

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05064

研究課題名(和文) リソソーム損傷時のオートファジー因子によるTFEB新規制御機構とその生理学的意義

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanism of TFEB by autophagy genes during lysosomal damage response

研究代表者

中村 修平 (Nakamura, Shuhei)

大阪大学・高等共創研究院・准教授

研究者番号：00510611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内外の様々な要因で損傷を受けたリソソームは有害となることが知られているが、細胞がどのようにこれに対処するかは不明であった。我々は、オートファジー・リソソーム生合成のマスター転写因子であるTFEBの活性化が損傷リソソーム修復に必須の働きをすることを見出した。さらにこの活性化はオートファゴソームマーカーとして知られるLC3タンパク質のnon-canonicalな機能に依存していることを明らかにした。また、マウスを用いた動物実験からこのLC3によるTFEB活性化がリソソーム損傷を伴うシュウ酸カルシウム腎症の病態悪化を防いでいることが示唆された(中村ら 投稿中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子TFEBは飢餓などの様々なストレスで活性化され、オートファジーおよびリソソーム生合成を転写レベルで制御するマスターレギュレーターである。近年TFEBの活性化は神経変性疾患、脂質代謝の改善、健康寿命延長につながり有益となることが示された為、その制御機構に注目が集まっている。本研究により同定したTFEBの新規制御機構は我々が明らかにしたシュウ酸カルシウム腎症のみならず神経変性疾患などリソソーム損傷を伴うことが知られているその他の疾患においても働いている可能性があり、今後のさらなる解析によりこの機構をもとにした治療法確立に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sensing and clearance of dysfunctional lysosomes is critical for cellular homeostasis. Here, we found that during the lysosomal damage response, Transcription factor EB (TFEB), a master transcriptional regulator of lysosomal biogenesis and autophagy, was activated dependent upon the non-canonical LC3 function. Furthermore, we demonstrated the presence and importance of this TFEB activation mechanism in kidneys in a mouse model of oxalate nephropathy accompanying lysosomal damage. A proximal tubule specific TFEB-knockout mouse exhibited progression of kidney injury induced by oxalate crystals. Together, our results revealed novel and unexpected mechanisms of TFEB activation by LC3 and their physiological relevance during the lysosomal damage response.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム TFEB オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞恒常性の維持機構であるオートファジーは、特徴的な二重膜からなるオルガネラであるオートファゴソームにより細胞内成分を取り囲み、リソソームと融合した後に内容物の分解を行う細胞内クリアランスの担い手である。近年の研究からオートファジーの多彩なターゲットが明らかとなってきたおり、これには損傷を受けたミトコンドリアなどのオルガネラも含まれる。リソソームは生体内でシュウ酸結晶、尿酸結晶などの結晶物、脂質、薬剤等によりしばしば損傷を受けるが、この際内部の消化酵素や活性酸素が流出するため、損傷リソソームは細胞にとって有害な存在となる。以前我々は損傷を受けたリソソームもオートファジーにより隔離・修復される事を見出し(“リソファジー”)、オートファジーがリソソームの恒常性維持と細胞の保護に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Maejima et al., EMBO J, 2013)。さらに我々は高尿酸血症下の腎障害で、尿酸結晶がリソソームの膜に損傷を与え、これをリソファジーにより適切に隔離・除去できない事が、この病態悪化につながることを示している。リソソームが損傷を受けると、その膜の破れを感知してオートファゴソームが損傷リソソームを囲み、その後残っている正常なリソソームと融合する事で損傷リソソームを除去していると考えられる。興味深い事に、損傷リソソームが除去されている過程でもリソソームの数は一定しており、リソソームの生合成経路とリソファジーがリンクしている可能性が示唆されるが、その詳細は不明である。近年イタリア TIGEM の Prof. Ballabio らのグループによりリソソーム生合成、オートファジー関連因子の遺伝子を転写レベルで活性化させるマスターレギュレーターとして転写因子 TFEB (Transcription Factor EB) が同定され (Settembre et al., Science, 2011)、その役割や制御機構の解明が注目されている。TFEB の制御機構については、オートファジーが誘導される飢餓時での解析が進んでいる。富栄養時は栄養センサーである mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) が TFEB を直接リン酸化することでその核移行を抑制し、一方飢餓時には mTOR が不活化することで TFEB は脱リン酸化、核移行し多くのオートファジー因子、リソソーム制御因子の転写を上昇させる。しかしながら、他のオートファジー誘導条件化における TFEB の動態や機能は不明な点が多い。我々は、“リソファジー”と、“TFEB によるオートファジー・リソソーム生合成制御経路”のクロストークに着目し解析を始めたところ、リソソーム損傷によっても TFEB の核移行が引き起こされることを見いだした。さらに驚いた事にこの核移行が飢餓時とは異なり、一部のオートファジー制御因子の働きに依存しているという興味深い結果を得ている。これらの結果は TFEB の下流でオートファジーが転写レベルで制御されるという以前の知見に加え、TFEB の核移行・活性自身もリソソーム損傷によるオートファジー誘導と関連した新規の分子機構により制御され、これらが協調的にリソソームの恒常性維持に寄与している可能性を示唆させる。そこで本研究では以下の目的のもとに研究を遂行し、オートファジー因子による TFEB 制御機構とその生理学的意義を明らかにする。

### 2. 研究の目的

オートファジー制御因子がリソソーム生合成・オートファジーのマスター転写因子 TFEB を活性化し、オートファジーと TFEB が協調してリソソーム恒常性維持に関与するという興味深い結果を得ている。そこで本研究では下記3つの目的を立て、この TFEB の新規活性化機構を哺乳類培養細胞を用いて解明するとともに、その生理学的意義をリソソーム損傷を伴う腎障害モデルマウスを用いて明らかにする。

