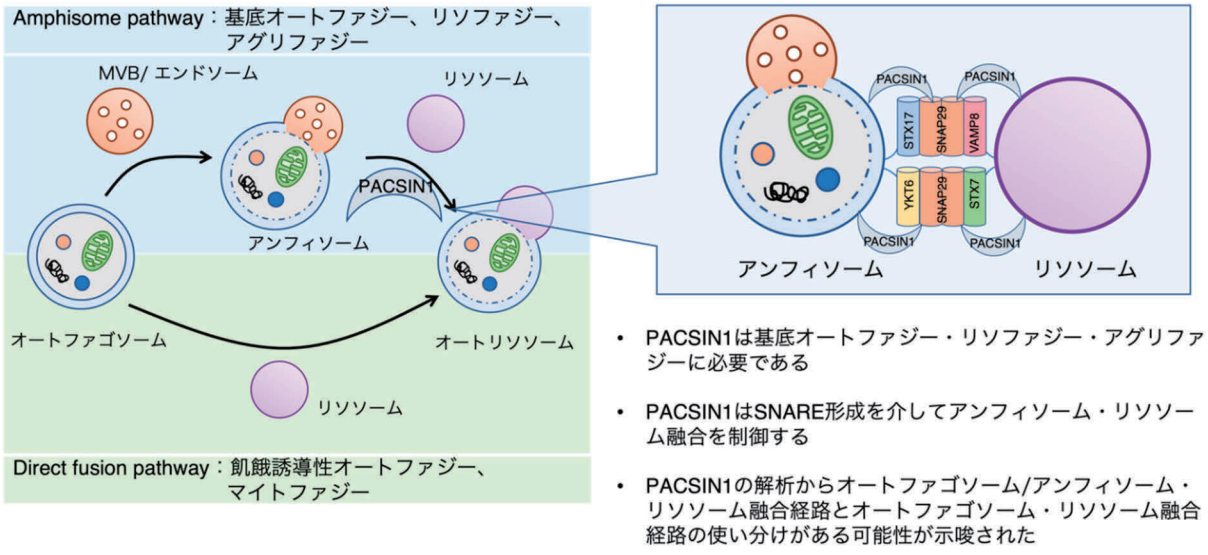
39　損傷リソソーム修復機構の解明とその生理学的意義	中村　修平

【目的】オートファジーは真核生物に共通して存在する細胞内の分解システムで、様々なストレスに応じて誘導され、細胞の恒常性維持に必須の役割を持つ。オートファジーが誘導されるとオートファゴソームと呼ばれる小胞が細胞内に形成され、これが対象物をランダムあるいは選択的に取り込み、リソソームへと運んで分解する。このリソソームは細胞内外の様々な要因で損傷を受けることが知られており、傷ついたリソソームは細胞にとって有害となるが、細胞がこれにどう対処しているかよく分かっていなかった。我々は以前、選択的なオートファジーのひとつリソファジーによって損傷リソソームが特異的に除去され、これが細胞の恒常性維持に必須な働きを持つことを見出した（Maejima et al., *EMBO J*, 2013、Nakamura et al., *Nat Cell Biol*, 2020）。しかしながらリソファジー制御の詳細やその生理学的意義については多くが不明であり、本研究ではこれらを明らかにすることを目的とした。

【方法】PACSIN ファミリータンパク質は F-BAR ドメインを介して脂質膜に結合し、膜の湾曲を促進することで、カベオラやシナプス小胞の形成などに寄与することが明らかにされているが、オートファジーでの働きはよく分かっていなかった。PACSIN ファミリーのうち新たなオートファジー制御因子として PACSI1 を同定し、詳細な機能解析を行った。

【結果】PACSIN1 は基底状態のオートファジーの他、リソファジーやアグリファジーといった一部の選択的オートファジーに必要であることが明らかとなった。一方、PACSIN1 は飢餓誘導性のオートファジーやマイトファジーには不要であった。古くから、オートファゴソームからリソソームへの輸送過程はオートファゴソームが後期エンドソーム／MVBs と融合してアンフィソームと呼ばれる中間体を形成したのち、リソソームと融合する経路（Amphisome pathway）とオートファゴソームが直接リソソームと融合する経路（Direct fusion pathway）の 2 経路が存在することが知られていたが、この経路の制御機構や存在の意義は不明であった。我々の解析から PACSIN1 はアンフィソームとリソソームの融合を制御する因子であることが明らかとなり、2 つの経路が栄養条件やストレスに応じて使い分けられていることが明らかとなった（Oe et al., *PLoS Genet*, 2022）。

