

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16118

研究課題名(和文) リソソームはいかにしてストレスを感知し、恒常性維持機構を活性化させるのか?

研究課題名(英文) How do lysosomes sense stress and activate homeostasis mechanisms?

研究代表者

江口 智也 (Eguchi, Tomoya)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：60829050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：疾患関連遺伝子産物であるLRRK2がリソソームのストレスに反応することを発見し報告していたが、リソソームのストレスが何によって検知されてLRRK2の反応を活性化させるかは道であった。本研究ではオートファジーに重要な一部の因子がオートファジーとは別の機能としてリソソームのストレス応答に関与し、それがLRRK2によるストレス応答の上流となっていることを明らかにした。加えてリソソームをはじめ様々なオルガネラの脂質膜損傷を検知する新たなタンパク質を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リソソームの機能低下は神経変性疾患をはじめ様々な疾患と関連することが示唆されている。本研究ではパーキンソン病などに関わるLRRK2がリソソームストレスに反応するメカニズムを解析し、オートファジー因子の一部が関与していることを明らかにした。本研究によりリソソームのストレス検知機構の一端が解明され、リソソーム機能の向上性がどのように保持されているのかを解明する手がかりが得られたとともに、オートファジー関連因子の新しい非オートファジー機能が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We had discovered and reported that LRRK2, a disease-related gene product, responds to lysosomal stress, but what detects lysosomal stress and activates the LRRK2 response was a way. In this study, we show that some factors important for autophagy are involved in the lysosomal stress response as a function separate from autophagy. The LC3-conjugation system is upstream of the stress response by LRRK2. In addition, we discovered a new protein that detects lipid membrane damage in various organelles, including lysosomes.

研究分野：分子生物学

キーワード：リソソーム オートファジー LRRK2

1. 研究開始当初の背景

LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2)は家族性パーキンソン病原因遺伝子の1つである。加えてゲノムワイド関連解析にてクローン病やハンセン病など炎症・感染性の疾患の病態とも関連が示唆されている。*LRRK2*の生理的機能はいまだ不明な点が多いが、最近我々は*LRRK2*がリソソームストレスに応答しリソソームの恒常性維持に寄与することを報告した。クロロキンなどで細胞を処理すると*LRRK2*は細胞質からリソソームへと集積する。さらにリソソーム上において基質であるRab8、Rab10をリン酸化しこれらをリソソーム膜上で安定化・集積させる。これらのRab GTPaseがEHBP1、EHBP1L1といったエフェクタータンパク質を介してリソソームの形態維持やリソソームエキソサイトーシスを誘導し、リソソームの恒常性維持に寄与すると考えられる。しかしながらそもそもリソソーム自身がどのようにストレスを検知して、それが*LRRK2*へと伝えられるのかは不明であった。

2. 研究の目的

*LRRK2*によるリソソームストレス応答においてストレスがどのように検知され*LRRK2*の応答が活性化されているのか、そのメカニズムを明らかにする。またこれ以外にも生体内では様々なオルガネラストレスが生じる可能性があり、そのようなストレスは種々の疾患とも関連すると考えられている。そのようなストレスに対する未知のセンサーを探索し解析する。

3. 研究の方法

(1) *LRRK2*陽性リソソームの特性評価

培養細胞に対しリソソーム指向性試薬であるクロロキン処理を行った。クロロキンはリソソーム内に蓄積しリソソームの肥大化とpH上昇を誘導する。クロロキンによって*LRRK2*のリソソームターゲティングが誘導されるが、この時リソソーム上において*LRRK2*と共局在するような因子を探索した。また*LRRK2*陽性となっているリソソームの微細形態を蛍光-電子顕微鏡相関法(CLEM)で解析を行った。

(2) LC3-conjugation systemと*LRRK2*の上下関係の解析

RAW264.7細胞に対しオートファジー関連遺伝子のsiRNAを導入し、*LRRK2*のリソソームストレス応答を解析した。*LRRK2*自体の局在は免疫染色で解析、*LRRK2*による基質のリン酸化はリン酸化Rab10抗体を用いたウェスタンブロッティングで解析、さらに*LRRK2*を介したストレス依存性リソソームエキソサイトーシスは培地中に放出されたリソソーム分解酵素(カテプシンD)量をウェスタンブロッティングで解析した。

(3) HRASLS3の膜損傷検知機構の解析

培養細胞にHRASLS3を発現させ、さらに薬剤によってオルガネラ膜の断裂を誘導した。この時のHRASLS3の細胞内局在を蛍光顕微鏡にて観察した。またセルフリー翻訳系を用いてHRASLS3リコンビナントタンパク質を作成し、これをセミインタクト細胞やリポソームと混合し脂質膜に集積するかどうか解析を行った。

