

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「オートファジーによる細胞外微粒子応答
と形成」

研究終了報告書

研究期間 2017年 10月～2023年 3月

研究代表者：吉森 保
(大阪大学大学院生命機能研究科、教授)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究計画は、「外来性微粒子に起因する生命現象」と「内因性微粒子の形成」という本領域の2大重要課題の両方に関わるオートファジーに着目し、細胞内外微粒子の体内動態制御の理解を目指して研究を行った。具体的には、研究代表の吉森グループは(1)細胞外微粒子への細胞応答機構としてのリソファジーの分子機構解明と、(2)内因性細胞外微粒子(細胞外小胞)の形成・放出におけるオートファジーの関与の機序解明に取り組んだ。細胞外微粒子がエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれるとリソソームに障害を与えることが知られており、これに応答してリソソームの修復・分解・新生といったリソソームの恒常性維持機構が働く。このリソソームの恒常性維持機構について解析を行い、リソソーム主要制御転写因子である TFEB のリソソーム損傷に伴う新たな信号伝達経路とその意義を明らかにした (*Nature Cell Biol*, 2020)。この研究では、脂質化 LC3(オートファジー主要因子)のオートファジー以外の新たな機能の発見という予想外の展開があり、分野に大きなインパクトを与えた。また、独自のスクリーニングにより損傷リソソーム特異的オートファジー(リソファジー)に働く E3 リガーゼ複合体を同定し、リソファジーの初期段階の分子機構を明らかにした。 (*Cell Rep*, 2022)。このスクリーニングにより得られた他の候補因子についても解析を進めており、リソファジーの詳細な分子機構が明らかになりつつある。さらに、研究開始時には混沌とした状況にあったエクソソームの形成・分泌におけるオートファジーの関与について研究を進め、オートファジーに関連する複数の因子がオートファジーとは独立に機能することを見出した。

分担の池中グループは、外来性微粒子としての α シヌクレイン(α Syn)凝集体が引き起こす疾患(パーキンソン病をはじめとするシヌクレイノパチー)の原因と、その多様性を生む機序について研究を進めた。研究の主な柱は、(1)細胞外 α Synが細胞内に取り込まれ、細胞内の α Synへ伝播する際の機序と、それに対する細胞防御応答についてオートファジーとの関連に注目した研究(細胞外 α Synの真の伝播研究)と、(2)細胞外 α Syn凝集体の構造多型がおよぼす病態の多様性についての研究(α Syn構造多型と病態の研究)に分けられる。(1)に関しては、リソファジーと α Syn伝播の関係を、研究代表らとの密な共同研究により明らかにした。具体的には、細胞外から取り込まれた α Syn凝集体はリソソームに集簇する事、そしてごく一部がリソソーム膜を穿通して細胞質に逃げ出すことを示した。しかし、それだけでは十分に細胞質 α Synとの会合には至らず、リソファジーによって包埋されることで多くの場合伝播は起きていないことを見出した。リソファジーが欠損する病態においては、損傷リソソーム周囲で内在性の α Synと会合し、凝集の伝播が高頻度で起こることが判明した。さらに α Synの凝集体構造多型が変わると、リソソーム膜への損傷の程度が異なることから、膜損傷性が高い構造多型では伝播がより起こりやすいという機序が明らかになった。

また、 α Syn以外の細胞外微粒子と疾患の関連について研究を行い、損傷ミトコンドリアを細胞外への直接的に放出する新たな機構を見出した。この現象とオートファジーとの関連を研究代表との共同研究で進め、細胞内における不要ミトコンドリア処理機構であるマイトファジーが十分に働かない状況においては、この細胞外放出機構が活性化することを示し、マイトファジーと細胞外放出は相互に関係しながら両輪でミトコンドリア恒常性維持に働いている事を明らかにした (*Autophagy*, 2021)。さらに、マイトファジー関連遺伝子の変異による遺伝性パーキンソン病(PARK2)において細胞外放出機構が病態に関与している事も報告した。これらの解析により、パーキンソン病を中心とする神経変性疾患における細胞内外の微粒子に起因する病態について、選択的オートファジー(マイトファジー、リソファジー)の関与を明らかにした。

