

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ショウジョウバエの発生に伴い誘導されるオートファジーの解析
Title(English)	Analysis of developmental autophagy in Drosophila
著者(和文)	村川直柔
Author(English)	Tadayoshi Murakawa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12659号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:藤田 尚信,岩崎 博史,木村 宏,中戸川 仁,加納 ふみ
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12659号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

令和5年度
博士論文（要約）

ショウジョウバエの発生に伴い誘導されるオートファジーの解析
(Analysis of developmental autophagy in Drosophila)

東京工業大学
生命理工学院 生命理工学系 生命理工学コース
村川 直柔

指導教員 藤田尚信 准教授

この論文は未発表の内容を含むため、全文を公開することができません

目次

略語表.....	5
概要.....	7
第一章 序論.....	9
1.1 細胞のリモデリング.....	9
1.2 発生に伴い誘導されるオートファジ.....	9
1.3 オートファジーの分子メカニズム.....	10
1.4 ホルモンによるショウジョウバエの発生制御とオートファジーの誘導.....	11
1.5 本研究の目的.....	12
第二章 変態期の脂肪体における発生に伴うオートファジーの解析.....	13
2.0 背景.....	13
2.0.1 Ecdysone によるショウジョウバエ変態の調節.....	13
2.0.2 脂肪体.....	13
2.0.3 脂肪体における飢餓誘導性オートファジーの誘導メカニズム.....	14
2.0.4 脂肪体におけるホルモン誘導性オートファジーの誘導メカニズム.....	14
2.0.5 飢餓およびホルモン誘導性オートファジーのオートリソソームの形態の違い.....	15
2.0.6 本章の目的.....	15
2.1 Frankenbody を用いたオートファジー分解を可視化するシステムの構築.....	15
2.2 ホルモン誘導性オートファジーではオートリソソームの内部でも GFP が消光しない.....	16
2.3 ホルモン誘導性オートファジーではオートリソソームの分解活性が低下している.....	17
2.4 white prepupa 期のリソソームの肥大はオートファジーに依存しない.....	19
2.5 蛹化初期におけるオートリソソームの分解活性の低下は個体の生存に必須である.....	20
2.6 考察.....	22
2.6.1 本章の総括.....	22
2.6.2 ホルモン誘導性オートファジーにおけるオートリソソーム肥大化のメカニズム.....	22

2.6.3 オートリソソームの分解活性を抑制するメカニズム	23
2.6.4 肥大したオートリソソームは Storage vacuole として機能する	24
第四章 総合討論	25
4.1 本研究の総括	25
4.2 筋細胞と脂肪体で分解の亢進と抑制の違いが生まれる要因	25
4.3 今後の展望	25
第五章 材料と方法	27
5.1 脂肪体に関連した実験の材料と方法	27
5.2 筋細胞に関連した実験の材料と方法	30
参考文献	34
図表	38
脂肪体に関連した実験の結果	38
遺伝子型表	52
共焦点顕微鏡の設定値の表	53
謝辞	54

略語表

APF	after puparium formation
ATG	autophagy related gene
ATP	adenosine tri-phosphate
Bnip3	BCL2 Interacting Protein 3
CA	corpus allatum
Cytb5	Cytochrome b5
DIOM	Dorsal internal oblique muscle
EcR	Ecdysone receptor
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
GAL4	galactose metabolism 4
GFP	green fluorescent protein
GO	gene ontology
IL	instar larva
LSP	larval storage protein
Lamp1	lysosomal-associated membrane protein 1
Mitf	Microphthalmia Transcription Factor
PBS	phosphate buffer saline
PC	principal component
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PG	prothoracic gland
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
RNA-seq	RNA sequencing
RNAi	RNA interference
Rab5	Ras related in brain 5
Ref(2)P	refractory to sigma P
Rheb	Ras homolog, mTORC1 binding
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor complex
Snap29	synaptosomal-associated protein 29

Spin	Spinster
Stx17	Syntaxin 17
T-tubule	transverse tubule
TEM	Transmission Electron Microscopy
TFEB	Transcription Factor EB
TORC1	target of rapamycin complex 1
Tor	target of rapamycin
UAS	upstream activation sequence
V-ATPase	vacuolar proton ATPase
Vamp7	vesicle-associated membrane protein 7
Vha	Vacuolar H ⁺ -ATPase
mCD8	mouse CD8
mCh	monomeric Cherry
mRNA	messenger ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
usp	ultraspiracle
βtub60D	β-Tubulin-60D

概要

筋細胞や脂肪細胞などの終分化した細胞では、環境変化への適応や発生の際に、オルガネラや細胞質成分の大規模なリモデリングが見られる。この細胞のリモデリングには、細胞内の分解経路であるオートファジーを伴うものがある。その際に見られるオートファジーは、飢餓などのストレス応答とは異なり、ホルモンや成長因子によって誘導されることから、「発生に伴うオートファジー」と呼ばれる。その存在は以前から知られているものの、発生に伴うオートファジーの誘導メカニズムや機能は、まだわかっていない点が多い。ショウジョウバエでは、幼虫終期から蛹化初期にかけて、変態ホルモンの作用により、脂肪体や筋細胞などの多様な組織においてオートファジーが誘導される。この現象は非常に再現性よく見られる現象であり、発生に伴うオートファジーの優れた解析モデルである。本研究では、ショウジョウバエの脂肪体と筋細胞で見られる発生に伴うオートファジーのメカニズムと機能の解明を目指した。

脂肪体は栄養の貯蔵と供給に重要な組織である。脂肪体で見られる発生に伴うオートファジーでは、オートファゴソームとリソソームの融合により生じるオートリソソームの顕著な肥大化が見られる。これまでにオートリソソーム肥大化は、過剰にオートファジーが誘導されるために引き起こされると考えられてきた。このような仮説に反し、本研究は、発生に伴うオートファジーにより形成されるオートリソソームでは酸性化と分解が抑制され、オートリソソームが肥大していることを明らかにした。また、発生に伴うオートファジーでみられるオートリソソームの肥大化は、オートファジーよりも、エンドサイトーシス経路の寄与が大きいことが判明した。さらに、オートファジーが誘導されるタイミングに脂肪体特異的にオートリソソームの分解活性を強制的に上げると、オートリソソームの肥大化が抑えられ、蛹期に致死となった。このように、オートリソソームの分解活性の抑制は正常な変態に必要であることから、発生に伴うオートファジーにより形成される脂肪体の肥大したオートリソソームは、蛹期に必要な栄養源の貯蔵に働くと考えられる。

ショウジョウバエ成虫は、蛹殻からの脱出に働く一群の筋細胞 (DIOMs) を持つ。DIOMs は、幼虫由来の筋細胞が蛹期にリモデリングされたものである。DIOM リモデリングでは、筋萎縮に伴いオルガネラが大規模に分解された後、筋肥大に伴いオルガネラが新たに作られる。この DIOM リモデリングにおいて、筋萎縮が見られる蛹期前期には、発生に伴うオートファジーが見られることは知られていたが、その全体像や筋萎縮におけるオートファジーの機能はよくわかっていなかった。そこで本研究では、DIOMs を単離する方

法を新たに確立し、single cell RNA-seq の手法を用いて、筋細胞リモデリングに伴うトランスクリプトームの経時的な変化を明らかにした。得られたデータの Gene ontology 解析から、DIOM リモデリングの各ステージで異なる機能を持つ遺伝子群の発現が上昇していることが明らかになった。また、リモデリング前後の DIOMs では、代謝系が嫌氣的なものから好氣的なものに切り替わっていることが示唆された。さらに、オートファジーは、DIOM リモデリングに伴う転写調節と栄養供給にはあまり寄与していないことが判明した。その一方で、幼虫筋由来の筋小胞体のクリアランスにオートファジーが重要であることが明らかになった。オートファジーが幼虫筋由来のミトコンドリアの分解に必要であることは、これまでに示されている。よって、DIOM リモデリングにおけるオートファジーの一義的な意義は、筋細胞の構造維持と代謝系の切り替えに必要な幼虫筋オルガネラのクリアランスにあると考えられる。

