

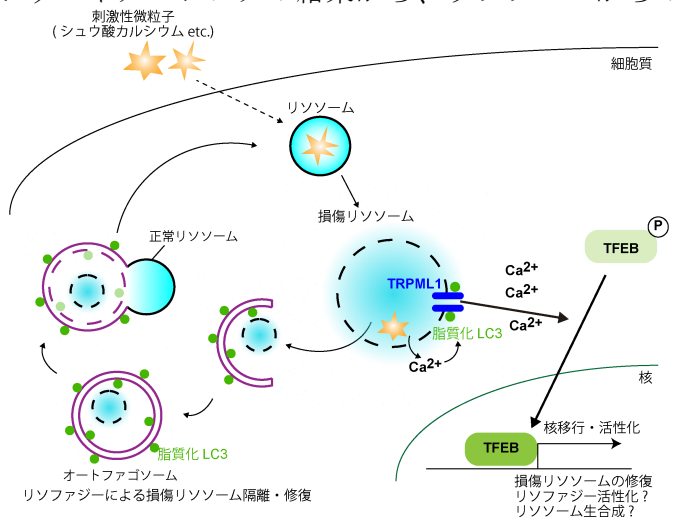
第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <概要>

所 属	大阪大学 高等共創研究院 准教授
氏 名	中村修平
研究テーマ	オートファジーと TFEB 転写因子による協調的な損傷リソソーム修復機構の解析

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

リソソームは細胞内外の様々な要因（薬剤、シリカ、シュウ酸カルシウム結晶など）によってしばしば損傷を受けることが知られている。損傷を受けたリソソームは内容物が細胞質に出してしまうことで炎症、酸化ストレスなどを惹起しアポトーシスにつながるため、細胞にとって非常に有害である。細胞は Endolysosomal damage response と総称される応答でこの損傷リソソームに対処している。この応答には我々が以前同定した選択的オートファジーの一つリソファジー経路、リソソーム生合成のマスター転写因子 TFEB の経路、ESCRT やシャペロンの経路など複数の経路があることが知られているが、これらの間のクロストークについてはわかっていない。特に TFEB についてはリソソーム損傷時の活性化機構は全くわかっておらず、役割についても検証されていない。そこで本研究では得られている予備的結果からリソソーム損傷時の TFEB の活性化機構および役割、さらにリソファジーとのクロストークを明らかにすることを試みた。

我々はまず、TFEB がリソソーム損傷時に核移行することを見出し、TFEB 機能を抑制するとリソソーム損傷のクリアランスが遅延するため、TFEB が損傷リソソーム修復に必須の役割を持っていることを明らかにした。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製作し解析したところ、リソソーム損傷時の TFEB 核移行は LC3 脂質化に関与する因子(ATG3, ATG7, ATG16 など)のノックアウト細胞で低下するという結果を得た。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。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。驚いたことに、リソソーム損傷時には脂質化 LC3 はオートファゴソームのみならずリソソームにも局在することを見出した。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の引き金になることを見出した。リソソームへリクルートされた LC3 はリソソーム上のカルシウムチャネル TRPML1 と相互作用しており、Fura-2 プローブを用いたカルシウムイメージングの結果から、リソソームからのカルシウム流出を増加させることで TFEB 活性化を引き起こすことが分かった。さらに脂質化 LC3 による TFEB 活性化は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 (crystal nephropathy) の病態の悪化を防いでいることがマウスを用いた動物実験やヒトの腎生検の解析から明らかとなった。脂質化 LC3 はオートファゴソームに局在する特異的なマーカーであるが、我々の結果から、リソソーム損傷という特定の条件下においてはリソソームへ局在し、TFEB 活性化に必須な働きをすることがわかり、脂質化 LC3 の新機能の存在が明らかとなった(図参照)(Nakamura et al., *Nat Cell Biol*, 2020)。



脂質化 LC3 による新規 TFEB 活性化機構の同定

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <詳細>

所 属	大阪大学 高等共創研究院 准教授
氏 名	中村修平
研究テーマ	オートファジーと TFEB 転写因子による協調的な損傷リソソーム修復機構の解析

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

1. 研究開の背景

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ており、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研究開始当時に得ていた。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。

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

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 LLOMe 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. 研究成果と考察

- (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ンネル 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ン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という結果が得られた。

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

(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。以上の結果を本年度論文発表行った(Nakamura et al., Nat Cell Biol, 2020)。