研究成果の概要



39. 損傷リソソーム修復機構の解明とその生理学的意義

中村　修平

*大阪大学 高等共創研究院

Key words：リソソーム，オートファジー，PACSIN，アンフィソーム，リソファジー

緒　言

オートファジーは真核生物に共通して存在する細胞内の分解システムで、様々なストレスに応じて誘導され、細胞の恒常性維持に必須の役割を持つ。オートファジーが誘導されるとオートファゴソームと呼ばれる小胞が細胞内に形成され、これが対象物をランダムあるいは選択的に取り込み、リソソームへと運んで分解する。このリソソームは細胞内外の様々な要因、例えばエンドサイトーシスによって取り込まれる結晶物、細菌、アミロイドタンパク質、脂質などや細胞内で発生する ROS などによって膜が損傷を受けることが知られている。傷ついたリソソームからは酸性の内容物が漏出し、これが炎症や細胞死を引き起こし、種々の疾患や老化の要因となることが示唆されている。この有害な損傷リソソームに細胞がこれにどう対処しているかよく分かっていなかったが、我々は以前、選択的なオートファジーのひとつリソファジーによって損傷リソソームが特異的に除去され、これが細胞の恒常性維持に必須な働きをもつことを見出した［1，2］。しかしながらリソファジー制御やその生理学的意義についての詳細は多くが不明であり、本研究ではこれらを明らかにすることを目的とした。

PACSIN ファミリーの解析から、リソファジーを含めた新たなオートファジー制御因子として PACSIN1 を同定し、この機能解析を進めた。PACSIN1 は基底状態のオートファジーの他、リソファジーやアグリファジーといった一部の選択的オートファジーに必要であることが明らかとなった。古くから、オートファゴソームからリソソームへの輸送過程はオートファゴソームが後期エンドソーム／MVBs と融合してアンフィソームと呼ばれる中間体を形成したのち、リソソームと融合する経路（Amphisome pathway）とオートファゴソームが直接リソソームと融合する経路（Direct fusion pathway）の 2 経路が存在することが知られていたが、この経路の制御機構や存在の意義は不明であった。我々の解析から PACSIN1 は Amphisome pathway で働き、特にアンフィソームとリソソームの融合を制御する因子であることが明らかとなり、2 つの経路が栄養条件やストレスに応じて使い分けられていることが明らかとなった（図 1）［3］。

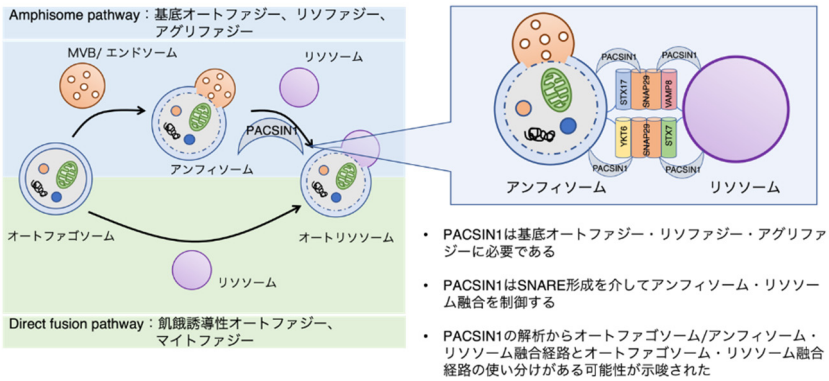


図 1. PACSIN1 によるオートファジー制御機構
PACSIN1 は SNARE 形成を介してアンフィソームとリソソームの融合を制御し、
基底オートファジー、リソファジー、アグリファジーに必須の働きをもつ。