本研究によって、変態ホルモンによって誘導されるオートファジーであっても、組織によってその形は大きく異なることが明らかになった。脂肪体では、分解抑制による栄養源の貯蔵に働く一方、筋細胞ではオルガネラのクリアランスに重要であった。したがって、「発生に伴うオートファジー」はオートファジーが誘導されているだけではなく、多様な様式と機能を持っていることが明らかになった。発生に伴うオートファジーは、変態ホルモンの作用による転写調節により誘導されると考えられる。本研究で実施した筋細胞リモデリングの経時的な RNA-seq から、一群のオートファジー関連遺伝子はある特徴的な発現変動パターンを示すことを見出した。さらに、それらと似た発現パターンを示す数百個の遺伝子のリストを得ている。今後は、得られた候補遺伝子を探索することにより、「発生に伴うオートファジー」の誘導に関わる新たな遺伝子を同定できると期待される。

第一章 序論

1.1 細胞のリモデリング

真核細胞は、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ体などのオルガネラや、細胞骨格系、膜を持たない液滴状のオルガネラなど、様々な細胞質成分を持つ。これらの細胞質成分は、細胞外環境の変化や、ホルモンや成長因子などの刺激に応じて、リモデリングされる。例えば、哺乳類の白色脂肪細胞は、個体が寒冷な環境に置かれたり、甲状腺ホルモンの刺激を受けると、ミトコンドリア合成を促進する。その結果、白色脂肪細胞は、熱産生などに重要な褐色脂肪細胞へリモデリングされる (Machado et al., 2022)。また、筋細胞は個体の運動量や栄養状態などに応じて、萎縮と肥大を恒常的に繰り返している。その際、筋細胞のオルガネラも分解および再形成され、質と量が調節されている (Sartori et al., 2021)。加えて、酸化、浸透圧、高温などのストレス条件下に細胞が置かれると、細胞質に Stress granule と呼ばれる液滴状の膜を持たないオルガネラが形成される。Stress granule は、細胞がストレスに対処するために必要である (Hirose et al., 2023)。さらに、ショウジョウバエでは、変態期に変態ホルモンの作用により、筋細胞や脂肪体において、細胞質成分やオルガネラ分解を伴う大規模なリモデリングが見られる (Fujita et al., 2017; Y. Zhang & Xi, 2015)。このように、細胞のリモデリングは、個体の組織を構成する終分化した細胞でよくみられる。しかしながら、生体内の細胞リモデリングを再現性よく解析することは難しく、その実態はまだ十分にわかっていない。

1.2 発生に伴い誘導されるオートファジー

オートファジーは、細胞質成分を二重膜構造のオートファゴソームに包み込み、リソソームに運んで分解する機構である (図 1)。オートファジーは、オルガネラなどを含む細胞質成分を大規模に分解することができる。この分解は、飢餓時の栄養源の供給、機能が低下したオルガネラの除去や細胞質に侵入した病原体の除去にも働くことが明らかにされている (Morishita & Mizushima, 2019)。これらは、細胞の環境変化に応じて誘導されるものであり、ストレス応答性のオートファジーと定義できる。一方、発生の特定の時期に再現性よくオートファジーが誘導されることが近年明らかになってきた (Allen & Baehrecke, 2020)。この発生に伴い誘導されるオートファジーは、上記のストレス応答性オートファジーとは異なり、増殖因子やホルモンの作用により誘導されると考えられている。これを「発生に伴うオートファジー」と呼ぶ。

発生に伴うオートファジーは、様々な生物種で見られる。線虫では、生殖系列の細胞の胚発生の初期にオートファジーが誘導される (Tian et al., 2010)。線虫の受精卵は、母由来の生殖系列細胞の分化に重要な mRNA を含む P-granule と呼ばれる液滴を持つ。この液滴は、卵割の際に予定生殖系列細胞にのみ継承される。生殖系列以外の細胞では、P-granule がオートファジーにより分解されると報告されている (Y. Zhang et al., 2009)。また、魚類の浮袋や哺乳類の肺の形成にも、オートファジーが重要である。肺や浮袋の上皮細胞で囲まれた袋構造の内側を膨らませるためには、水の表面張力を抑制し、袋が収縮しようとする力を抑える必要がある。そのために、肺や浮袋の表面に位置する上皮細胞は脂質を多く含むラメラ体と呼ばれる構造をエキソサイトーシスによって袋の内側に放出し、細胞外部の水の表面張力を下げている。詳細なメカニズムは未だ明らかにされていないが、ラメラ体の成熟にオートファジーが必要である (Morishita et al., 2020)。さらに、ショウジョウバエでは、蛹期に幼虫を成虫に作り替える際に、様々な組織でオートファジーが誘導されている (詳しくは後述)。

このように、発生に伴うオートファジーの存在は以前から知られているものの、その機能や誘導のメカニズムはまだよくわかっていない。その原因の一つには、生体の組織で起こる現象を簡便に再現性よく観察することが困難である点が挙げられる。そこで本研究では、遺伝学的解析に優れ再現性良く発生に伴う細胞の動態を解析できるショウジョウバエの組織をモデルに用いて、発生に伴うオートファジーの研究を行なった。

1.3 オートファジーの分子メカニズム

先述のように、オートファジーは二重膜構造のオートファゴソームにより細胞質成分を包み込み、リソソームに輸送して分解する機構である。図 1 に示すように、オートファジーは主に、①オートファゴソーム形成、②オートファゴソームとリソソームの融合、③分解とリサイクルの 3 つのステップに分けることができる。これまでの研究から、それぞれのステップに重要な遺伝子群の同定とそれらの機能解析により、各ステップの詳細な分子メカニズムが明らかになりつつある。なお、オートファジーの分子メカニズムには、出芽酵母と多細胞生物の間には相違点がみられる。本研究ではショウジョウバエをモデルに用いているため、多細胞生物におけるオートファジーの分子メカニズムを概説する。ステップ①；飢餓などの刺激によってオートファジーが誘導されると、小胞体の近傍でオートファゴソームの前駆体である隔離膜が形成される。この隔離膜が脂質膜の供給を受けて伸張することで細胞質を囲んだ二重膜構造のオートファゴソームが形成される。この隔離膜の形成と伸張には、少なく

とも 17 のオートファジー関連遺伝子 (*Atg* 遺伝子など) が必要である (Nakatogawa, 2020)。ステップ②; 完成したオートファゴソームはリソソームと融合する。この過程には、SNARE 複合体が関与している。完成したオートファゴソームに局在する Stx17、細胞質の Snap29、リソソームの膜に局在する Vamp7 が SNARE 複合体を形成し、オートファゴソーム外膜とリソソームの融合を促進する (Itakura et al., 2012; Takáts et al., 2013)。また、一つのオートファゴソームに対して、複数のリソソームが融合すると考えられている (Tsuboyama et al., 2016)。ステップ③; オートファゴソームとリソソームが融合すると、オートファゴソームの内容物は、内膜もろともリソソーム内の種々の酸性加水分解酵素により分解される。その結果生じた小分子は、リソソーム膜のトランスポーターによって細胞質に戻されリサイクルされる (Ballabio & Bonifacino, 2020)。

1.4 ホルモンによるショウジョウバエの発生制御とオートファジーの誘導

ショウジョウバエは完全変態昆虫であり、幼虫期と蛹期を経て成虫になる。このようなショウジョウバエの発生は、脳の二種類のホルモン産生細胞から体液へ放出される 2 つのホルモンによって制御されている。図 2 に示すように、PG (prothoracic gland) はステロイド骨格を持つホルモンである Ecdysone を放出し、CA (corpus allatum) は、脊椎動物の発生に重要なレチノイン酸と似た化学構造を持つホルモン Juvenile hormone を放出する (Quinn et al., 2012; X. Zhang et al., 2022)。Ecdysone が幼虫の脱皮と変態期への移行を制御する変態ホルモンであるのに対し、Juvenile hormone は幼虫の変態期への移行を抑える幼若ホルモンとして働いている。どちらのホルモンも細胞に作用して遺伝子発現に影響を与えることにより、脱皮や変態期への移行を制御している。Juvenile hormone による転写調節の具体的な分子メカニズムは様々なモデルが提唱されているが、Ecdysone による転写調節の分子メカニズムは比較的よく理解されている (Quinn et al., 2012)。ショウジョウバエ各組織の細胞は、核内に Ecdysone の受容体と転写因子の機能を持つ Ecdysone receptor (EcR) を発現している。EcR は、ultraspiracle (usp) と複合体を形成しており、Ecdysone を受容すると、変態期の移行に重要な遺伝子の発現を促進する。このように、幼虫の体液中の Ecdysone 濃度の上昇によって、各組織で EcR を介した転写調節が働き、変態期への移行が始まる。