以上の成果を、領域期間中に複数の論文としてまとめた(受理5件、投稿中5件)。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 概要: リソソームが損傷を受けた際にオートファジー・リソソーム生合成のマスター転写因子 TFEB が活性化し、この活性化にオートファジー制御因子 LC3 の働きが必須なことを見出した。LC3 はオートファゴソームに局在することが知られているが、リソソーム損傷時には加えてリソソームにも局在し、リソソームからのカルシウム流出を介して TFEB を活性化するというオートファジー以外の機能を持つことが分かった。LC3 によるこの予想外の TFEB 活性化機構は、リソソーム損傷を伴う結晶性腎症などの病態抑制に寄与することが分かった。
2. 概要: 細胞内の分解を担うリソソームは分解酵素を多く保有し、損傷を受けると分解酵素が細胞質に流出し最終的に細胞死を惹き起こす。そのため、損傷リソソームを隔離することは非常に重要である。我々は、損傷リソソーム特異的オートファジー(リソファジー)を発見し、その分子機構を解析してきた。今回、細胞が損傷リソソームをどのように認識するのかを明らかにするため、初期段階の分子機構について解析した結果、ユビキチンリガーゼである CUL4 複合体が関わることを明らかにした。
3. 概要: ミトコンドリアの品質管理機構は、異常ミトコンドリアがマイトファジーで分解される経路の研究がほとんどであった。今回我々は、ミトコンドリアストレスを加えた際に、ミトコンドリア自体が細胞外に放出されることを見出し、特にその機構はマイトファジー機能が低下している時には更に顕著に見られることを見出した。ストレスを加えない定常培養状態でもこの放出は見られ、ミトコンドリア品質管理機構としては、マイトファジーと両輪で働いている事を示した。さらに興味深いことに、パーキンソン病を起こす Parkin 遺伝子の疾患変異を有する患者由来の線維芽細胞では、細胞外に放出するミトコンドリア量が増加している事を示し、疾患との関連が示唆された。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 概要: リソソーム上のカルシウムチャネル TRPML1 はムコリピドーシス IV 型と呼ばれるリソソーム病の原因遺伝子として知られている。TRPML1 の人為的活性化は TFEB 活性化を介したリソソーム機能亢進やオートファジーの活性化を通して、リソソーム病や神経変性疾患を含む多くの病態改善に寄与する。そのため、世界中で TRPML1 のアゴニスト探索が盛んに行われている。我々は今回新たにオートファジーで働く LC3 タンパク質が、オートファジーの機能とは独立して TRPML1 と相互作用することでこの活性を調節することを見出した(*Nat Cell Biol*, 2020)。この発見をもとにしたスクリーニング方法も確立しており(特願 2020-63351)、今後これら知見や技術が効果的なアゴニストの探索やリソソーム機能不全に起因する疾患の治療へと応用できる可能性がある。

<代表的な論文>

1. LC3 lipidation is essential for TFEB activation during the lysosomal damage response to kidney injury. Nakamura et al., *Nature Cell Biology*, 2020 22(10):1252-1263

概要: 損傷リソソーム修復時に働く転写因子 TFEB を新たに同定し、リソファジー(細胞外微粒子により損傷を受けたリソソームを隔離するオートファジー)(*Maejima et. al., EMBO J., 2013*)と協調した本因子の新規活性化機構および下流のターゲット因子を明らかにした。また、病態

モデルマウスを用いた解析から、TFEB の働きがリソソーム損傷に起因する結晶性腎症のひとつシュウ酸カルシウム腎症の抑制に寄与することを見出した。

2. Identification of CUL4A-DDB1-WDFY1 as an E3 ubiquitin ligase complex involved in initiation of lysophagy. Teranishi et al., Cell Rep. 2022 40(11):11349

概要：細胞内の分解を担うリソソームは、分解酵素を多く保有し、損傷を受けると分解酵素が細胞質に流出し最終的に細胞死を惹き起こす。そのため、損傷リソソームを隔離することは非常に重要である。本研究では、損傷リソソーム特異的オートファジー(リソファジー)の分子機構解析を行い、ユビキチンリガーゼである CUL4-DDB1-WDFY1 が、リソソーム膜タンパク質 LAMP2 をユビキチン化することがリソファジーの初期過程に必要であることを明らかにした。

3. Alternative mitochondrial quality control mediated by extracellular release. Choong Chi-Jin et al. Autophagy. 2021 Oct;17(10):2962-2974. doi: 10.1080/15548627.2020.1848130

概要：本研究では細胞外ミトコンドリア放出を介した新しいミトコンドリア品質管理経路を報告した。我々は細胞から細胞外へのミトコンドリアの放出を光-電子顕微鏡(CLEM)で証明した。そしてミトコンドリア品質障害が、ミトコンドリアの細胞外への放出を促進すること、ミトコンドリア特異的オートファジー(マイトファジー)制御に重要な役割を持つパーキン(PRKN)のノックダウンは細胞外放出を増長させることを示した。さらに重要なこととして、PRKN の機能欠損を持つパーキンソン病患者の線維芽細胞および脳脊髄液は、細胞外ミトコンドリアの増加を示した。細胞外ミトコンドリア放出は、従来のマイトファジーとは異なる品質管理経路であることが示唆された。

4. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate interacts with alpha-synuclein and initiates its aggregation and formation of Parkinson's disease-related fibril polymorphism. Choong Chi-Jin et al. Acta Neuropathologica. 2023 Mar; 20. doi: 10.1007/s00401-023-02555-3.

