

144. T 管形成に関わる因子の同定と機能解析

藤田 尚信

東北大学 大学院生命科学研究科 膜輸送機構解析分野

Key words : 筋細胞, T 管, オートファジー, 再構成

緒言

筋細胞は力を発生させるために高度に分化した細胞であり、筋原線維や T-tubule (T 管) などの特殊な細胞内構造を持つ。運動や加齢などの様々な要因により、筋細胞は恒常的に傷害を受けており、傷害を受けた際には T 管などの膜構造体も壊して作り直され、細胞の恒常性が保たれている。しかしながら、機能的な筋細胞を試験管内で再現するのが困難なため、T 管を含めた筋細胞内の構造体が再構成される仕組みは、これまで十分に解明されていなかった。私たちは、筋細胞の構造が幅広い生物種で保存されていることに着目し、ショウジョウバエの筋細胞をモデル系に用いて、T 管の再構成のメカニズムを解析した。遺伝学的な解析から、ショウジョウバエの T 管再構成には、細胞内分解機構であるオートファジーが重要な役目を果たしていることが明らかになった。

方法および結果

筋細胞の構造は進化を通して高度に保存されており、ショウジョウバエも高等動物と同様に、高度に発達した T 管や筋小胞体などの膜構造体を持つ。私たちは、ショウジョウバエ変態時に腹部の一群の筋細胞では、T 管が完全に壊された後に再形成される新たな現象を見出した (図 1)。これらの一群の腹部の筋細胞は、蛹の殻から脱皮する際に重要な役割を果たしている。

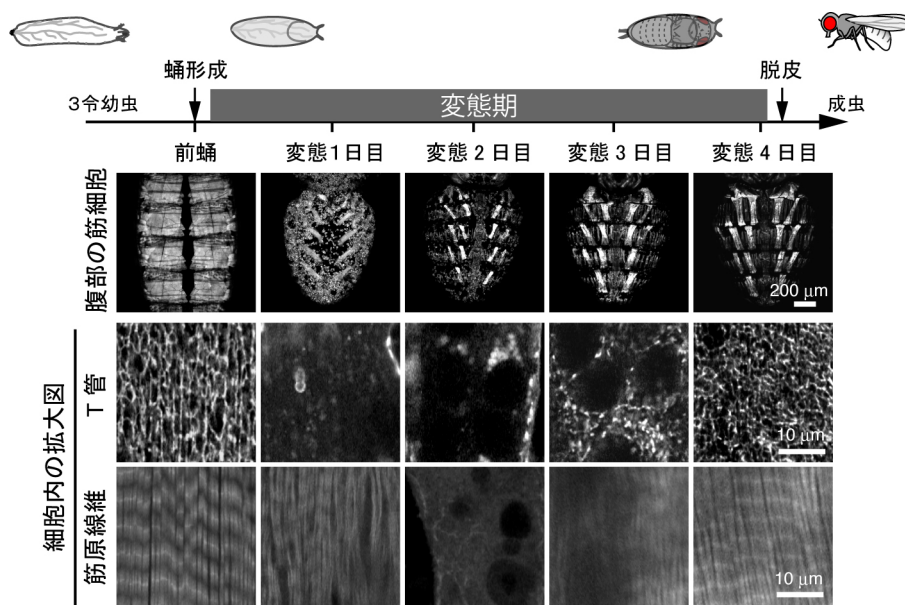


図 1. ショウジョウバエ変態期に見られる筋細胞の再構成
 ショウジョウバエ変態期の腹部筋細胞内の T 管と筋原線維を 24 時間毎に観察した。

T管の異常を伴う myotubular myopathy の原因遺伝子である *Myotubularin* や *Dynamin* をショウジョウバエの腹部の筋細胞で欠損させると、T管由来の異常な膜構造体が蓄積されたことから^{1,2)}、進化的に保存されたT管の形成・維持のメカニズムの存在が示唆される。従って、変態時に見られるこの現象は、筋細胞再構成を解析する際に非常に良いモデルだと考えられる。