変態期には Ecdysone による転写調節により、複眼、唾液腺、脂肪体、また筋細胞などで、オートファジーが誘導されると報告されている (図 2)。成虫の複眼は、幼虫が持つ成虫の複眼原基細胞が、変態期に分裂、分化することで形成される。この細胞の分化にオートファジ

ーが関わっており、複眼細胞特異的にオートファジーを抑制すると、分化の途中で細胞死が起こり、成虫の複眼が失われる (Billes et al., 2018)。また、唾液腺は変態期に細胞死を起こすが、その細胞死の直接的な原因は、プログラム細胞死に関わるプロテアーゼ Caspase ではなく、オートファジーに主に依存しているという報告がある (Allen & Baehrecke, 2020)。その一方、脂肪体や筋細胞ではオートファジーが誘導されることが報告されているが、それらの細胞における発生に伴うオートファジーの具体的な機能は明らかにされていない。また、いずれの細胞においても、Ecdysone による転写調節がどのようにオートファジーの誘導に繋がるのか、そのメカニズムもほとんど明らかにされていない。

1.5 本研究の目的

上述の背景から、本研究では、脂肪体と筋細胞における発生に伴うオートファジーの生理的な機能とオートファジーが誘導されるメカニズムを明らかにすることを目指した。

第二章 変態期の脂肪体における発生に伴うオートファジーの解析

脂肪体は、個体の栄養恒常性の維持を司る器官である。栄養飢餓時と幼虫最終期に、脂肪体においてオートファジーが誘導されるが、オートリソソームの形態には大きな違いが見られる。私は、オートリソソームの形態に見られる違いを手がかりに、幼虫最終期の脂肪体におけるホルモン誘導性オートファジーの生理機能の解明に取り組んだ。

2.0 背景

■2.0.1 Ecdysone によるショウジョウバエ変態の調節

孵化したショウジョウバエ幼虫は、2 回脱皮した後に蛹になる。それぞれのステージを、1, 2, 3 *Instar Larva* (IL) と呼ぶ (図 3A 左側)。25°C の飼育条件下では、3IL の期間は 2 日間であり、前半の 1 日を early 3IL、後半を late 3IL と呼ぶ。孵化した幼虫は、3IL まで絶えず摂食し大幅に成長する。

幼虫が十分に成長すると変態期への移行が始まる (図 3A 中部)。幼虫は、early 3IL 期の体重が critical weight を超えると、late 3IL まで摂食を継続した後、摂食しなくなる。摂食をやめた幼虫は、蛹化に適した場所を探して動き回る wandering larva となる。数時間の wandering larva の期間の後に、幼虫は蛹化する。幼虫が蛹化してから数十分間を white prepupa と呼ぶ。white prepupa から 4 日間の変態期 (metamorphosis) を経て、成虫は羽化する。

このようなショウジョウバエの発生過程では、図 3A の①から④に示される体液中の Ecdysone 濃度の変動によって、次のステージへの移行が制御されている (Quinn et al., 2012)。細胞が経験した Ecdysone パルスの回数と各パルスの強度に応じて、転写調節が切り替わり、各器官の細胞はそれぞれのステージに応じた挙動を示す。

■2.0.2 脂肪体

脂肪体は多くの昆虫が持つ組織であり、脊椎動物の肝臓や脂肪組織の機能を併せ持つ。巨大な脂肪滴を多数持つ脂肪体を構成する細胞は、互いに結合して一つの組織を形成しており、幼虫の体内の大部分を占めている (図 3B)。脂肪体の主要な機能は、栄養源の貯蔵と供給で

ある。絶えず摂食する 1IL から 3IL のショウジョウバエの幼虫では、余剰の栄養分は脂肪体細胞に糖や脂質として貯蔵される。脂肪体は体液タンパク質の分泌にも関わり、アミノ酸は体液中のタンパク質である Larval storage protein (LSP) として貯蔵される (Haunerland, 1996; Y. Zhang & Xi, 2015)。このように蓄えられた糖、脂質、アミノ酸などの栄養は、幼虫が飢餓条件に置かれたときや、外部からの栄養供給が絶たれる変態期の主要な栄養源となる。栄養飢餓時や蛹化の直前には、脂肪体においてオートファジーが誘導され、栄養レベルの低下を補填していると考えられている (Scott et al., 2004)。

■2.0.3 脂肪体における飢餓誘導性オートファジーの誘導メカニズム

成長期の幼虫が飢餓条件に置かれると、脂肪体でオートファジーが亢進する。その際は、様々な生物種で見られる飢餓により誘導されるオートファジーと共通して、Target Of Rapamycin Complex 1 (TORC1) と Atg1 複合体を介したメカニズムによってオートファジーが誘導される (図 4A)。TORC1 は細胞の栄養状態のセンサーであり、TORC1 が持つキナーゼ活性は栄養状態に応じて変化する。富栄養条件下では TORC1 は活性化状態にあるが、飢餓条件下では TORC1 のキナーゼ活性は抑制される。TORC1 によりリン酸化を受けるタンパク質の中に、Atg1 と Atg13 がある。Atg1, Atg13, FIP200, また Atg101 の 4 者は、オートファジー誘導に重要な Atg1 複合体を形成している。富栄養条件下では、Atg1 複合体の Atg1 と Atg13 は TORC1 によってリン酸化され、オートファゴソーム形成は抑制されている。一方、飢餓条件下では TORC1 は抑制されるため、Atg1 と Atg13 のリン酸化状態は変化し、Atg1 複合体は活性化する (Chang & Neufeld, 2010)。その結果、オートファゴソームの形成が促進される (図 4A)。

■2.0.4 脂肪体におけるホルモン誘導性オートファジーの誘導メカニズム

上述のように、脂肪体ではホルモン誘導性のオートファジーも見られる。ホルモン誘導性のオートファジーの実体はよくわかっていないが、その誘導メカニズムは、飢餓による誘導とは異なることが示唆されている。幼虫が Late 3IL 期に入ると図 3A①の Ecdysone のパルスによって、脂肪体においても転写が調節され、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) シグナル伝達経路が抑制される (図 4A)。その結果、メカニズムは不明であるが、オートファゴソーム形成が促進されると考えられている (Rusten et al., 2004)。Ecdysone を介したオートファジー

誘導では、TORC1 の活性は高いままである、もしくは不完全に抑制された状態であると考
えられている (図 4A) (Rusten et al., 2004)。このように、ホルモン誘導性オートファジーは
TORC1 の活性調節に依らないと考えられる点が、飢餓誘導性オートファジーとの大きな相
違点である。

■2.0.5 飢餓およびホルモン誘導性オートファジーのオートリソソームの形態の違い

飢餓誘導性とホルモン誘導性のオートファジーでは、誘導のメカニズムだけでなく、オート
ファゴソームとリソソームが融合したオートリソソームの形態にも違いが見られる
(Mauvezin et al., 2014)。飢餓条件に置かれた early 3IL の幼虫の脂肪体では、直径が 1 μm に満
たない不定型のオートリソソームが形成される (図 4B Starvation)。一方、ホルモン誘導性の
オートファジーが亢進する white prepupa の脂肪体では、直径が 5 μm 以上に肥大したオート
リソソームが蓄積する (図 4B Developmental)。このような差がみられる原因として、オート
ファジーの誘導効率の差が提唱されている (Rusten et al., 2004)。つまり、図 4C に示すよう
に、多くのオートファゴソームが形成されほど、リソソーム 1 つ当たりに融合するオートフ
ァゴソームの数が増え、オートリソソームが肥大するモデルである。しかしながら、発生に
伴うオートファジーの方が飢餓よりも誘導効率が高いという証拠はなく、このモデルを直接
的に支持するデータは報告されていない。また、オートファゴソームの量が増えるほどオー
トリソソームが肥大することが示された例もなく、ホルモン誘導性オートファジーの際に、
どのようなメカニズムによりオートリソソームが肥大するのか、その実体はわかっていなか
った。