*現在の所属：奈良県立医科大学 医学部医学科 生化学講座

方法および結果

1. PACSIN1 は新規のオートファジー制御因子である

これまでの研究で、PACSIN ファミリータンパク質は F-BAR ドメインを介して脂質膜に結合し、膜の湾曲を促進することで、カベオラやシナプス小胞の形成などに寄与することが明らかにされている。オートファジーはダイナミックな膜動態をともなう過程であることから、PACSIN のオートファジーへの寄与を調べた。PACSIN ファミリーには PACSIN1、PACSIN2、PACSIN3 の 3 つが存在するため、これらの KO 細胞を作製し、オートファジー活性を調べた。具体的にはオートファゴソームマーカーであり、かつオートファジーにより分解されることが知られている LC3 タンパク質に対する Western Blotting を行い、リソソーム阻害剤 Baf.A1 添加有無による LC3 量の差分をみることでオートファジー活性を測定した。この結果、PACSIN1 KO 細胞でのみ、コントロールと比べて特に基底状態でのオートファジー活性が低下することを見出した（図 2）。一方飢餓時のオートファジー誘導には PACSIN1 は必要なかった。

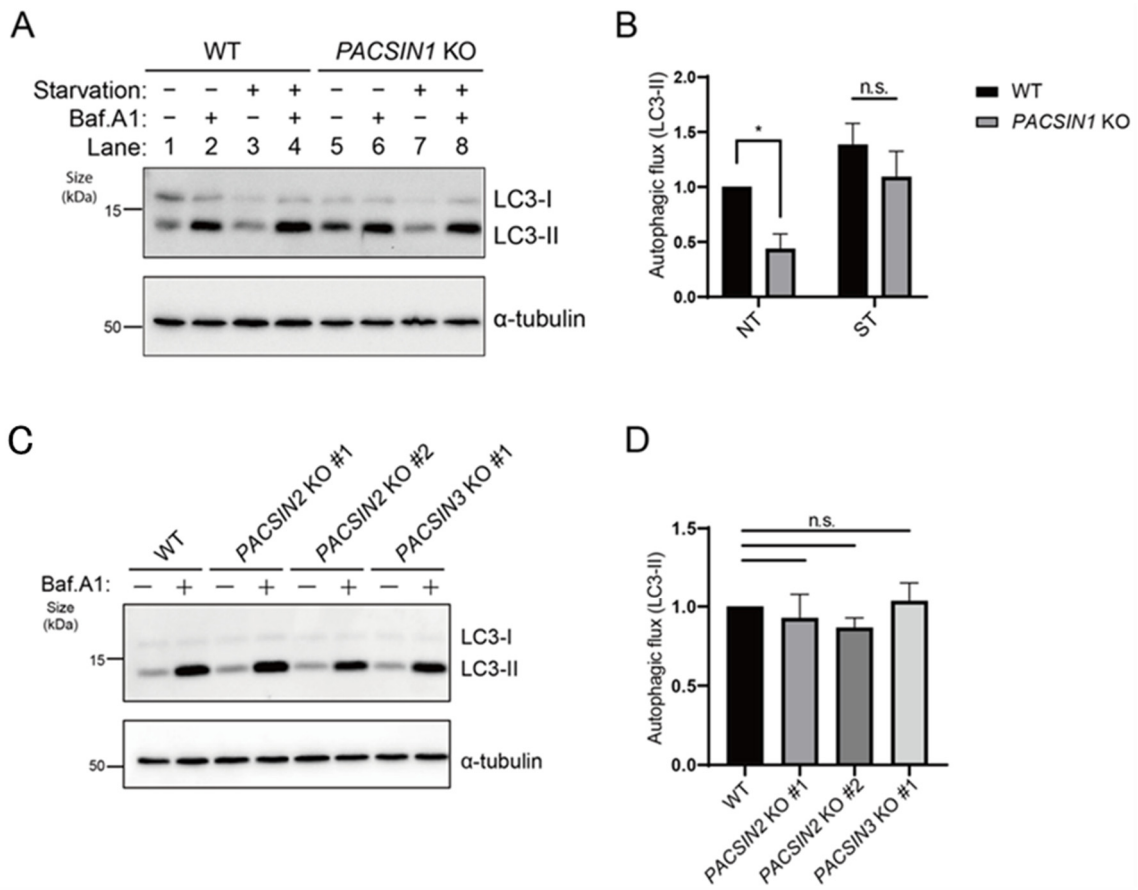


図 2. PACSIN1 は基底オートファジーに必要である

A） WT および PACSIN1 KO Hela 細胞を 2hr DMEM もしくは EBSS 飢餓培地で 125 nM Baf. A1 存在、非存在化で培養後、調製したサンプルに対し LC3 および α-tubulin に対する抗体で WB を行なった。

