

ショウジョウバエを用いた筋細胞オルガネラの解析

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター
藤田 尚信

筋細胞は高度に分化した多核の細胞であり、筋原線維やT管などの特殊な細胞内構造体を持つ（図1）。興奮収縮連関において、筋細胞の収縮は筋小胞体から放出されるカルシウムイオンにより制御されている。運動神経から伝えられたシグナルは細胞膜上の受容体を介して筋小胞体へと伝えられる。効率的な収縮には、“細胞表面”と細胞内に張り巡らされた筋小胞体が至る所で接触している必要があるが、筋細胞は巨大な細胞であり、細胞内部は表面から遠く隔たれている。そのギャップを埋めるべく、筋細胞には細胞膜と連続したT管と呼ばれる網目状の膜構造が張り巡らされており（図1）、同調した収縮を可能にしている。遺伝性の筋疾患から、T管をはじめとした筋細胞オルガネラの生理的重要性は知られているが、それらが形作られる分子メカニズムは十分に理解されていない。

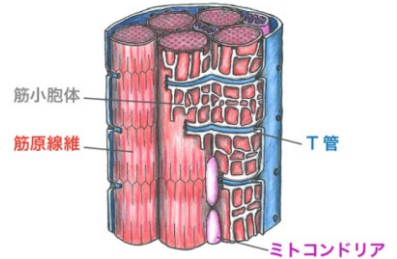


図1. 筋細胞の模式図

筋細胞の *in vitro* モデルとして広く用いられているC2C12細胞（マウス横紋筋由来培養細胞）は、分化誘導後も発達した筋オルガネラを持たない。また、筋オルガネラは精製が非常に困難であることもあり、それらの形成メカニズムの解析は阻まれてきた。私は、筋細胞の構造は進化を通じて高度に保存されており、ショウジョウバエも哺乳動物と同様に発達した筋オルガネラを持つ点に着目した。ショウジョウバエは無脊椎動物であり、筋細胞が体表直下に位置することも筋オルガネラを解析する際に大きな利点である。申請者は、蛍光タンパク質を付加した各オルガネラのマーカータンパク質と共焦点顕微鏡を利用して、生きたショウジョウバエ個体の筋オルガネラを角質越しに簡便に観察できることを見出した。

このような背景から、本研究では、筋細胞オルガネラの形成メカニズムを明らかにすべく、ショウジョウバエの筋細胞を材料に、以下の3つの課題に取り組んだ。

1. 筋細胞に見られる管状リソソームネットワークの解析

リソソームは、酸性加水分解酵素を含む細胞内小器官であり、真核細胞に普遍的に存在する分解の場である。筋細胞が萎縮もしくは肥大する際には筋原線維のみでなく、その他の細胞内小器官の量も適切に調節され、筋機能が維持されている。私たちは、ショウジョウバエの変態期に一群の筋細胞がオートファジーにより大規模に作り変えられることを先に報告した（Fujita *et al.*, 2017 *eLife*）。オートファジーが誘導され、筋細胞の細胞内小器官が分解・解体される際には、最終的な分解を担うリソソームの活性も調節されていると考えられるが、その詳細は不明であった。そこで、ショウジョウバエの筋細胞が作り変えられる際に、リソソームの量と形がどのように変化するのか詳細に検討した。その結果、オートファジーが亢進するタイミングに、筋細胞内に管状の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見出した。オートファジー欠損体では管状構造が失われ、球状のリソソームが見られたことから、この管状ネットワークの形成はオートファジーに依存していることが判明した（図2）。また、管状ネットワークの内部は実際につながっており、球状のリソソームと比較して、広い範囲でより均質になっていることが明らかになった（図3）。管状リソソームネットワークの形成能と筋細胞の機能との間に良い相関が見られたことから、管状リソソームネットワークは、筋細胞内のリソソームを広い範囲で同調させると同時にその表面積を増大させて、効率的かつ同調した分解を可能にしていると考えられる。

