

研究終了報告書

「オートファジーを介した分泌のメカニズムとその生物学的意義の解明」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：藤田 尚信

1. 研究のねらい

オートファジーは、細胞質成分を膜により隔離し、リソソームへと輸送する細胞内の大規模な分解経路である。酵母での研究をきっかけに、ほ乳動物でも多様な積み荷タンパク質が、オートファジーを介して細胞外へと分泌されることが報告されている。しかしながら、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。また、メカニズムが不明であることから、“分解”と“分泌”を分けて議論できず、オートファジーを介した分泌の生物学的な意義は明らかにされていない。

私は、ショウジョウバエの筋細胞からオートファジーを介して赤色蛍光タンパク質(RFP)の融合タンパク質が微粒子と共に体液中に分泌されると、腹部背面にある腎細胞によりろ過・濃縮されることを見出した。腎細胞に濃縮された RFP のシグナルは、蛍光実体顕微鏡により容易に観察可能である。この現象を利用したオートファジー依存的な分泌の独自のアッセイ法と、ショウジョウバエの遺伝学とを組み合わせ、本研究課題では、オートファジーを介した分泌のメカニズムとその生物学的意義の解明を目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

ショウジョウバエの筋細胞、腎細胞、また赤色蛍光タンパク質の特性を利用した解析系を用いて、オートファジーを介した分泌のメカニズムとその生物学的な意義の解明に取り組んだ。

【オートファジーを介して分泌されるカーゴタンパク質の解析】

赤色蛍光タンパク質である mCherry を融合させた種々のコンストラクトを GAL4/UAS システムを用いて筋細胞特異的に発現させ、腎細胞の mCherry の蛍光強度を比較することにより分泌効率を比較した。この解析から、オートファジーを介した分泌には明らかな選択性があることが判明した。また、オートファジーを介した分泌では、オートファジーのカーゴタンパク質だけではなく、オートリソソーム膜状のタンパク質も分泌されていることが明らかになった。さらに、オートファジーを介した分泌は内在性レベルの発現量でも見られることを明らかにした。

【オートファジーを介した分泌メカニズムの解析】

独自の *in vivo* RNAi スクリーニングシステムを用いて、オートファジーを介した分泌に関わる遺伝子を探索した。オートファジーに関わる ATG 遺伝子群、膜融合の実行因子である SNARE 遺伝子群、また、ユビキチン E3 酵素の網羅的な RNAi スクリーニングを実施し、オートファジーを介した分泌のメカニズムのアウトラインを明らかにすることができた。具体的には、オートファゴソームはリソソームと融合し、ハイブリッドオルガネラであるオートリソソームになってから細胞膜と融合しており、その融合過程には Syntaxin1A が重要な機能を果たしている

と考えられる。また、分泌に関わる遺伝子の機能喪失表現型の解析から、オートファジーを介した分泌は、分泌する細胞においても重要なものであることが明らかになった。さらに、筋細胞の経時的なトランスクリプトーム解析から得られた候補遺伝子の RNAi スクリーニングを実施し、オートファジーを介した分泌に関わる複数の新規遺伝子を同定することに成功した。

【オートファジーを介した分泌の普遍性の検討】

ショウジョウバエを用いた解析から、オートファジーを介した分泌と腎における分解という新たな分解の形を見出した。この組織をまたいだ分解経路は、種を越えてマウスにも保存されていることを明らかにすることができた。

(2) 詳細

【オートファジーを介して分泌されるカーゴタンパク質の解析】

2-1) mCh 融合タンパク質を用いたカーゴ選択性の解析

赤色蛍光タンパク質である mCherry は低い pKa 値を持つため、腎細胞の酸性オルガネラ内でも蛍光を発する。そこで、種々の mCh 融合タンパク質の組換えショウジョウバエを準備し、それらを GAL4/UAS システムにより筋細胞に発現させることで、効率的に分泌されるカーゴを探索した。mCh 単独や mCh-Chc(クラスリン重鎖)などはほとんど分泌されなかった。一方で、Atg8 やオートファジーの代表的な基質である p62 を mCh に融合させたコンストラクトを発現させた際には、効率の良い分泌が見られた。また変態期の筋細胞では、ミトコンドリアも効率的に分解されている。そこで、ミトコンドリア外膜への移行シグナルを付加したコンストラクトを筋細胞に発現させたところ、やはり効率的な分泌が見られた。さらに、Spinsterを含む複数のリソソーム膜タンパク質を mCh に融合させた際にも効率の良い分泌が見られた。これらの結果より、オートファジーを介した分泌では、オートリソソーム膜状のタンパク質とオートファジーのカーゴタンパク質の双方が分泌されていることが明らかになった。