B） A）の定量結果（n＝3、*p＜0.05、unpaired t-test）。

C） WT および PACSIN2、PACSIN3 KO 細胞を 2hr DMEM、125nM Baf. A1 存在、非存在化で培養後、調製したサンプルに対し LC3 および α-tubulin に対する抗体で WB を行なった。

D） C）の定量結果。

2. PACSIN1 はアンフィソームとリソソームの融合に必須である

次に PACSIN1 がオートファジーのどのステップに影響を与えるかを明らかにするため、tandem fluorescent（GFP-RFP）tagged LC3 レポーターを用いたフラックス解析を行った。このプローブを用いると、オートファゴソームは GFP／RFP 両方でラベルされる一方、オートリソソームは GFP がリソソーム内の酸性環境により消光するため RFP のみでラベルされる。*PACSIN1* KO 細胞ではコントロールと比べて RFP 単独陽性のオートリソソームの割合が低下しており、オートファゴソームとリソソームの融合過程が遅延している可能性が示唆された（図 3A、B）。そこで電子顕微鏡を用いた観察を行ったところ、*PACSIN1* KO 細胞ではアンフィソームと考えられる構造体が多数蓄積していることがわかった（図 3C）。アンフィソームとはオートファゴソームが後期エンドソーム／MVBs と融合してできた中間体であり、オートファジーでは一旦このアンフィソームを経てリソソームと融合する経路と（Amphisome pathway）、オートファゴソームが直接リソソームと融合する経路（Direct fusion pathway）の 2 種類が存在する。これらのことから、PACSIN1 はアンフィソームとリソソームの融合に関わることが示唆された。これまでオートフォゴソーム・リソソーム融合には SNARE 複合体が関与することが知られていたが、*PACSIN1* KO 細胞でこの複合体形成が低下していることが明らかとなった（図 4）。このことから、PACSIN1 は SNARE 複合体のアセンブリを介してアンフィソーム・リソソーム融合を制御することが示唆された。

