウジョウバエの利点を生かした体液の比較マルチオミクス解析により、オートファジー・リソソーム系の不全が体液プロテオームとメタボロームに与える影響を網羅的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体液は、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。体液中には、インスリン様成長因子やポリアミンをはじめとした、老化・寿命を制御する多くのメディエーターが存在する。近年、リソソーム活性と個体の生存期間との相関が続々と報告されているが、その間をつなぐメディエーターは不明であった。私たちは、開放血管系を持ち体液の解析が容易であるショウジョウバエの利点を活かすことにより、オートファジー・リソソーム系の機能低下が体液中のプロテオームとメタボロームに与える影響を網羅的に明らかにすることに初めて成功した。本研究から得られた成果は、臓器間関連に働くポストリソソームシグナルを理解する際の礎となるものである。

研究成果の概要（英文）：It is proposed that lysosomes transmit signals that control animal survival and lifespan; however, their nature and mechanisms are poorly understood. In this study, we comprehensively analyzed the effect of the loss-of-function of the autophagy-lysosome system on the proteome and metabolome in the body fluid by comparative multi-omics analysis, providing the fundamental data sets for the study of post-lysosome signals.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム オートファジー 体液 ショウジョウバエ プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

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。

2. 研究の目的

ショウジョウバエをはじめとした節足動物は開放血管系をもつため、体液を一つのプールとして容易に回収できる。また、ショウジョウバエはオートファジー・リソソーム系の不全に強い耐性を持つことから、体液中のポストリソソームメディエーターの解析に適したモデル生物であると言える。本研究では、ショウジョウバエをモデルに用いて、寿命延長につながるポストリソソーム経路の実体解明を目指し、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。

3. 研究の方法

ポストリソソームシグナルの起点となる臓器の解析には、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 システムを利用した。リソソーム機能の活性化には、Transcription factor EB (TFEB)の過剰発現を用いた。TFEB はオートファジー・リソソーム系に働く一群の遺伝子の発現を制御するマスター転写因子であり、TFEB の過剰発現は幅広い生物種でリソソーム機能を活性化することが報告されている。そこで、GAL4 システムを利用して臓器特異的に TFEB を過剰発現させ、寿命の延伸がみられるものを探索した。

体液中のポストリソソームメディエーターを網羅的に同定するため、リソソーム活性の亢進もしくは抑制が、体液のプロテオームおよびメタボロームに与える影響を解析した。細胞内の大規模な分解経路であるオートファジーは、ポストリソソームシグナルにおいて中心的な役割を果たしていることから、ポストリソソームシグナルの抑制には、オートファジー関連遺伝子の欠損体を用いた。野生型および変異型のショウジョウバエから体液を回収し、それらの比較プロテオミクスおよびメタボロミクスを実施し、オートファジーの欠損により体液中の存在量が有意に変動するものを同定した。

4. 研究成果

(1) TFEB の過剰発現によるリソソーム機能の亢進

ショウジョウバエにおいても TFEB の過剰発現によりリソソーム関連遺伝子の発現が亢進するかどうか検討した。TFEB のショウジョウバエオースログである MITF を哺乳動物の肝臓と脂肪組織の機能を併せ持つ脂肪体に発現させて、遺伝子発現に与える影響を RNA-seq により解析した。その結果、TFEB の発現によりリソソーム酵素やリソソームの酸性化に働く V-ATPase 複合体のサブユニットの発現が大幅に上昇することを明らかにした。さらに、酸性オルガネラを標識する試薬である LysoTracker のシグナルが有意に高くなったことから、TFEB の過剰発現によりリソソーム内腔の酸性化が亢進していると判断した。

(2) TFEB の過剰発現が寿命に与える影響の解析

TFEB の過剰発現によるポストリソソームシグナルの増強が寿命延伸効果を示すかどうか検討した。全身性 (da-GAL4)、脂肪体 (Cg-GAL4)、筋 (Mef2-GAL4)、腸 (NP1-GAL4)、もしくは脳神経 (elav-GAL4, GMR-GAL4) 特異的な GAL4 システムを用いて TFEB を過剰発現させたが、寿命延伸効果は見られず多くの個体は発生初期に致死性を示した。また、TFEB の発現量を低下させても寿命の延伸効果は認められなかった。