4. 研究成果

(1) 被ストレスリソソーム上において*LRRK2*はLC3と共局在する

培養細胞に対してクロロキン処理を行いリソソームにストレスを負荷した。その結果*LRRK2*が細胞質から被ストレスリソソームへと局在変化した。さらにその際にLC3と共局在した。またマクロファージ系培養細胞であるRAW264.7細胞にzymosan(酵母の細胞壁画分)を貪食させた際もファゴリソソームへの*LRRK2*集積が認められ、またLC3とも共局在した。LC3はオートファゴソームのマーカーであるが、近年ストレスを受けたリソソームや病原体を取り込んだファゴソームの膜上にも局在化することが報告されている。オートファゴソームは2重膜構造であるが非ストレスリソソームやファゴソームは1重膜構造である。*LRRK2*、LC3陽性の構造が1重膜の構造であることを確認するためCLEMにて解析を行った。GFP-LC3および*LRRK2*-mCherryを発現するHEK293細胞に対しクロロキン処理を行いLC3、*LRRK2*共陽性となっている構造を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果この構造が確かに1重膜構造でありストレスを受けたリソソーム膜であることが確認された。

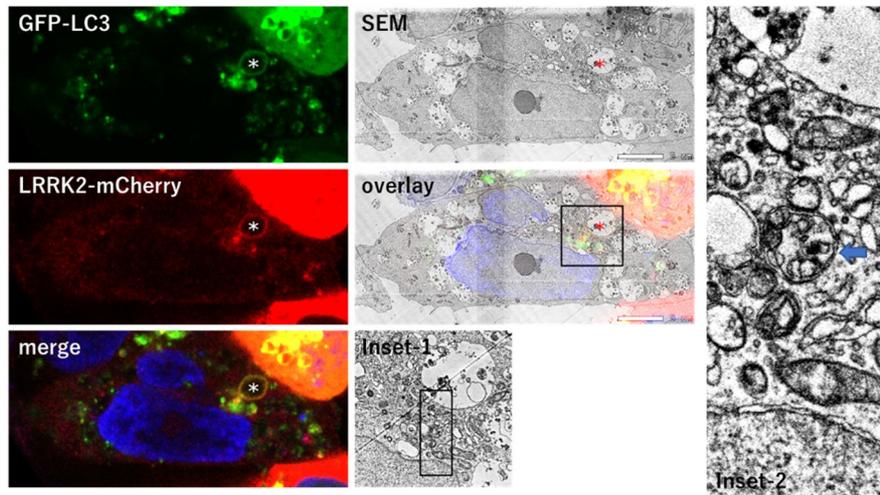


図 1: LC3、LRRK2 陽性オルガネラの CLEM
 クロロキン処理時において LC3 と LRRK2 は空胞状の構造において共局在した。別の実験にてこの構造は LAMP1 陽性のリソソームであることを確認している。この構造を電子顕微鏡で解析したところ十膜構造であることが確かめられた。周辺にあるオートファゴソームや核膜は二重膜であることも確認できた。

(2) LC3-conjugation system は LRRK2 のリソソーム局在化に必要である
 RAW264.7 細胞に対し Atg5, Atg7, Atg16L1 の siRNA を導入しクロロキン・zymosan 処理を行った。これらの遺伝子は LC3 の脂質化に直接関与する遺伝子でありマクロオートファジー時およびリソソームストレス時に LC3 を膜上の PE に結合させるのに必須である。オートファジー関連遺伝子のノックダウンによって LRRK2 のリソソーム局在化、ファゴソーム局在化や有意に抑制された。またクロロキン処理時のリソソームエキソサイトーシスもオートファジー遺伝子の抑制によって低下した。p22、Rubicon はマクロオートファジーには関与しないがファゴサイトーシス時の LC3 脂質化には必要な遺伝子である。これらの遺伝子のノックダウンでもファゴソーム膜上への LRRK2 局在化が抑制された。逆に LRRK2 のキナーゼ活性阻害剤は LC3 の脂質化には影響を与えなかった。このことから LC3-conjugation system のマクロオートファジー非依存的な機能が LRRK2 のリソソーム/ファゴソームストレス応答を制御していると考えられた。ATG16L1 の C 末端にある WD40 ドメインはマクロオートファジーには必要ないがリソソーム上での LC3 脂質化には必要であるとされている。ATG16L1 KO 細胞に野生型 ATG16L1 あるいは WD40 ATG16L1 を導入し LRRK2 のリソソームストレス応答を pRAB10 量を指標に解析した。その結果野生型を導入した細胞ではクロロキン処理に応答し pRab10 が増加したのに対し、なにも導入しなかった細胞あるいは WD40 変異体を導入した細胞では pRab10 量が変化しなかった。この結果からも LC3-conjugation system のマクロオートファジー非依存的機能の重要性が支持された。最近の研究でリソソームストレス時にはリソソーム膜上のプロトンポンプの V0 サブユニット、V1 サブユニットの結合が亢進し、これが ATG16L1 をリクルートすることで LC3 の脂質化が誘導されることが報告されている。この知見と今回の我々の研究により V-ATPase が直接的なリソソームストレスセンサーとして機能し、これが LC3-conjugation system を介して LRRK2、RAB GTPase 経路を活性化させると考えられた。