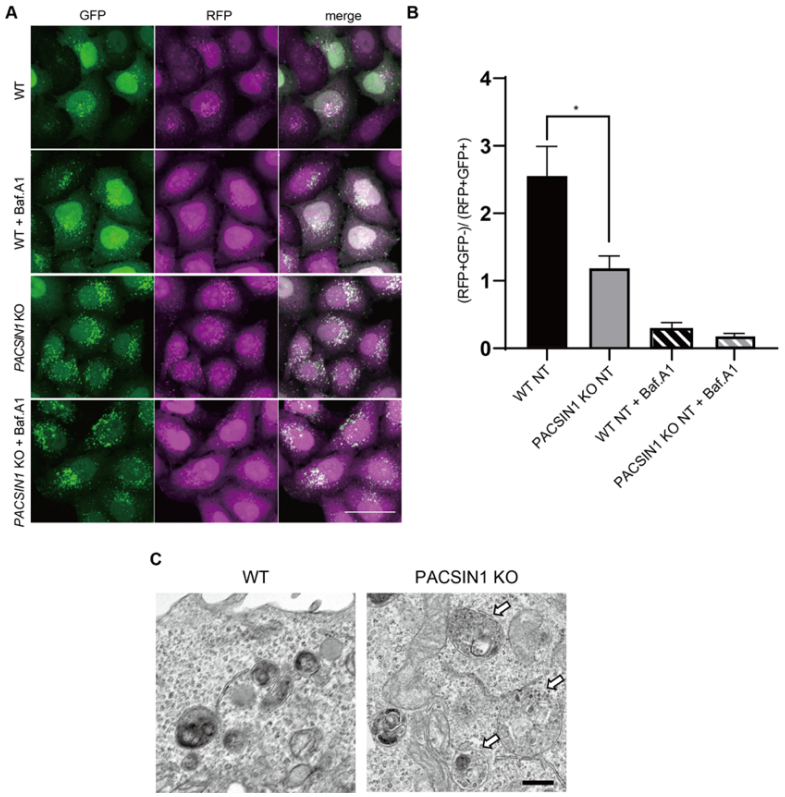


図3. PACSIN1はアンフィソーム・リソソームの融合に必要である

A) tf-LC3を安定的に発現するWTまたはPACSIN1 KO HeLa細胞を、250 nM Baf.A1添加、未添加のDMEM培地で2時間培養した。固定後、CQ1ソフトウェアを用いて細胞を解析した。スケールバー：40 μm。

B) A）の定量。RFP^+GFP^-／RFP^+GFP^+ドットの数を数え平均±s.e.m.を計算（n＝3、*p＜0.05、unpaired t-test）。

C) WTまたはPACSIN1 KO HeLa細胞を、DMEM培地で培養し、固定後、細胞を電子顕微鏡で分析した。アンフィソームは矢印で示す。スケールバー：500 nm。

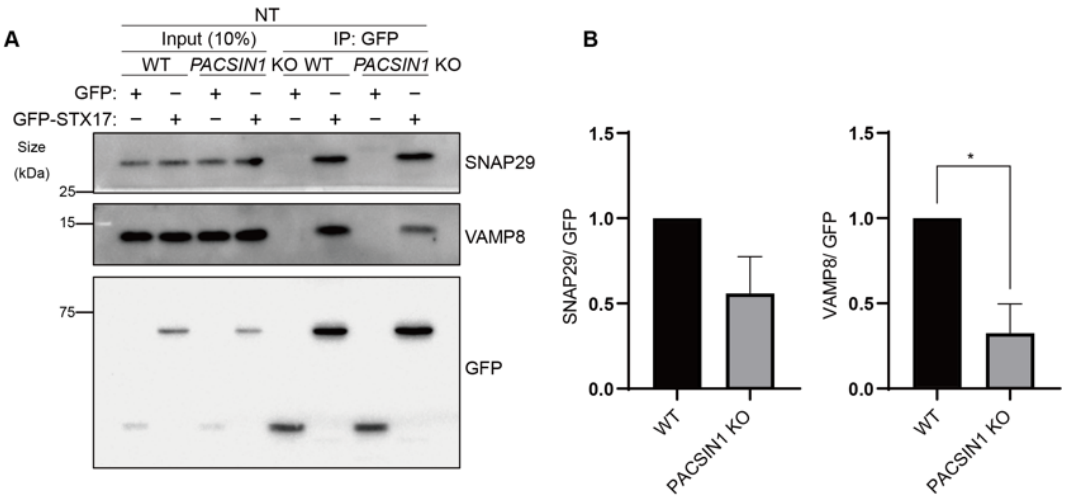


図 4. PACSIN1 は SNAREs のアセンブリを制御する

A) WT または *PACSIN1* KO HeLa 細胞に GFP-STX17 をトランスフェクションし、調製したサンプルを GFP-trap ビーズで免疫沈降させ、それぞれの抗体でイムノブロットを行った。

B) A）の定量結果。SNAP29 または VAMP8 の量を GFP で normalize し、平均値± s.e.m を算出（n=3、*p＜0.05、unpaired t-test）。