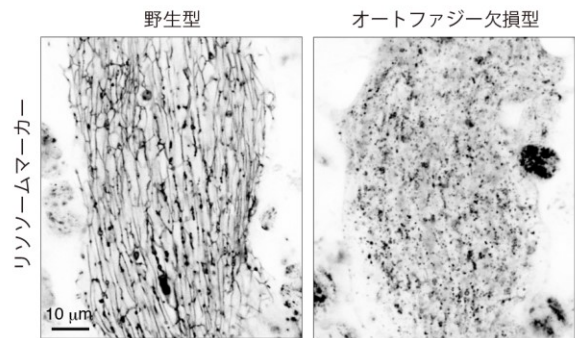


図2. 管状リソソームネットワークの形成はオートファジーに依存している

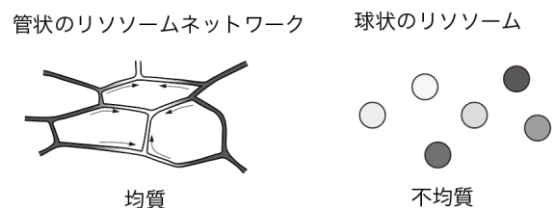


図3. 球状と管状リソソームの比較

本成果は、Journal of Cell Science 誌に掲載され、2020年のJCS Prizeを受賞した。

2. 抗 HA 抗体プローブを用いた生細胞局在解析システムの構築

上述のように、ショウジョウバエでは、蛍光タンパク質で標識した生体の筋オルガネラを角質越しに観察可能である。しかしながら、目的のタンパク質の局在を検討する際には、多くのケースで、新たな組換え体を作成する必要があるため、多大な時間と労力を要する。私たちは、ショウジョウバエには、HA タグ付きの UAS-ORF ライブラリー (FlyORF) が整備されていること、また、遺伝子コード型の本鎖抗 HA 抗体プローブである HA Frankenbody が作成されていることに着目し、HA Frankenbody に GFP もしくは RFP 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。HA Frankenbody の組換え体と異所的な発現系である GAL4/UAS システムを組み合わせることにより、HA タグを持つ任意のタンパク質の局在を目的の組織で生細胞観察できるようになった (図 4)。実際に、各オルガネラに局在する代表的なタンパク質の HA タグ付き組換え体を FlyORF より入手し、筋細胞でそれらの局在を観察できることを明らかにした (図 5)。本システムは、今後、筋細胞オルガネラの機能を解析する際の基盤になると同時に、広範な研究分野で利用されると期待される。

本成果のプレプリントは bioRxiv に既に公開しており、近日中に学術誌に掲載される予定である。

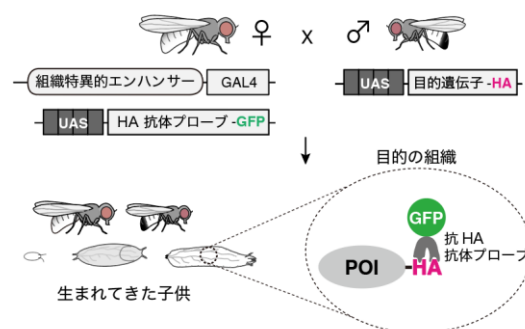


図 4. 抗 HA 抗体プローブを用いた局在解析システムの概要

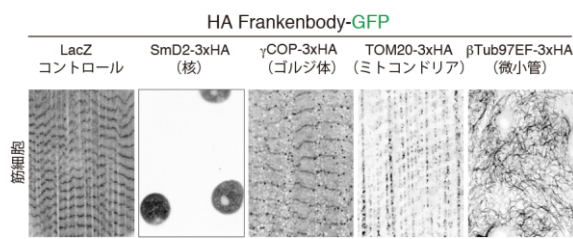


図 5. 抗 HA 抗体プローブを用いた筋細胞における HA 融合タンパク質の生細胞イメージング

3. 近接依存性標識法を利用した T 管の in vivo プロテオミクス

興奮収縮連関に重要な筋オルガネラである T 管の生理的な重要性は良く知られているが、T 管が形作られるメカニズムは十分に明らかにされていない。T 管は管状のネットワーク構造体であり細胞分画が非常に困難であることから、プロテオミクスはこれまで成功していない。私たちは、近年開発された近接依存性ビオチン標識法を用いることにより、T 管のプロテオミクスが可能になるのではないかと考えた。そこで、ビオチンリガーゼに T 管局在タンパク質もしくは T 管-筋小胞体接合部局在タンパク質を付加したコンストラクトを作成し、それらの組換えショウジョウバエを作成した。さらに、それらの組換え体を用いて T 管もしくは T 管-筋小胞体接合部のプロテオミクスを実施した。この解析から得られた候補遺伝子を、T 管を対象としたハイスループット解析系に供し、複数の T 管もしくは T 管-筋小胞体接合部関連遺伝子を同定した。現在、得られた遺伝子の機能解析を進めている。本解析から得られた一群の遺伝子の機能を明らかにすることにより、T 管および T 管-筋小胞体接合部が形作られるメカニズムの理解が飛躍的に進むと期待される。

業績リスト

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 (JCS PRIZE 2020)

2. Murakawa, T., Nakamura, T., Kawaguchi, K., Murayama, F., Zhao, N., Stasevich, T., Kimura, H., *[Fujita, N.](#)

A Drosophila toolkit for imaging of HA-tagged proteins unveiled a block in autophagic flux in the last instar larval fat body.

bioRxiv (2021) doi: 10.1101/2021.05.18.444637 (*Development*, under revision)