■2.0.6 本章の目的

ショウジョウバエ幼虫最後期にオートリソソームが肥大するメカニズムと、オートリソソ
ームの肥大にどのような生理機能があるのかを明らかにすることを目指した。

2.1 Frankenbody を用いたオートファジー分解を可視化するシステムの構築

ホルモン誘導性オートファジーの解析に先立ち、私はオートファジーによる HA タグを付
加したタンパク質の分解を可視化するツールとして、HA Frankenbody に GFP と mCherry を

タンデムに付加したコンストラクト (Frankenbody-GFP-mCh) を作成した (図 5)。 (Zhao et al., 2019)。Frankenbody-GFP-mCh と HA タグを付加したタンパク質を細胞質に同時に発現させると、HA タグ付きタンパク質を GFP と mCherry によって標識することができる。mCherry は GFP よりも低い酸解離定数 (pKa) を持つため、mCherry は酸性環境であるオートリソソームの内腔でも蛍光を発するが、GFP は消光する (Kimura et al., 2007)。従って、HA タグ付きタンパク質がオートファジーによってオートリソソームに運ばれると、オートリソソームは mCherry の蛍光でのみ標識される。よって、GFP 陰性かつ mCherry 陽性の構造体を顕微鏡で観察することにより、目的の HA タグ付きタンパク質がどの程度オートファジーによって分解されるかどうかを検討できる。

ショウジョウバエでは、ゲノムワイドの HA タグ付きタンパク質の発現系統のコレクションが整備されつつある。そのため、Franken-GFP-mCh のトランスジェニック系統を新たに作成したことにより、目的タンパク質のオートファジー分解を簡便に検討できるようになった。

2.2 ホルモン誘導性オートファジーではオートリソソームの内部でも GFP が消光しない

最初に、Frankenbody-GFP-mCh を用いて、飢餓およびホルモン誘導性オートファジーを比較した。脂肪体に Frankenbody-GFP-mCh と HA タグを付加した ref(2)p (HA-ref(2)p)を発現させ、飢餓条件下の 3IL 期と、富栄養条件下の white prepupa 期のオートリソソームをそれぞれ観察した。哺乳類の p62 のホモログである ref(2)p は細胞質で液滴を形成し、オートファジーによる選択的な分解を受ける (Komatsu, 2022; Nezis et al., 2008)。それと一致して、early 3IL の富栄養条件 (fed) または飢餓条件 (stv 4 h) では、ref(2)p 液滴を示す GFP と mCherry 陽性の大きな輝点が観察され (図 6A, B e3IL fed stv 白矢頭)、オートリソソームを示す mCherry のみ陽性の構造は、飢餓条件下で増加した (図 6B, 青矢頭)。一方で、white prepupa 期には、オートファジーが誘導されているにもかかわらず、mCherry のみ陽性のオートリソソームは観察されなかった (図 6B white prepupa)。その代わりに、直径が 5 μ m 程度の肥大した GFP と mCherry 双方が陽性の構造が多数形成されていた (図 6B white prepupa 点線円内)。この構造は、ref(2)p の液滴 (図 6B white prepupa 白矢頭) と形態が大きく異なることから、ref(2)p の液滴とは異なる構造体であると考えられる。また、図 6C に示すように、GFP と mCherry 陽性の肥大した構造は、幼虫の発生に伴って mCherry のみ陽性のオートリソソームと入れ替わるように形成されていた。従って、この肥大した GFP と mCherry 陽性の構造は、オートリソソームであると示唆された。その可能性を検討するため、Franken-GFP-mCherry と HA-

ref(2)p を共発現した脂肪体を、リソソームの染色試薬である Lysotracker Deep Red を用いて染色した。その結果、GFP と mCherry 双方陽性の肥大した構造は、Lysotracker Deep Red により染色されたことから (図 6D, E)、white prepupa 期において見られる肥大した GFP と mCherry 陽性の構造は、オートリソソームであることがわかった。

なお、Frankenbody-GFP-mCherry と共発現させる HA タグ付けしたタンパク質を他の細胞質タンパク質 (GAPDH1-3xHA, CK2b-3xHA) に変更しても、HA-ref(2)p を発現させた際と同様に、white prepupa 期の脂肪体の内部に肥大した GFP と mCherry 陽性の構造が観察された (図 7A)。これは、肥大した GFP と mCherry 陽性の構造の形成は、HA タンパク質の種類に依らないことを示している。この結果から、発生に伴い誘導されるオートファジーの際に形成される肥大したオートリソソームの内腔では、GFP が消光しないことが明らかになった (図 7B)。

2.3 ホルモン誘導性オートファジーではオートリソソームの分解活性が低下している

white prepupa 期の脂肪体のオートリソソーム内腔で GFP が蛍光を発するということは、オートリソソーム内の pH が上昇していることを示唆する。リソソーム分解は、酸性領域に至適 pH を持つ酸性加水分解酵素によるため、内腔 pH の上昇はオートリソソームの分解活性の低下を引き起こしていると考えられる (Ballabio & Bonifacino, 2020)。尚、飢餓条件下の early 3IL や white prepupa 期に見られるリソソームはほぼ全てがオートリソソームである。

オートリソソームの pH 上昇を検討するため、white prepupa 期の脂肪体を Lysosensor Green を用いて染色した。Lysosensor green はリソソーム染色試薬であり、その緑色蛍光の強度は Lysosensor green 分子のプロトン化状態に依存している。したがって、Lysosensor green がオートリソソーム内で強い蛍光強度を示すほど、pH が低いことを示している (図 8A)。そこで今回は、リソソーム膜タンパク質である Lamp1-3xmCherry を用いてリソソームを標識し、飢餓誘導性オートファジーが見られる early 3IL 期と、ホルモン誘導性のオートファジーが見られる white prepupa 期のリソソーム内腔の pH を Lysosensor green を用いて比較した。その結果、early 3IL 期では飢餓依存的に、Lamp1 陽性リソソームの Lysosensor green の蛍光強度が有意に上昇していた (図 8B, C)。ショウジョウバエでは、飢餓 (stv 4 h) の際にオートファジーに依存してリソソームの酸性化が促進されるため、今回の結果は過去の報告と一致する (Lőrincz et al., 2017)。従って、この実験系によりリソソームの相対的な pH が評価できていることがわかった。次に、飢餓条件下の early 3IL 期とホルモン誘導性オートファジーがみられ

る white prepupa 期の脂肪体の Lysosensor green の蛍光強度を比較すると、white prepupa 期の方が early 3IL 期に比べて有意に蛍光強度が低下していた (図 8B, C)。つまり、脂肪体におけるホルモン誘導性オートファジーでは、オートリソソームの pH が上昇していることが明らかになった。

オートリソソームの pH 上昇は、オートリソソーム内腔の酸性加水分解酵素の活性を低下させると考えられる。そこで、次にホルモン誘導性オートファジーの際に形成されるオートリソソーム内腔のプロテアーゼ活性を Magic Red を用いて検討した。膜透過性化合物である Magic Red は、リソソームの酸性プロテアーゼであるカテプシン L により切断される配列を持ち、切断されることで赤色蛍光を発する (図 9A)。よって、Magic Red の蛍光強度を測定することにより、リソソーム内のカテプシン L の分解活性を評価することができる。脂肪体を Magic Red で染色したところ、飢餓によってオートファジーが誘導される early 3IL 期に比べて、ホルモンによってオートファジーが誘導されている white prepupa 期には、Lysosensor green と同様に、Magic Red の蛍光が有意に低下していた (図 9B, C)。この結果から、ホルモン誘導性オートファジーでは、オートリソソーム内腔の Cathepsin L 活性が低下していることが明らかになった。ここまでの結果を考えると、ホルモン誘導性オートファジーでは、肥大したオートリソソームの pH 上昇し、オートリソソーム内腔の分解活性が低下していると考えられる。