3. PACSIN1 はリソファジーを含む一部の選択的オートファジーに必要である

次に PACSIN1 によるアンフィソームを経由するオートファジー経路が損傷リソソーム修復に必須なリソファジーかについて調べた。リソファジーはリソソーム損傷に伴い誘導され、損傷リソソームがオートファゴソームによって囲まれその後残っている正常なリソソームに運ばれる。リソファジー活性を調べるプローブとして、損傷リソソームマーカーである Galectin3 に GFP と RFP をタンデムに繋いだプローブ tfGal3 を使用した。本プローブを用いると tfLC3 と同様の原理により tfGal-3 の GFP／RFP で標識された損傷リソソームがリソファジーにより正常なリソソームに運ばれると GFP が消光し RFP のみでラベルされる。コントロール細胞ではリソソーム特異的な損傷剤である LLOMe 処理後 10 時間後には GFP シグナルの低下がみられ、リソファジーが進行していることが確認できたが、*PACSIN1* KO 細胞ではこれがみられず、リソファジー活性が低下していることが明らかとなった（図 5A、B)。さらにパーキンソン病の要因となるα-シヌクレイン凝集体に対するオートファジー、すなわちアグリファジーへの PACSIN1 の寄与についても調べた （図 5C, D)。蛍光ラベルしたα-シヌクレインフィブリルを細胞に処理し、α-シヌクレイン凝集体の経時変化を調べたところ、コントロールに比べ、*PACSIN1* KO でより凝集体が残存していた。さらに、損傷したミトコンドリアに対するオートファジーであるマイトファジーでの PACSIN1 の機能も評価した (図 5E、F)。ここではいくつかあるマイトファジー経路の中でも PINK1／Parkin 依存性のマイトファジーについて調べた。Parkin を発現する細胞にバリノマイシンを処理してミトコンドリア膜電位を消失させ、マイトファジーを誘導した後、ミトコンドリア内膜タンパク質分解を経時的に観察したところ、*PACSIN1* KO 細胞とコントロールとの間に差は見られなかった。このことから PACSIN1 はマイトファジーには必要がないことが示唆された。

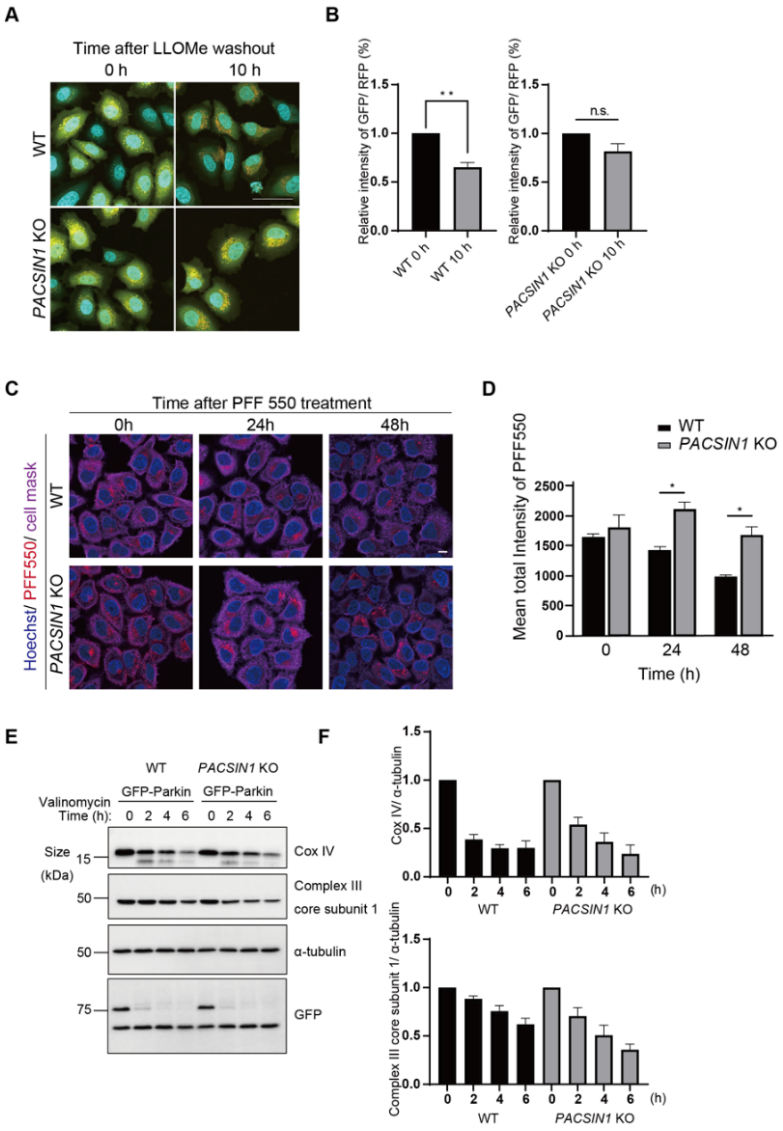


図 5. PACSIN1 はリソファジーおよびアグリファジーに必要である

A) tf-Gal3 を安定的に発現する WT、PACSIN1 KO HeLa 細胞を、1 mM LLOMe 処理 1 時間後の増殖培地で 0 時間または 10 時間培養した。スケールバー：50 μm。