#### (1) リソソーム損傷時の TFEB 動態およびリソファジーとのクロストーク解析

- (2) リソソーム損傷時の新規 TFEB 制御機構の解明
- (3) 腎障害モデルマウスを用いた TFEB 機能の解明

### 3. 研究の方法

- (1) リソソーム損傷時の TFEB 動態およびリソファジーとのクロストーク解析

哺乳類培養細胞を用いてリソソームを特異的に損傷する薬剤 LL0Me を用い損傷リソソーム存在下での TFEB の局在変化、リン酸化状態等の動態をさらに詳細に解析する。また、オートファジーに必要な因子群のノックアウト(KO) 細胞のコレクションを用いどの因子が TFEB の核移行に影響を及ぼすかを明らかにする。

- (2) リソソーム損傷時の新規 TFEB 制御機構の解明

哺乳類培養細胞を用いた細胞学的解析により(1)で得られた結果をもとに TFEB 制御機構を明らかにする。

- (3) 腎障害モデルマウスを用いた TFEB 機能の解明

リソソーム損傷を伴うシュウ酸カルシウム腎症などの結晶性腎症における TFEB の挙動を明らかにする。また尿細管特異的 TFEB KO マウスを作成し、この病態における TFEB の役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) リソソーム損傷時の TFEB 動態およびリソファジーとのクロストーク解析

これまでオートファジーに必須の因子が多く単離されているが、その中で LC3 タンパク質はオートファジー誘導時に一連の酵素群によって脂質化修飾を受け LC3-I から LC3-II (脂質化 LC3) へと変換され、オートファゴソームに特異的に局在することが知られている。このため LC3 は最も信頼できるマーカーとして分野内外で広く認知・利用されてきた。リソソーム損傷時の TFEB の活性化をオートファジーに関与する様々な因子のノックアウト細胞を作製し解析したところ、LC3 脂質化に関与する因子(ATG3, ATG7, ATG16L1 など)のノックアウト細胞で低下するという非常に興味深い結果を得た。また LC3 にはパラログ 6 つが存在するが、この全てをノックアウトした細胞でも同様の結果が得られた。一方、飢餓時の TFEB 移行はどのオートファジー不全細胞でも正常におこった。これらのことからリソソーム損傷時にのみ見られる LC3 脂質化に依存した新しい TFEB 活性化メカニズムの存在が示唆された。

- (2) リソソーム損傷時の新規 TFEB 制御機構の解明

リソソーム上のカルシウムチャネル TRPML1 を介した、リソソームからのカルシウム流出が TFEB の活性化に重要な働きをすることが知られていた(Medina et al., 2015)。細胞学的解析から、リソソーム損傷とこれによって生じるリソソームからのカルシウム流出が LC3 の脂質化とリソソームへのリクルートを引き起こすことがわかった。また、リソソームへリクルートされた脂質化 LC3 は TRPML1 と相互作用しており、カルシウムイメージングの結果からこの相互作用がチャネルの機能をさらに増強することで TFEB 活性化を引き起こすのではないかという結果が得られた。

- (3) 腎障害モデルマウスを用いた TFEB 機能の解明

大阪大学、大学院医学系研究科 腎臓内科学との共同研究により、新規に同定した脂質化 LC3 による TFEB の制御の生理学的意義についてリソソーム損傷を伴うことが知られている結晶性腎症の一つであるシュウ酸腎症モデルを用いて検証した。コントロールマウスではシュウ酸投与により腎臓の近位尿細管で TFEB が活性化する一方、LC3 の脂質化に必須な Atg5 を欠損したマウスではこれが起きないことを見出した。さらに TFEB の近位尿細管特異的 KO マウスを用いてシュウ酸投与後の腎障害を調べたところ、KO マウスで尿細管障害や腎機能の増悪がみられ脂質化 LC3 による TFEB の活性化がこれらリソソーム損傷を伴う腎症の病態悪化を防いでいることが明らかとなった。以上の結果を現在論文に投稿しリバイスを受けている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura, S. et al.,	4. 巻 10
2. 論文標題 Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08729-6.	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 Nakamura, S. and *Yoshimori, T	4. 巻 130
2. 論文標題 New insights into autophagosome-lysosome fusion.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 209-1216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1242/jcs.196352">https://doi.org/10.1242/jcs.196352</a> .	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 -

1. 著者名 Nakamura, S. and *Yoshimori, T	4. 巻 41
2. 論文標題 Autophagy and Longevity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cells	6. 最初と最後の頁 65-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2333">https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2333</a>	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 中村 修平、吉森 保	4. 巻 18
2. 論文標題 哺乳類オートファジーの分子機構と癌における役割	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Word on Digestive Surgery	6. 最初と最後の頁 2-3
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0件

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中村修平、吉森保	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版(株)	5. 総ページ数 963
3. 書名 医学のあゆみ オートファジー-分子機構・生物学的意義・疾患との関わり】オートファジーと疾患 オートファジーと 寿命延長	

1. 著者名 中村 修平、吉森 保(第20章 「オートファジーと老化」分担執筆)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 241
3. 書名 オートファジー 分子メカニズムの理解から病態の解明まで	

1. 著者名 中村 修平、吉森 保 (「オートファゴソーム成熟と融合の分子機構」分担執筆)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 224
3. 書名 The オートファジー 研究者たちの集大成が見える最新ビジュアルテキスト	

〔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
---------------------------	-----------------------	----