概要：本研究では、パーキンソン病を引き起こす α シヌクレイン(α Syn)凝集体がどのような機序で作られるのかについて探索し、ホスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)がその引き金になっている可能性を報告した。我々は、遺伝性パーキンソン病を起こす Synpatojanin1 変異が PIP3 のフォスファターゼ活性の低下からおこることに着目し、Synpatojanin1KO 細胞や線虫を用いて、Synpatojanin1 活性低下が PIP3 の蓄積を介して、 α Syn 蓄積を引き起こすことを示した。また、PIP3 を神経細胞に投与すると、PD 患者内で α Syn 凝集体が蓄積しているリソソームとプレシナプスにおける α Syn 凝集を再現できることを示した。患者脳の病理においても PIP3 が蓄積し、 α Syn 凝集体と共局在していることを示した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 吉森グループ (研究代表)

研究代表者: 吉森保 (大阪大学大学院生命機能研究科/ 医学系研究科 教授)

[研究項目]

課題 A. 細胞外微粒子の細胞応答機構としてのリソファジーの分子機構の解明

- ・リソソームの損傷を認識しオートファゴソームを形成する分子機構の解明
- ・リソファジーの制御と損傷リソソーム除去後におこるリソソーム新生に関わる信号伝達経路の解明
- ・リソファジーを誘導する細胞外微粒子のスペクトラムとリソファジー低下に起因する疾患の制御

課題 B. 内因性細胞外微粒子(細胞外小胞)の形成・放出におけるオートファジーの関与の機序解明

- ・エクソソームの形成・放出におけるオートファジーの役割の解明
- ・オートファジー性分泌による膜小胞の放出の分子機構と生理的意義の解明

[領域内共同研究]

- ・様々な細胞外微粒子に対するリソファジー活性の評価(吉森 G・瀬戸 G)
- ・二光子顕微鏡を用いた α シヌクレイン伝播のイメージング(吉森 G・和氣 G)

[若手チャレンジ研究]

- ・細胞外微粒子により誘導されるオートファジーに関わる制御因子の新規同定と機能解析(田端 桂介 大阪大学医学系研究科 助教)
- ・リソソームエキソサイトーシスを制御する Ca^{2+} チャンネル TRPML1 複合体の構造解析(上西達也 大阪大学医学系研究科 助教)
- ・Rubicon による新規エクソソーム産生制御機構の解明(柳川恭佑 大阪大学医学系研究科 大学院生)

② 池中グループ(研究分担)

主たる共同研究者: 池中 建介 (大阪大学医学系研究科 助教)

[研究項目]

課題 C. シヌクレイン凝集体やパーキンソン病関連分子の細胞間伝播の基本的な機構解明

- ・外因性シヌクレインの細胞内取り込み時の動態についての解明
- ・シヌクレインによるリソソーム損傷と凝集体伝播機構の解明
- ・シヌクレイン凝集体(レビー小体)の形成に関与するオートファジー関連因子についての検討
- ・シヌクレイン構造多型による細胞内動態の違いの検討

[若手チャレンジ研究]

- ・生体内外の細胞外微粒子がライソゾーム膜破綻を介した α -シヌクレイン凝集伝播に与える影響の解析(角田溪太 大阪大学医学系研究科 特任助教)

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- Andrea Ballabio *TIGEM* TFEB KO マウスを用いたリソソーム損傷を伴う病態における TFEB の役割の解明
- 猪阪善隆 大阪大学 結晶性腎症の解析
- 永井健治 大阪大学 カルシウムイメージング
- 濡木理 東京大学 TRPML1-LC3 複合体の構造解析
- 森戸大介 昭和大学 AAA+ ATPase の解析
- 小迫英尊 徳島大学 プロテオーム解析
- Oriol Gallego IRB Barcelona, Spain Quantification of protein interaction
- 夏目徹 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 プロテオーム解析