5. 今後の展望

脂質化 LC3 はオートファゴソームに局在する特異的なマーカーであるが、我々の結果から、リソソーム損傷という特定の条件下においてはリソソームへ局在し、TFEB 活性化に必須な働きをすることがわかり、脂質化 LC3 の新機能の存在が明らかとなった。一方、リソソーム損傷時脂質化 LC3 がどのようにリソソーム上に局在し、これがどのように TFEB 活性化を引き起こすのかは不明である。またこの脂質化 LC3 による TFEB 制御が結晶性腎症以外のどのような生理現象において働いているかなどはわかっていない。これらの点について今後の解析により明らかにしてゆく。

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成）＜発表実績/予定一覧＞

所 属	大阪大学 高等共創研究院 准教授
氏 名	中村修平

1. 論文発表実績

- ・ 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

① <論文 PDF 添付あり>

1	* <u>Nakamura, S.</u> , Shigeyama, S, Minami, S., Shima, T., Akayama, S., Matsuda, T., Esposito, A., Napolitano, G., Kuma, A., Namba-Hamano, T., Nakamura, J., Yamamoto, K., Sasai, M., Tokumura, A., Miyamoto, M., Oe, Y., Fujita, T., Terawaki, S., Takahashi, A., Hamasaki, M., Yamamoto, M., Okada, Y., Komatsu, M., Nagai, T., Takabatake, Y., Xu, H., Isaka, Y., Ballabio, A., *Yoshimori, T. LC3 lipidation is essential for TFEB activation during the lysosomal damage response upon kidney injury. <i>Nat. Cell Biol.</i> (2020) 10, 1252-1263, (2020) 査読あり
2	* <u>Nakamura, S.</u> , Akayama, S., *Yoshimori, T. Autophagy-independent function of lipidated LC3 essential for TFEB activation during the lysosomal damage responses. <i>Autophagy</i> 2020, in press 査読なし
3	<u>Nakamura, S.</u> , Oba, M., Suzuki, M., Takahashi, T., Yamamuro, T., Fujiwara, M., Ikenaka, K., Minami, M., Tabata, N., Yamamoto, K., Kubo, K., Tokumura, A., Akamatsu, K., Miyazaki, M., Kawabata, T., Hamasaki, M., Fukui, K., Sango, K., Watanabe, Y., Takabatake, Y., Kitajima, S. T., Okada, Y., Mochizuki, H., Isaka, Y., Antebi, A. and *Yoshimori, T. Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. <i>Nat. Commun.</i> 10, 847, (2019) 査読あり
4	
5	
6	

② <論文 PDF 添付なし>

1	Choong, C., Okuno, T., Ikenaka, K., Baba, K., Hayakawa, H., Koike, M., Yokota, M., Doi, J., Kakuda, K., Takeuchi, T., Kuma, A., <u>Nakamura, S.</u> , Nagai, Y., Nagano, S., Yoshimori, T., Mochizuki, H. Alternative mitochondrial quality control mediated by extracellular release. <i>Autophagy</i> , 2020, in press 査読あり
2	*Murase, D., Kusaka-Kikushima, A., Hachiya, A., Fullenkamp, Stepp, A., Imai, A., Ueno, M., Kawabata, K., Takahashi, Y., Hase, T., Ohuchi, A., <u>Nakamura, S.</u> and Yoshimori, T. Autophagy Declines with Premature Skin Aging resulting in Dynamic Alterations in Skin Pigmentation and Epidermal Differentiation. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 21, E5708, (2020) 査読あり
3	Sakae, Y., Oikawa, A., Sugiura, Y. Mita, M. <u>Nakamura, S.</u> , Nishimura, T., Suematsu, M. and *Tanaka, M. Starvation causes female to male sex reversal through lipid metabolism in the teleost fish, medaka (<i>Olyzias latipes</i>). <i>Biol. Open</i> 9, bio050054, (2020) 査読あり
4	Chang, C., Young, LN., Morris, KL., von Bülow, S., Schöneberg, J., Yamamoto-Imoto, H., Oe, Y., Yamamoto, K., <u>Nakamura, S.</u> Stjepanovic G, Hummer G, Yoshimori T, *Hurley JH. Bidirectional Control of Autophagy by BECN1 BARA Domain Dynamics. <i>Mol. Cell</i> 73, 339-353, (2019) 査読あり

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1		
2		
3		
4		
3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		