一般的に、リソソーム機能が薬剤の処理や遺伝子の変異によって抑制されると、リソソームの肥大化が見られる (de Araujo et al., 2020)。そこで次に、脂肪体において、white prepupa 期におけるオートリソソーム機能の低下が、オートリソソームの肥大に与える影響を検討した。Chloroquine は弱塩基性化合物であり、リソソーム内腔に取り込まれることで pH を中和することによりリソソーム機能を低下させ、リソソームの肥大化を引き起こす (Zhou et al., 2020)。よって、white prepupa 期の脂肪体におけるオートリソソーム肥大化が、Chloroquine 処理によってさらに促進されなければ、white prepupa 期にはオートリソソームの機能がすでに低下していることを示唆する。因みに、Chloroquine は、マラリアの治療薬として使用されており、経口接種によって失活しないことが、ヒトやショウジョウバエで確認されている (Zhou et al., 2020; Zirin et al., 2013)。そこで、Lamp1-3xmCh を全身で発現する幼虫を、Chloroquine を含んだ餌で飼育し、Chloroquine 投与が white prepupa におけるリソソームの肥大化に与える影響を検討した。その結果、white prepupa 期の表皮細胞 (LEC) では Chloroquine 処理によって Lamp1 陽性のリソソームの有意な肥大化が見られたが (図 10A, B, D)、脂肪体 (Fat body) では見られなかった (図 10A, C, D)。さらに、Chloroquine 投与によって white

prepupa 脂肪体の肥大したオートリソソームの分解活性にみられる影響を Magic red 用いて検討したが、リソソームの分解活性に有意な変化は見られなかった (図 10E, F)。これらの結果から、white prepupa 期の脂肪体のオートリソソームの分解活性は Chloroquine 処理の影響がみられない程にまで低下しており、分解活性の低下がオートリソソーム肥大化の主要な要因であると考えられる。

2.4 white prepupa 期のリソソームの肥大はオートファジーに依存しない

これまでの報告では、white prepupa 期の脂肪体のリソソームの肥大化は、オートファジーの過剰な亢進によるものだと考えられてきた (Rusten et al., 2004)。その一方で、本研究のここまでの実験結果は、white prepupa 期には、オートリソソームの pH 上昇と分解活性の低下が見られた。よって、脂肪体で見られるオートリソソームの肥大化は、オートファジーの亢進ではなく、リソソーム活性の低下が原因であると考えられる。そこで本節では、リソソームの肥大の直接的な原因を検討した。

リソソームには、オートファジー経路とエンドサイトーシス経路から物質が輸送されている (Ballabio & Bonifacino, 2020) (図 11A)。エンドサイトーシス経路とは、細胞膜が陥入・くびり切られ形成された小胞を介して、細胞外成分と細胞膜成分をリソソームに輸送する経路である (図 12A 上側)。そこで、white prepupa におけるオートリソソームの肥大化に、オートファジー経路とエンドサイトーシス経路のどちらの経路が主に寄与しているのかを検討した。まず、オートファジーに必須の遺伝子である *Atg5* や *FIP200* を欠損させた系統 (*Atg5* null, *FIP200* null) で、Lysotracker Red を用いて white prepupa 期脂肪体のリソソームを染色し、その大きさを比較した。興味深いことに、*Atg5* null と *FIP200* null の両系統では、リソソームの大きさにコントロールと有意な差が見られなかった (図 11C, D, E)。次に、エンドサイトーシス経路の抑制がリソソームの肥大に与える影響を検討した。エンドサイトーシス経路において、初期エンドソーム (early endosome) が後期エンドソーム (late endosome) に成熟するためには、small GTPase である Rab5 の GTP 型と GDP 型の切り替えが必須である。*Rab5* に点変異を導入し、GDP 型に固定された *Rab5* (S43N) を過剰発現させることで、ドミナントネガティブ効果によって、エンドサイトーシス経路を抑制することができる (J. Zhang et al., 2007) (図 11A)。そこで、GAL4-UAS システムを用いることで、脂肪体に特異的に late 3IL 期から *Rab5* (S43N) を過剰発現させ、エンドサイトーシス経路を抑制した。その結果、*Rab5* (S43N) の過剰発現によって、リソソームの大きさはコントロールに比べて有意に低下した

(図 11 C, F)。従って、「ホルモン誘導性オートファジー」で見られるオートリソソームの肥大化は、過去のモデルとは異なり、オートファジー経路よりもエンドサイトーシス経路に依存していることが明らかになった。

2.5 蛹化初期におけるオートリソソームの分解活性の低下は個体の生存に必須である

ホルモンによってオートファジーが誘導される white prepupa 期には、オートリソソームの活性が低下していることが明らかになった。次に、分解活性の低下に起因するオートリソソームの肥大化に生理的な重要性があるのか検討した。

ショウジョウバエ、線虫、脊椎動物などの多細胞生物は、リソソーム関連遺伝子の転写を調節するマスター転写因子である MiTF/TFE ファミリーを持つ (図 12A)。ヒトでは TFEB、ショウジョウバエでは *Mitf* がリソソーム関連遺伝子上流の 10 塩基からなる CLEAR モチーフに結合し、細胞内分解の需要に合わせて、リソソームの合成を促進していると報告されている (Bouché et al., 2016; Sardiello et al., 2009) (図 12A)。TFEB や *Mitf* の過剰発現は、リソソームの酸性化に働く V 型プロトンポンプ (V-ATPase) のサブユニットなどをコードするリソソーム関連遺伝子の発現を促進し、リソソームの分解活性を上げる (Bouché et al., 2016; Sardiello et al., 2009)。そこで私は、脂肪体に *Mitf* を過剰発現させることにより、幼虫最終期の脂肪体で見られるオートリソソームの分解活性の低下と肥大に与える影響を検討した。Lamp1-3xmCherry によりオートリソソームを標識した脂肪体において、Lsp2-GAL4 (図 11B) を用いて脂肪体特異的に late 3IL 期から *Mitf* を過剰発現させ、Lysosensor green 染色によってオートリソソームの pH を調べた。その結果、*Mitf* を過剰発現させた脂肪体では、コントロールに比べて、Lamp1 陽性のリソソームの Lysosensor green の蛍光強度が有意に上がっていた。よって、*Mitf* 過剰発現により、リソソームの pH が低下していると考えられる (図 12B, C)。さらに、*Mitf* を過剰発現させた脂肪体のリソソームの大きさを LysoTracker Red 染色によって調べたところ、*Mitf* を過剰発現した脂肪体では、コントロールに比べて、リソソームの大きさが有意に小さくなっていることがわかった (図 12 D, E)。これらの結果から、late 3 IL 期から脂肪体に特異的に *Mitf* を過剰発現させることにより、white prepupa 期にオートリソソームの pH を低下させ、リソソームの肥大化を抑制できることがわかった。

次に white prepupa 期におけるオートリソソームの分解活性の抑制が個体の生存に重要な調べるため、*Mitf* 過剰発現による強制的なオートリソソーム活性化が個体の生存に与える影響を検討した。Lsp2-GAL4 を用いて *Mitf* を過剰発現させた個体の生存率を調べると、*Mitf* を

過剰発現させた個体は、蛹期に全てが致死となり、蛹期前半に致死となっているものが多い見られた (図 13A, B)。なお、*Mitf* はリソソーム関連遺伝子に加えて、オートファジー関連遺伝子の発現も亢進させると報告されている (Bouché et al., 2016)。そこで、オートファジー誘導の可能性を排除するため、*Mitf* の過剰発現とオートファジーに必須な *Atg9* の欠損を組み合わせた際の個体の生存率も検討した。その結果、*Mitf* 単独の過剰発現と、*Atg9* 欠損と *Mitf* 過剰発現を組み合わせた場合にも蛹の致死率に大きな違いは見られなかった (図 13C)。これらの結果から、脂肪体特異的な *Mitf* の過剰発現によりリソソーム活性を亢進させると、オートファジーには依存せずに、蛹期致死になると考えられる。