ショウジョウバエを用いた研究で、細胞膜のマーカーとして広く用いられている mCD8 : GFP は、筋細胞では主にT管に局在する。筋細胞の再構成に関わる新規遺伝子を同定するため、mCD8 : GFP をT管のマーカーに用いて膜輸送に関わる遺伝子を対象とした筋細胞特異的な RNAi スクリーニングを行った。その結果、オートファジー経路に関わる一群の遺伝子がT管の再構成に関わる因子として同定された。オートファジーは、オルガネラや細胞質成分を膜構造で包み込み、リソソームへと運ぶ細胞内大規模分解経路である。オートファジーの働きを阻害すると、腹部筋細胞が異常な形態になり、多くの個体は羽化不全となった。この知見は、オートファジーが昆虫の変態期に細胞死以外の機能を持つことを示すはじめての報告である²⁾。

オートファゴソームとリソソームの融合を阻害すると、筋細胞内に mCD8 : GFP 陽性のベシクルが多数蓄積した。mCD8 : GFP は再構成される前のT管に局在することから、この結果は、T管がオートファゴソームの膜成分として用いられていることを示唆している。また、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害した際に見られる特徴的な表現形を示す遺伝子として低分子量 GTPase の一種である Rab2 を同定した。機能解析の結果、Rab2 はオートファゴソーム上に局在し、膜のつなぎ止めに働く HOPS 複合体との直接結合を介して、Stx17 複合体と共に³⁾、オートファゴソームとリソソームの融合に働いていると考えられる (図2)。

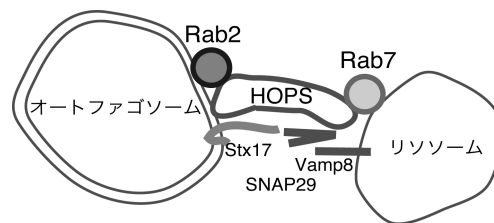


図2. Rab2 を介したオートファゴソームとリソソームの融合モデル

オートファゴソームとリソソームが融合する際には、HOPS 複合体が Rab2 と Rab7 それぞれとの結合を介してオートファゴソームとリソソームとをつなぎ止め、Stx17-SNAP29-Vamp8 SNARE 複合体の形成を促す。

ここまでの結果より、T管はオートファゴソーム膜として用いられ、再構成されると考えられる。そこで、次にオートファゴソーム形成の阻害がT管由来の (mCD8 : GFP で標識される) 膜構造体にどのような影響を与えるか検討した。オートファゴソームの形成に必須な Atg1 や Atg18 をノックダウンしたところ、mCD8:GFPが多層になったように見える膜凝集体が変態途中の筋細胞内に見られるようになった (図3)。これらの結果より、T管の再構成にオートファジーが直接的に関わっていると考えられる。

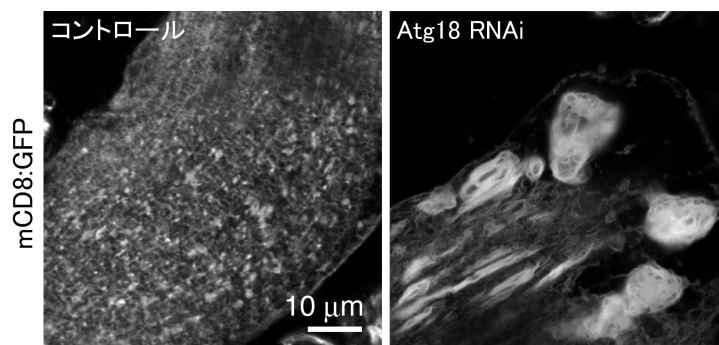


図3. オートファゴソーム形成の不全は mCD8 : GFP 陽性の多層膜構造を引き起こす
 オートファゴソームの形成に必要な ATG18 をノックダウンし、T 管のマーカーである
 mCD8 : GFP への影響を、蛹になって 24 時間の時点で観察した。

ショウジョウバエ腹部の筋細胞でオートファゴソームの形成を阻害すると、筋細胞の再構成が不全となり、細胞内のおよそ 70% のスペースがミトコンドリアにより占められていた (図 4)。一方で、オートファゴソームとリソソームの融合を抑えると、細胞の 80% ものスペースがオートファゴソームにより占められており、蓄積されたオートファゴソームは、高頻度にミトコンドリアを含んでいた (図 4)。これらの結果は、筋細胞が再構成される際には、ミトコンドリアはオートファジーの主要なカーゴであることを強く示唆している。