インシュリン/IGF シグナルの抑制は、多くの生物種において個体の寿命を延伸させることが知られている。そこで、インシュリン/IGF シグナルの抑制による寿命延伸が、TFEB を介したポストリソソーム経路に依存しているかどうか検討した。インシュリンレセプターの基質である Chico の低形質の変異体では、有意な寿命延伸が見られることを確認した。Chico 変異体の全身 (da-GAL4, actin-GAL4) もしくは神経系特異的 (elav-GAL4) に TFEB をノックダウンしたが、Chico 変異体の寿命延伸が TFEB に依存していることを示すデータは得られなかった。

(3) Lip1-4 の過剰発現が寿命に与える影響の解析

線虫ではリソソームリパーゼの一つである Lip1-4 の過剰発現により寿命の延伸が報告されている。そこで、ポストリソソームシグナルを亢進させる手段として、Lip1-4 のショウジョウバエオルソログ(CG6113)の過剰発現を試みた。TFEB の実験と同様に、複数の GAL4 系統を用いて検討したが、Lip1-4 の過剰発現による寿命延伸効果は認められなかった。ショウジョウバエにおいてリソソーム機能を適度に亢進させる方法の確立は、今後の課題である。

(4) 生体における新たなオートファジー・リソソーム活性評価系の確立

ポストリソソームシグナルの研究を進めるにあたり、生体内のオートファジー・リソソーム機能を評価するシステムが必要であることから、新たなシステムの構築を試みた。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 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作成した。GFP はリソソーム内腔で消光する一方、RFP はリソソームの内腔でも発光するため、GFP と RFP をタンデムにつなぐことによりリソソーム分解を評価することができる。また、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。よって、両者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することが可能になった。本システムはリソソーム機能を亢進させる方法を確立する際に有用である。

(5) オートファジー欠損が体液プロテオームに与える影響

オートファジーは、ポストリソソームシグナルの中心的な役割を果たしていることから、ポストリソソームシグナルの抑制には、オートファジーに必須な遺伝子である FIP200 もしくは Atg9 欠損体を用いた。遺伝学的なバックグラウンドを揃えるために、野生型のハエと十分に戻し交配した後に実験に用いた。各遺伝型の 3 齢幼虫から体液を回収し、その中に含まれるタンパク質を質量分析により解析したところ、およそ 1,300 種類のタンパク質が同定された。体液の比較プロテオミクスにより、FIP200 欠損変異体と Atg9 欠損変異体に共通して増加するタンパク質を 51 種同定することができた。その中には、CNBP などの老化との関連が知られているタンパク質が複数含まれていた。よって、それらはポストリソソームシグナルと寿命とをつなぐメディエーターの有力な候補であると考えられる。

(6) オートファジー欠損が体液メタボロームに与える影響

FIP200 もしくは Atg9 の欠損が、体液中の代謝産物レベルに与える影響を解析した。戻し交配に用いた野生型と比較して、オートファジー欠損体において有意に減少した代謝産物の中には、ほぼ全ての必須アミノ酸が含まれていた。ちなみに、非必須アミノ酸レベルの低下は見られなかった。解析に用いたショウジョウバエは通常の栄養培地で飼育したものである上に、野生型と変異型の摂食量には差が見られなかったことから、通常の飼育条件下でもオートファジーは体液中のアミノ酸レベルの維持に寄与していると考えられる。必須アミノ酸の一つであるメチオニンやその代謝産物であるポリアミンと老化・寿命との関連が知られていることから、必須アミノ酸レベルの変動は寿命延伸に関わるポストリソソームシグナルの起点であると予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0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 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11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リモデリング
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 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 江橋咲慧、川口紘平、大江由佳子、吉川治孝、藤田尚信
2. 発表標題 体液プロテオスタシスにおけるショウジョウバエ腎細胞の役割
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川治孝
2. 発表標題 Co-Fractionation MSによる細胞内巨大タンパク質複合体の解析
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川治孝
2. 発表標題 Co-Fractionation MS (CF-MS) による細胞内巨大タンパク質複合体の解析
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 吉川治孝
2. 発表標題 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
3. 学会等名 本プロテオーム学会2023年大会 JPrOS2023 (21st JHUP0)
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 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 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

1. 発表者名 村川直柔、中村毅、川口鉦平、村山歩駿、木村宏、藤田尚信
2. 発表標題 Downregulation of Lysosomal Activity in the Larval Fat Body Plays a Role in the Metamorphosis in Drosophila
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

蛹期に備えて幼虫脂肪体のオートファジーは抑制される
<https://www.titech.ac.jp/news/2022/063216>

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	吉川 治孝 (Yoshikawa Harunori) (60709567)	徳島大学・先端酵素学研究所・助教 (16101)	

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