最後に、early 3IL 期から white prepupa 期への発生に伴って、脂肪体におけるリソソーム関連遺伝子の発現にどのような変動が見られるのか mRNA-seq により検討した。野生型個体の脂肪体において、①リソソーム活性が高い early 3IL 期と、オートリソソームの分解活性が抑制される white prepupa 期を比較した。また、②white prepupa 期において野生型と *Mitf* 過剰発現した脂肪体を比較した (図 14A)。なお、各サンプルについて 3 つの複製を作成し、各複製間のユークリッド距離が近いことから、再現性の良い結果が得られていることを確認した (図 14A, B)。得られた結果について、white prepupa 期において野生型と *Mitf* を過剰発現した脂肪体を比較すると、過去の報告と一致して、リソソームの酸性化に関わる V 型プロトンポンプの多くのサブユニットの発現が上昇し、他のリソソーム関連遺伝子においても発現の上昇が見られた (図 14C 下段)。一方、野生型において early 3IL 期と white prepupa 期を比較すると、一部の V 型プロトンポンプのサブユニット (*Vha* genes) や、リソソーム膜上のトランスポーターである *spinster* (*spin*)、リソソームの α -N-acetylglucosaminidase である *CG13397* の発現が低下していた (図 14C 上段)。これらの遺伝子の不全は、リソソーム活性の低下とリソソームの肥大化につながると報告されており (Dermaut et al., 2005; Rigon et al., 2021)、脂肪体におけるリソソーム活性制御メカニズムを理解する上で重要な情報であると考えられる。

2.6 考察

■2.6.1 本章の総括

本章では以下のことが明らかになった。脂肪体において、蛹化初期には、Ecdysone に依存したホルモン誘導性のオートファジーが見られるが、その際に形成されるオートリソソームの pH は高く、分解活性が低下していた (図 8, 9)。これまでの報告では、ホルモン誘導性のオートファジーで見られる肥大したオートリソソームは、オートファジーの過剰亢進によるものであると考えられてきたが、その肥大化にはオートファジーは必須ではなかった (図 11)。その一方で、オートリソソームの肥大化には、エンドサイトーシスの寄与が大きいことが明らかになった (図 11)。White prepupa 期のオートリソソームの分解活性を強制的に亢進させると、蛹期に致死になったことから、オートリソソームの分解活性の抑制は個体の生存に重要であると考えられる (図 12, 13)。また、RNA-seq のデータより、オートリソソームの分解活性が低下する時期には、リソソーム機能に重要な一部の遺伝子の発現の低下も見られた (図 14)。

■2.6.2 ホルモン誘導性オートファジーにおけるオートリソソーム肥大化のメカニズム

これまでオートリソソームの肥大の主要な原因は、オートファジーの過剰な誘導によると考えられてきたが (図 4C)、本研究で得られた知見は、オートリソソームの肥大には、オートファジーの過剰な亢進よりも、リソソーム分解活性の低下の寄与が大きいことを支持する。

① white prepupa 期のオートリソソームでは、オートリソソーム内腔の pH が高く、カテプシンに代表される酸性加水分解酵素の活性が低下していた (図 7, 8)。

② リソソーム阻害剤である Chloroquine を摂食させても、white prepupa 期の肥大したリソソームはそれ以上に肥大化することはなく、分解活性の低下も見られなかった (図 10)。これは、脂肪体における「ホルモン誘導性オートファジー」では、オートリソソームの分解活性が大幅に抑制されていることを示している。

③ white prepupa 期において、オートファジー経路ではなく、エンドサイトーシス経路の阻害によって、オートリソソームの肥大化が抑制された (図 10)。以上の 3 つの結果を合わせると、脂肪体における発生に伴うオートファジーでは、オートファジーの亢進と同時に、オートリソソームの分解活性が抑制されることで、オートリソソームの肥大化が引き起こされていると考えられる。このモデルは、オートファジーの過剰亢進がオートリソソーム肥大化の原因であるとする過去のモデルと大きく異なる。

■2.6.3 オートリソソームの分解活性を抑制するメカニズム

それでは、どのようなメカニズムによって、white prepupa の時期のオートリソソームの分解活性は抑制されているのだろうか？ 図 8 の実験から、white prepupa 期にはオートリソソームの pH が上昇していることがわかった。リソソームの pH を制御すれば、オートリソソーム内腔の酸性加水分解酵素の活性を同時に調節できるため、pH の制御はリソソームの分解活性を調節するために、効率が良いメカニズムである。よって、white prepupa 期の脂肪体では、オートリソソームの pH 上昇を介して、分解活性を抑制していると予想される。

オートリソソーム内のプロトン濃度を直接下げるメカニズムとしては、以下の 2 つの可能性が考えられる。細胞質からオートリソソーム内へプロトンを輸送する V-ATPase は、V0、V1 の二つのサブユニットから構成される。V1 サブユニットは、細胞に与えられる様々な刺激によって V0 サブユニットとの着脱が制御されている (Collins & Forgac, 2020)。したがって、white prepupa 期の脂肪体では、V1 サブユニットが V0 サブユニットから脱離し、オートリソソーム内腔へのプロトンの輸送速度が低下しているのかもしれない。しかしながら、V1 サブユニットに対する蛍光タンパク質への蛍光タグの付加は難しく、細胞内局在を観察できていない。そのため、上述の可能性の検証は今後の課題である。一方、図 11 の実験から、エンドサイトーシス経路を抑制するとオートリソソームの肥大が抑制された。それは、エンドサイトーシス経路が亢進し、オートリソソームに過剰に物質が流入することが、オートリソソーム内のプロトン濃度を低下させている可能性を示唆する。ただし、脂肪体のエンドサイトーシス活性を正確に測定することは難しいため、こちらの可能性についても今後の課題である。

リソソームの pH は、プロトンの濃度だけでなく、その他のイオンやリソソーム分解によって生じた有機物などの影響を受けている (Mindell, 2012; Sillence, 2013)。したがって、white prepupa 期の脂肪体では、様々なリソソーム関連遺伝子の発現調節によって、リソソームの pH が間接的に調節されてリソソーム機能が抑制されている可能性も考えられる。この可能性を検討するため、本研究では、RNA-seq を行った。リソソーム活性が高い 3IL 期と、リソソームの活性が低下している white prepupa 期の脂肪体のトランスクリプトームを比較した結果、一部の V-ATPase サブユニットをコードする遺伝子、*spinster (spin)*、また *CG13397* などのリソソーム関連遺伝子の発現は、3IL 期から white prepupa 期への発生に伴い低下していた (図 14C)。*spin* は、リソソーム膜にある sphingosine-1-phosphate のトランスポーターであり、その機能の低下によって、リソソーム機能の低下と肥大化が見られる (Dermaut et al., 2005)。また、white prepupa で発現量の低下が見られた *CG13397* は、ヒトのリソソーム病の

1 つとして知られる Mucopolysaccharidosis の原因遺伝子 α -N-acetylglucosaminidase のショウジョウバエホモログである。リソソーム病では、単一酵素の不全によって、リソソームの分解活性が全体的に低下し、リソソームが肥大化する。ショウジョウバエでも white prepupa 期に CG13397 の発現が低下することで、間接的に pH が上昇しリソソームの分解活性が抑制されている可能性も考えられる (Rigon et al., 2021)。

さらに別のリソソームの pH を制御するメカニズムとして、近年、代謝を介した調節があることも提唱されている。リソソームの pH は、弱塩基である NH_4^+ イオンの添加によって中和することができる。 NH_4^+ イオンはグルタミンの異化によっても生じる (Xiong et al., 2023)。また、ショウジョウバエでは発生に応じて代謝物が大きく変動することが知られている (Nishimura, 2020)。従って、何らかの原因でグルタミン異化の促進によって生じた NH_4^+ によって、オートリソソームの分解活性の低下が引き起こされているかもしれない。このような可能性の検討には、メタボローム解析が有効であると考えられる。