(3) HRASLS3 はリソソームを含むオルガネラ膜の断裂に応答し集積する。
 GFP-HRASLS3 を培養細胞に発現させたところ細胞質に局在した。しかしながら LLOMe という薬剤でリソソーム膜を損傷させたところ HRASLS3 はリソソームへ、またアポトーシスを誘導しミトコンドリア外膜に穴をあけたところ HRASLS3 はミトコンドリアへと局在変化したこのことから HRASLS3 はオルガネラの種類によらずその膜の損傷を検知して集積する性質を持つことが示唆された。HRASLS3 それ自体が膜の損傷を検知するのかどうか HRASLS3 のリコンビナントタンパク質を作成して解析を行った。リコンビナント HRASLS3 をセミインタクト細胞(細胞膜を浸透化し細胞質成分を除去した細胞)に添加したところそれだけでは HRASLS3 はオルガネラへ局在しなかった。しかしながら LLOMe 処理やアポトーシスを誘導を行いオルガネラ膜を損傷させたのちにセミインタクト化した細胞ではリコンビナント HRASLS3 は損傷オルガネラに集積した。このことから細胞質成分は関与しないことが明らかとなった。さらにリポソームとリコンビナント HRASLS3 を混合したところ HRASLS3 単独ではリポソーム膜へと集積しなかったがボア形成ペプチドであるメリチンを添加したところ HRASLS3 はリポソーム膜へと集積した。以上の結果から HRASLS3 それ自体が未知のメカニズムで膜の損傷を検知するセンサー機能を有していることが明らかとなった。

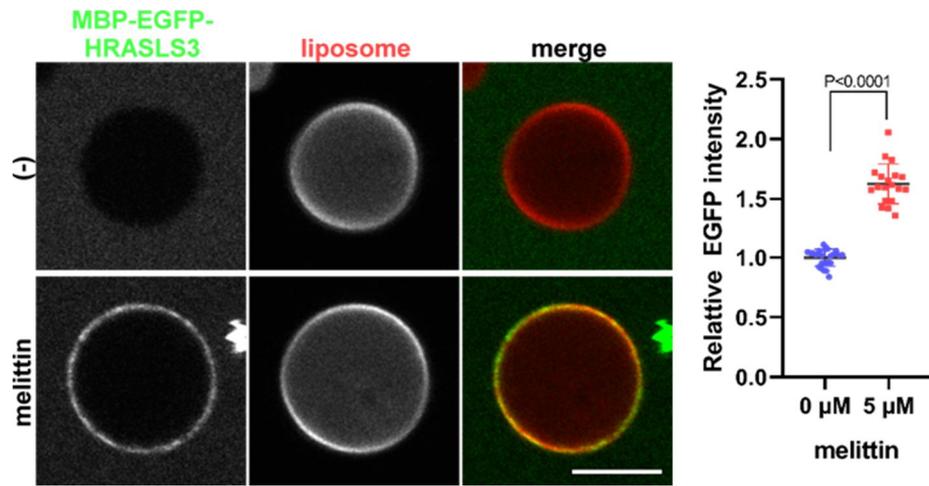


図 2: HRASLS3 のリポソームへの局在化

リコンビナント HRASLS3 とリポソーム(DOPC 98.9%, Biotin-PEG-PE 1%, Rhodamin-PE 0.1 %)を混合し共焦点顕微鏡で観察した。リコンビナントタンパク質単独では HRASLS3 はリポソーム膜上に集積しなかったが、ポア形成ペプチドであるメリチンを混合すると HRASLS3 はリポソーム膜上へ集積した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morishita Hideaki, Eguchi Tomoya, Tsukamoto Satoshi, Sakamaki Yuriko, Takahashi Satoru, Saito Chieko, Koyama-Honda Ikuko, Mizushima Noboru	4. 巻 592
2. 論文標題 Organelle degradation in the lens by PLAAT phospholipases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 634 ~ 638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-021-03439-w	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 Kawahara Tomoki, Funakawa Kai, Komori Tadayuki, Sakurai Maria, Yoshii Gen, Eguchi Tomoya, Fukuda Mitsunori, Iwatsubo Takeshi	4. 巻 145
2. 論文標題 Roles of lysosomotropic agents on LRRK2 activation and Rab10 phosphorylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105081 ~ 105081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2020.105081	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江口智也、森下英晃、水島昇
2. 発表標題 テイルアンカータンパク質PLAAT3の膜損傷依存的な膜挿入機構
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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