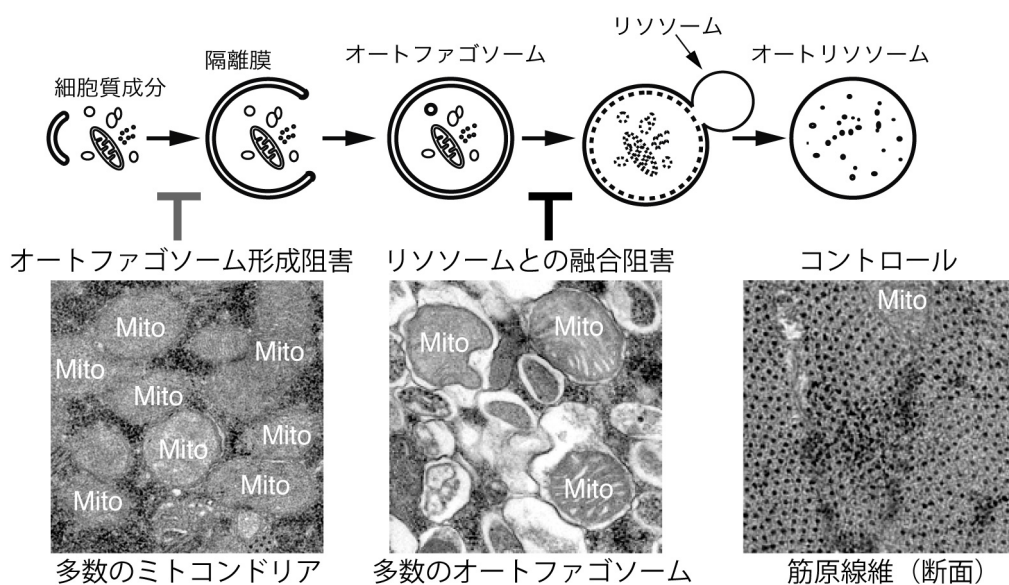


図4. オートファジーが阻害される段階の違いにより筋細胞に見られる表現形は大きく異なる
 Atg18 をノックダウンし、オートファゴソームの形成を抑えた筋細胞 (左)、Rab2 をノック
 ダウンし、オートファゴソームとリソソームの融合を抑えた筋細胞 (中)、コントロール
 の筋細胞 (右) の断面を電子顕微鏡にて観察した。

考 察

本研究より、ショウジョウバエの変態期に腹部筋細胞内の T 管がほぼ完全に再構成される新たな現象を発見した。この現象をモデルに用いた解析から、T 管の再構成にオートファジーが重要な役割を果たしていること、また、オートファゴソームとリソソームとの融合に関わる新分子として Rab2 を同定した。

T 管の再構成の過程において、オートファジーは T 管を一度壊す過程に重要であると考えられる。一度壊された T 管が再形成されるメカニズムは未だ不明である。これまでに行ったスクリーニングから、再形成に特異的に異常が生じていると考えられる候補が複数同定されている。これらの候補因子の機能解析を通して、今後、T 管の再形成のメカニズムを明らかにしていきたい。

ショウジョウバエの変態期に見られる筋細胞・T 管の再構成は、細胞全体がほぼ完全に作り替えられるダイナミックな現象である。この現象は、筋細胞・T 管の再構成のモデルのみならず、より普遍的な膜輸送経路を研究する際にも、有用なモデルを提供すると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院生命科学研究科生命機能科学専攻膜輸送機構解析分野の福田光則博士、および University of California, San Diego Division of Biological Sciences の Amy Kiger 博士である。最後に、本研究にご支援を頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Ribeiro I, Yuan L, Tanentzapf G, Dowling JJ, Kiger A. Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance. *PLoS Genet.* 2011;7(2):e1001295. PubMed PMID: 21347281
- 2) Fujita N, Huang W, Lin TH, Groulx JF, Jean S, Nguyen J, Kuchitsu Y, Koyama-Honda I, Mizushima N, Fukuda M, Kiger AA. Genetic screen in *Drosophila* muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *Elife.* 2017;7(6):e23367. PubMed PMID: 28063257
- 3) Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci.* 2017;130(7):1209-16. PubMed PMID: 28302910