オートリソソームの分解活性は、オートリソソームへの物質の流入速度と分解速度のバランスによって決まる。つまり、オートリソソームに流入する物質が少なければ、弱い分解活性でも十分であるが、流入する物質が多ければ分解活性を高める必要がある。図 8, 9 で観察されたように、3IL 期の脂肪体では、飢餓条件でリソソーム活性が上昇するものの、富栄養条件ではリソソーム活性は低く維持されている。したがって、ショウジョウバエの脂肪体では定常状態において、リソソームの活性が低く設定されていると考えられる。それを考慮すると、white prepupa 期の脂肪体では、オートリソソームの機能を積極的に抑制しているのではなく、物質の流入量に合わせて、オートリソソーム機能が十分に亢進されないために、分解活性が抑制されているように見えている可能性がある。脂肪体のオートリソソーム活性調節メカニズムを明らかにすることは、より一般的なリソソームの分解活性調節メカニズムを理解する上でも重要であると考えられる。

■2.6.4 肥大したオートリソソームは Storage vacuole として機能する

White prepupa 期の脂肪体で見られるオートリソソームの肥大化は、リソソーム関連遺伝子の発現を制御するマスター転写因子である *Mitf* を脂肪体特異的に過剰発現させることにより、抑制することができた (図 12)。また、脂肪体特異的に *Mitf* を過剰発現した個体は、蛹期に致死となった (図 13)。これらの結果は、幼虫最終期から蛹期にかけて、オートリソソームの分解活性を抑制することが、個体の生存にポジティブに働くことを示している。そ

こで、私は蛹化初期 (white prepupa) に見られる肥大したオートリソソームは、摂食からの栄養補給が長時間絶たれる変態期のための栄養源を貯蔵する Storage vacuole として働いていると予想する。Butterworth らの報告によると、脂肪体の肥大したオートリソソームの数は、蛹期に徐々に減少することが示されている (Butterworth et al., 1988)。これは、Storage vacuole に貯蔵された栄養源が蛹期に使用されているという考えと一致する。また、変態期のアミノ酸プールである Larval Storage Protein (LSP) は、幼虫期に脂肪体から体液中に分泌されるが、蛹期の直前になると LSP は脂肪体に再吸収され貯蔵される (Haunerland, 1996)。図 11C の結果から、オートリソソームの肥大化には主にエンドサイトーシスが寄与していたことから、LSP が white prepupa 期の肥大したオートリソソームに貯蔵されていると考えられる。これは、肥大したオートリソソームが栄養源の貯蔵に重要であることを強く示唆する。

Storage vacuole を形成する利点は、栄養レベルが高いうちに、オートファジーや、エンドサイトーシスによって Storage vacuole として栄養源を確保し、栄養供給が断たれる蛹期に分解・利用していると考えられる。図 6C に示したように、GFP と mCherry 双方が陽性の肥大したオートリソソームは、late 3IL から形成されるため、Storage vacuole への栄養の貯蔵は、蛹化前の最後の摂食の期間である late 3IL 頃から始まっていると考えられる。また、脂肪体の細胞質には貯蔵糖であるグリコーゲンが存在するが、グリコーゲンは飢餓条件下ではわずか 4 時間で細胞質中の分解酵素によってほぼ完全に分解されてしまう (Yamada et al., 2018)。したがって、Storage vacuole はオートリソソーム内部にグリコーゲンを隔離することにより、4 日以上もかかる変態期に糖が枯渇しないようにする機能しているかもしれない。

Storage vacuole は、変態ホルモン Ecdysone を介した転写調節を介した何らかのメカニズムにより、オートリソソームの分解活性を抑制することで形成されていると考えられる。今後、Ecdysone を介した転写調節の下流に位置するどのような遺伝子の発現調節が Storage vacuole の形成に重要なのか、Mitf の関与も含めて、検討していく必要がある。

第四章 総合討論

4.1 本研究の総括

本研究では、ショウジョウバエの脂肪体と筋細胞において、変態ホルモン Ecdysone により誘導されるオートファジーの機能を解析した。幼虫終期の脂肪体では、オートファジーの誘導と同時にオートリソソームの分解活性が抑制される。その結果形成される肥大したオートリソソームは栄養源の貯蔵に働いていると考えられる。一方、変態期の筋細胞では、オートファジーによるオルガネラの分解が、筋細胞の構造維持や代謝系の切り替えに重要であることが示された。

4.2 筋細胞と脂肪体で分解の亢進と抑制の違いが生まれる要因

脂肪体と筋細胞では、どちらも Ecdysone によってオートファジーが誘導される。しかしながら、筋細胞ではオートファジーによる分解が重要である一方で、脂肪体ではオートファジーの誘導と同時に分解が抑制されていた。この違いが生まれる原因は、脂肪体と筋細胞では、同じ Ecdysone の刺激を受けても、異なる転写応答が起きているためであると考えられる。しかし、その詳細はいまだ不明である。本研究で実施した脂肪体と筋細胞の RNA-seq の結果は、変態ホルモンの刺激がどのように分解の亢進と抑制につながるのかを理解する際の手掛かりになるだろう。

4.3 今後の展望

脂肪体で見られたオートファジーの誘導と同時に分解が抑制されるという現象は、他に例がない。オートファジーの誘導などにより分解の需要が増えた際に、オートリソソームの分解活性が上昇することは示されてきたが、活性の低下には積極的な意義は見出されてこなかった。本研究は、私の知る限り、オートリソソームの活性抑制に積極的な意味を見出した初めての報告である。今後、Ecdysone によりオートリソソームの分解活性が抑制されるメカニズムを明らかにすることができれば、リソソームの活性制御とその重要性についても新たな知見を提供できると期待される。

また、ショウジョウバエでは、変態ホルモン Ecdysone によって様々な組織でオートファジーが誘導されるが、その全容はまだ明らかにされていない。本研究でも、Ecdysone による

オートファジーの誘導メカニズムの解明を目指したが、明らかにすることはできなかった。Ecdysone の機能は、核内受容体 EcR を介した転写調節であることを考えると、ホルモンによるオートファジー誘導の引き金は、何らかの遺伝子発現誘導であると思われる。オートファジーの誘導には、Atg1 複合体が脱リン酸化され集積することが重要である。従って、Atg1 複合体の脱リン酸化の促進、もしくは Atg1 複合体を強制的に集積させる機能を持つ遺伝子が存在すれば、その発現誘導によりオートファジーを誘導できると予想される。今後は、そのような機能を持つ遺伝子の同定が重要なステップであると考えられる。本研究では、筋細胞リモデリングの研究で行った RNA-seq から、*Atg* 遺伝子などのオートファジーに関わる遺伝子群が、特徴的な発現変動を示していることを明らかにした (図 19C)。これらと似た発現パターンを示す遺伝子群は約 500 存在する。この 500 程度の遺伝子群をノックダウンスクリーニングに供することにより、変態ホルモンとオートファジー誘導をつなぐ重要な遺伝子を同定できると期待される。

第五章 材料と方法

5.1 脂肪体に関連した実験の材料と方法

ショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエは、室温（およそ 22°C）において、通常の餌（乾燥酵母、グルコース、コーンミールを含む）を与えて飼育した。Chloroquine を給餌した実験では、3 mg/mL の Chloroquine を含む餌を用いた。それらの餌を用いて、研究室で飼育しているショウジョウバエを交配して生まれた F1 世代を飼育した。F1 世代のショウジョウバエを顕微鏡観察や、その他の実験に用いた。それぞれの実験に用いた F1 世代のハエの遺伝子型と飼育温度を表 1 に記した。