2-2) 内在性プロモーターにより発現させたカーゴの解析

上記の解析では、mCh 融合タンパク質を発現させる際に GAL4/UAS システムを用いたため、内在性のタンパク質に比べると過剰量が発現している。そこで、内在性の発現レベルでもオートファジーを介した分泌が見られるのか検討するため、Atg8 の内在性のプロモーターにより mCh-Atg8 を発現させた。その結果、内在性レベルの発現量でも腎細胞に mCh のシグナルが見られた。さらに、mCh に対する RNAi コンストラクトを腎細胞特異的に発現させても腎細胞の mCh のシグナルが失われなかったことから、内在性レベルの発現量でもオートファジーを介した分泌が見られることが分かった。

【オートファジーを介した分泌メカニズムの解析】

オートファジーを介した分泌のメカニズムとその意義の解明を目指し、ショウジョウバエの筋細胞と腎細胞を用いた *in vivo* RNAi スクリーニング系を用いて、オートファジーを介した分泌に関わる遺伝子を探索した。さらに、同定された遺伝子の機能解析を進めた。

1-1) ATG 遺伝子群の解析

オートファゴソームの形成に関わる ATG 遺伝子群は6つの機能的なユニットを形成することが知られている。そこで、各ユニットから遺伝子をピックアップし、それらの ATG 遺伝子のノックダウンがオートファジーを介した分泌に与える影響を検討した。その結果、オートファゴソーム膜上に局在する Atg8 との結合を介して取り込まれるカーゴの分泌には、いずれの ATG 遺伝子も必要であったが、Atg8 との

結合を必要としない膜局在性のカーゴの分泌は Atg5 と Atg12 のユビキチン様結合系に依存していないことが判明した。ノックアウトを用いた解析でも同様の結果を得ている。このように、カーゴにより ATG 遺伝子の要求性が異なることが明らかになった。さらに、分泌には、オートファゴソームとリソソームの融合が必要であったことから、オートファゴソームではなく、オートリソソームが細胞膜と融合していることが明らかになった。

1-2) SNARE 遺伝子の網羅的解析

SNARE は膜融合の実行因子である。ショウジョウバエは 26 の SNARE 遺伝子を持ち、それらの組み合わせにより、細胞内の多彩な膜融合過程が制御されている。オートファジー関連膜構造体と細胞膜の融合に関わる SNARE 複合体を同定するため、SNARE の網羅的な RNAi スクリーニングを実施し、オートファジーを介した分泌に必要な SNARE として、*STX1A*, *STX7*, *STX13*, *STX17*, *SNAP24*, *SNAP29*, *VAMP8*, また *YKT6* の 7 遺伝子を同定した。この中で、*STX7*, *STX17*, *SNAP29*, *VAMP8*, *YKT6* はオートファゴソームとリソソームの融合に働くことが既に知られている。*Stx1A* と *VAMP8* は筋細胞膜とオートリソソームにそれぞれ局在したことから、オートリソソームと細胞膜の融合に働く SNARE 複合体は、*Stx1A*-*SNAP24*-*VAMP8* もしくは *Stx1A*-*SNAP29*-*VAMP8* の組み合わせであると考えられる。

筋細胞特異的に *STX1A* をノックダウンしたところ、筋細胞のリモデリングに異常が見られた。コントロールでは、密に詰まった筋原線維と規則正しく配向した筋小胞体などの膜構造が観察される一方、*STX1A* をノックダウンした筋細胞では、筋原線維の層が薄くなっており、内部には、異常な膜構造体の蓄積が見られた。この結果は、オートファジーを介した分泌は、分泌する細胞にとって重要なものであることを示唆している。変態期の筋細胞では、分解能を超えたオートファジーのカーゴを細胞外へと分泌することにより、恒常性を維持しているものと考えられる。

1-3) ユビキチン E3 酵素の網羅的解析

ショウジョウバエの筋細胞で見られるオートファジーを介した分泌では、オートリソソーム膜の細胞質側に局在する分子も効率よく分泌される。それらが分泌される際には、細胞質側からオートリソソーム内腔へ取り込まれる必要がある。オートファジーを介した分泌は ESCRT にも依存していた。一般的に、ESCRT によるカーゴの取り込みにはユビキチンが関わることが知られている。そこで、ショウジョウバエの持つ E3 酵素 (162 遺伝子) を対象とした網羅的な RNAi スクリーニングを実施し、オートファジーを介した分泌に影響を与える E3 遺伝子を探索した。その結果、分泌量を増加させる 4 遺伝子と減少させる 4 遺伝子を同定することができた。