B) A）の定量結果。固定後、細胞を分析し、CQ1 ソフトウェアを用いて GFP／RFP の相対平均強度を測定し平均値±s.e.m を算出（n=3、**p＜0.01、unpaired t-test）。

C) WT または PACSIN1 KO HeLa 細胞を ATTO 550 で標識したα-シヌクレイン予備線維（PFF 550）で 1 時間処理し、処理後 0、24、48 時間後に細胞を固定して指示色素で染めた。スケールバー：10 μm。

D) C）の定量結果。細胞質における PFF 550 の平均総強度は、Cell Profiler で測定した（n=3、*p＜0.05、unpaired t-test）。

E) GFP-Parkin を安定に発現する WT または PACSIN1 KO HeLa 細胞を 1 μM バリノマイシンで 0、2、4、6 時間処理し、調製したサンプルを用いて、それぞれの抗体でイムノブロットを行った。

F) E）の定量結果。Cox IV または Complex Ⅲコアサブユニット 1 の量をα-tubulin でノーマライズしたものである。数値は平均値±s.e.m（n=3）を表す。

考　察

オートファジーにはオートファゴソームが後期エンドソーム／MVBs と融合してアンフィソームを作ったのちリソソームと融合する経路と、オートファゴソームがリソソームと直接融合する経路の 2 種類の輸送経路があることが示唆されていたが、この 2 つの経路の制御機構や使い分けについては全く不明であった。本研究では新規オートファジー制御因子として PACSIN1 を同定し、これがアンフィソームとリソソームの融合を担うことが明らかとなった。また PACSIN1 は基底オートファジーに加え、選択的オートファジーの中でも損傷リソソームを隔離するリソファジーと易凝集性タンパク質を分解するアグリファジーに必須な働きを持つ一方、飢餓誘導性オートファジーやマイトファジーには必要ないことがわかった。これらのことから、2 種類のオートファジーの輸送経路がストレスや基質によって使い分けられていることが示唆された。アンフィソームを経由する経路がどのような条件で選択されているのかは不明であるが、基底レベルのリソソーム活性は飢餓時と比べて低いこと、リソファジー誘導条件下では大半のリソソームが損傷を受けていること等を踏まえると、これら条件下ではリソソームに直接基質を運ぶ前にアンフィソームを経由することで部分分解を進める必要があるのかもしれない。さらなる分子機構や生理的意義の解明を進める予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科神経内科学の望月秀樹教授、池中健介助教、角田渓太特任助教、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス領域分子医学細胞生物学の末次志郎教授、大阪大学大学院医学系研究科細胞生物学の吉村信一郎講師である。

文　献

1) Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, Yoshimori T. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. EMBO J. 2013 Aug 28;32(17):2336-47. doi: 10.1038/emboj.2013.171. Epub 2013 Aug 6. PMID: 23921551; PMCID: PMC3770333.

2) Nakamura S, 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 to kidney injury. Nat Cell Biol. 2020 Oct;22(10):1252-1263. doi: 10.1038/s41556-020-00583-9. Epub 2020 Sep 28. Erratum in: Nat Cell Biol. 2022 Nov;24(11):1677-1679. PMID: 32989250.

3) Oe Y, Kakuda K, Yoshimura SI, Hara N, Hasegawa J, Terawaki S, Kimura Y, Ikenaka K, Suetsugu S, Mochizuki H, Yoshimori T, Nakamura S. PACSIN1 is indispensable for amphisome-lysosome fusion during basal autophagy and subsets of selective autophagy. PLoS Genet. 2022 Jun 30;18(6):e1010264. doi: 10.1371/journal.pgen.1010264. PMID: 35771772; PMCID: PMC9246181.