1-4) トランスクリプトーム解析により同定された候補遺伝子の解析

バイアスをかけずに、オートファジーを介した分泌に働く遺伝子を絞り込むために、変態期の腹部筋細胞の経時的なトランスクリプトーム解析を実施し、筋細胞のリモデリングに伴うダイナミックな遺伝子の発現変動を明らかにした。経時的な発現パターンから、分泌が見られる蛹化後 1 日目と 2 日目に発現の上昇がみられる遺伝子を抽出した。それらからハウスキーピング遺伝子などを除き、およそ 100 遺伝子を対象とした RNAi スクリーニングを実施した。この解析から、オートファジーを介した分泌に関わる複数の遺伝子を同定することに成功した。

3. 今後の展開

本研究より、リソソーム活性を大きく阻害することなくオートファジーを介した分泌を亢進させることが可能であることが判明した。オートファジーを介した分泌では、オートファゴソームではなく、リソソ-

ムと融合したハイブリッドオルガネラであるオートリソソームと細胞膜が融合している。したがって、人為的に分泌を促進させることにより、特定の臓器でオートリソソームの蓄積が見られる疾患の治療法開発につながると期待される。

4. 自己評価

独自の解析系を用いた *in vivo* RNAi スクリーニングを実施することにより、オートファジーを介した分泌に関わる一群の遺伝子を同定することに成功した。ターゲットスクリーンのみではなく、経時的なトランスクリプトーム解析を利用したことも本研究の大きな特徴である。同定された遺伝子の機能解析から、オートファジーを介した分泌のメカニズムのアウトラインを明らかにできた。同定された遺伝子の機能解析を更にすすめることにより、オートファジーを介した分泌の詳細が明らかになると期待される。さらに、オートファジーに依存した管状リソソームネットワークの発見という予想外の成果を得ることもできた。

オートファジーを介した分泌は、分泌する側の細胞にとって重要な機能を持つことが明らかになった。また、「オートファジーを介した分泌と組織をまたいだカーゴの分解」というオートファジーの新たな形を見出した。さらに、組織をまたいだオートファジー分解は哺乳動物にも保存されていることも明らかにすることができた。

本研究は、研究代表と大学院生1名の2名で実施した。さきがけ研究費は、本研究に必要な機器および試薬の購入、また旅費等に用いた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4 件

1. Murakawa, T., Kiger, A.A., Sakamaki, Y., Fukuda, M., *Fujita, N. An Autophagy-Dependent Tubular Lysosomal Network Synchronizes Degradative Activity Required for Muscle Remodeling. *J Cell Sci* (2020) 133, jcs248336: **2020 JCS PRIZE 受賞**

オートファジーを介した分泌が活発に見られる時期の筋細胞に、管状のオートリソソームネットワークが張り巡らされる新たな現象を発見した。この構造の形成は、オートファゴソームの形成に関わる ATG 遺伝子に加えて、リソソームの分解活性にも依存していた。管状オートリソソームネットワークの形成とオートファジーを介した分泌との間に非常に良い相関が見られていることから、分泌に重要な働きを持つと考えられる。

2. 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 autophagic flux in the last instar larval fat body. *Development* (2022) in press

目的のタンパク質の局在やダイナミクスを生体内で解析するには、多くのケースで新たな組換え体を作成する必要があり、多大な時間と労力を要する。ショウジョウバエには、HA タグ付きの UAS-ORF ライブラリーが整備されていることに着目し、遺伝子コード型の一本鎖抗 HA 抗体プローブに各種蛍光タンパク質タグを付加したコンストラクトの組換えショウジョウバエを作成した。これにより、HA タグ付きの任意のタンパク質の局在やリソソームにおける分解を生細胞で

簡便に観察可能になった。本システムは、広範な研究分野に応用可能なものである。

(2)特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 藤田尚信 『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』
第44回日本分子生物学会 フォーラム (2021)
2. 藤田尚信 『オートファジーを介した分泌のメカニズムと機能』
第93回 日本生化学会 シンポジウム (2020)
3. 藤田尚信 大隅ライフサイエンス研究会奨励賞受賞 (2021)
4. プレスリリース 『筋細胞内に管状のリソソームネットワークを発見』
<https://www.titech.ac.jp/news/2020/048124>
日刊工業新聞(2020年10月20日朝刊)にて紹介された