トランスジェニックショウジョウバエの作出

プラスミドの作成には通常の分子生物学実験の手法を用いた。PCR による目的の配列の増幅には、KOD One (TOYOBO)を用いた。GAL4-UAS システムを用いて、Franken-GFP-mCh を発現させるコンストラクトの作成は下記のように行った。東京工業大学木村宏博士から分与された pCMV-15F11- HA-mEGFP (Zhao et al., 2019) に対して、プライマー(5'-ATAGGGAA-TTGGGAACACCATGGCCGAGGTGAAGCTGG-3', 5'-GCATG-GACGAGCTGTACAAGGGTGGACCG-3')を用いて PCR を行い、Franken-GFP の断片を増幅した。また、プライマー(5'-ACAAGGGTGGACCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3' and 5'-ATGGACGAGCTGTACAAGTGACCGCGGCTCGAGGGT-3')を用いて mCherry の断片を増幅した。これらの Franken-GFP 断片と mCherry 断片を、Gibson assembly を用いて、EcoRI と NotI で切断した pUAS-attB ベクターに組み込み、pUAS-attB-Franken-GFP-mCherry ベクターを作成した。このベクターを Wellgenetics に送付し、ショウジョウバエの受精卵にインジェクションすることで、PhiC31 インテグラーゼによってショウジョウバエのゲノム上の attP40 の位置にベクターを挿入した。インジェクションによって得られたヘテロの個体をさらに交配し、目的遺伝子をホモに持つ個体を得た。

幼虫の発生ステージ分け

脂肪体の解析では、交配した親世代を室温（22℃）にて産卵させ、産卵を開始した時刻を 0 日とした。次に、孵化した幼虫を 25℃ で 2 日間飼育した。その幼虫を 10 匹ずつに分け、新しいバイアルに移し、さらに 25℃ で 1 日飼育した。この操作によって得られた幼虫を early 3IL と定義した。また、そこからさらに 25℃ で 1 日飼育した幼虫を late 3IL とした。一方、White prepupa (WP) は、幼虫が餌からバイアル側面に上がり、蛹の形に変化した時点の白い前蛹を示す。

富栄養条件と飢餓条件

上記の方法でステージ分けを行った幼虫を、通常の餌で 25℃ にて 4 時間飼育したものを富栄養条件とした。一方、ステージ分けした幼虫を、20%(m/v)スクロース溶液の上に浮かせて 25℃ にて 4 時間飼育したものを飢餓条件とした。

脂肪体の顕微鏡観察

実体顕微鏡の元でピンセットと精密ハサミを用いて、個体を解剖し、脂肪体の 1 つの房を回収した。その脂肪体を、24x40 mm カバーガラス上に滴下した 28 μ L の PBS の中に静置し、上から 18x18 mm カバーガラスで軽く押さえつけた。このとき、少量のグリース (MOLYKOTE) をカバーガラスの間に挟むことで脂肪体が潰れるのを防いだ。作成したサンプルは、共焦点顕微鏡 (FV3000)；対物レンズ 60 $\times$ silicone/1.30 NA UPlanSApo (Olympus) を用いて観察した。各実験について、共焦点顕微鏡の詳細な設定を表 3 に記載した。

LEC の顕微鏡観察

LEC の観察では、WP をスライドガラスとカバーガラスの間にグリース (MOLYKOTE) で作った隙間に挟み、共焦点顕微鏡 (FV3000)；対物レンズ 60 $\times$ silicone/1.30 NA UPlanSApo (Olympus) を用いて観察した。

リソソーム染色試薬による脂肪体の染色

ステージ分けした幼虫を PBS 中で解剖し、脂肪体の 1 つの房を回収した。回収した脂肪体を、Lysotracker Red (1:10,000 in PBS)、Lysotracker Deep Red (1:1000 in PBS)、Lysosensor Green (1:2000 in PBS)、Magic Red (1:250 in PBS) 溶液にて、室温で 2 分間染色した。染色にムラが生じやすいため、Lysosensor Green による染色では、ピンセットを用いて脂肪体を Lysosensor Green 溶液の中で絶えず動かし続けた。

脂肪体の画像の定量

脂肪体から得られた画像の定量では、5 個体から得た 5 つの脂肪体の房から、10 枚の画像を撮影し解析した。全ての解析は、ImageJ を用いて行い、解析の際には画像を 81.59 x 81.59 に切り取った画像を用いた。図 8B, C、図 12B, C の Lysosensor の蛍光強度の定量では、Lamp1-3xmCh 陽性の構造物を二値化によって抽出しマスクを作成し、Lamp1-3xmCh 陽性の構造物それぞれの Lysosensor の蛍光強度を計算した後、その平均値を算出した。図 9B, C、図 10E, F の Magic Red の蛍光強度の定量では、Magic Red 陽性の構造物を二値化によって抽出し、それぞれの構造物の蛍光強度を算出した後、全体の平均値を計算した。この論文を通して、リソソームの大きさを定量した際には、early 3IL の場合は Lysotracker や Lamp1-3xmCherry 陽性の構造物を二値化によって抽出した。一方で、white prepupa 期における肥大したリソソームは一つの構造物として抽出することが困難であったため、手動でリソソームの輪郭を囲むことでリソソームの大きさを定量した。

脂肪体の RNA-seq

ステージ分けした 5 匹の幼虫から脂肪体を回収した。回収した脂肪体は TRIzol (Thermo Fisher)を用いて溶解し、-80°C で冷凍した。その後、得られたライセートを 27 ゲージの針に 10 回通して細胞を完全に溶解した。この溶液に対し、クロロホルムを加えて水層を回収した後、イソプロパノールを用いてトータル RNA を沈殿させた。この沈殿したトータル RNA を、さらに ReliaPrep tissue RNA Miniprep System (Promega)を用いて精製した。cDNA ライブラリーはイルミナ社の TruSeq stranded mRNA library platform を用いて作成し、NovaSeq6000 によるペアエンドシーケンスを行った。その結果得られた FASTQ ファイルに対して salmon (Patro et al., 2017) を用いることで各遺伝子の発現量を定量した。定量結果の統計的な比較は、R の Bioconductor プラグインである DESeq2 (Love et al., 2014) を用いて行った。

統計

定量値の統計学的な検定には Prism8 もしくは Prism9 を用いた。2 群間の検定には、通常の t 検定を用いた。また、3 群間以上の間の検定では、Tukey's test、Sidak's test もしくは、unpaired t-test を用いた。P<0.05 を有意差ありと定義した (*P<0.05, **P<0.001, *****P<0.0001, *****P<0.0001)。

参考文献

- Allen, E. A., & Baehrecke, E. H. (2020). Autophagy in animal development. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 27, Issue 3, pp. 903–918). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0497-0>
- Al-Qusairi, L., & Laporte, J. (2011). T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. In *Skeletal Muscle* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-26>
- Ballabio, A., & Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 2, pp. 101–118). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0185-4>
- Billes, V., Kovács, T., Manzéger, A., Lőrincz, P., Szincsák, S., Regős, Á., Kulcsár, P. I., Korcsmáros, T., Lukácsovich, T., Hoffmann, G., Erdélyi, M., Mihály, J., Takács-Vellai, K., Sass, M., & Vellai, T. (2018). Developmentally regulated autophagy is required for eye formation in *Drosophila*. *Autophagy*, 14(9), 1499–1519. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1454569>
- Bola, B., & Allan, V. (2009). How and why does the endoplasmic reticulum move? *Biochemical Society Transactions*, 37(5), 961–965. <https://doi.org/10.1042/BST0370961>
- Bouché, V., Espinosa, A. P., Leone, L., Sardiello, M., Ballabio, A., & Botas, J. (2016). *Drosophila* Mitf regulates the V-ATPase and the lysosomal-autophagic pathway. *Autophagy*, 12(3), 484–498. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1134081>
- Butterworth, F. M., Emerson, L., & Rascht, E. M. (1988). MATURATION AND DEGENERATION OF THE FAT BODY IN THE *DROSOPHILA* LARVA AND PUPA AS REVEALED BY MORPHOMETRIC ANALYSIS. In *TISSUE & CELL* (Vol. 20, Issue 2).
- Chang, Y. Y., & Neufeld, T. P. (2010). Autophagy takes flight in *Drosophila*. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 7, pp. 1342–1349). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.006>
- Collins, M. P., & Forgac, M. (2020). Regulation and function of V-ATPases in physiology and disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1862, Issue 12). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183341>
- de Araujo, M. E. G., Liebscher, G., Hess, M. W., & Huber, L. A. (2020). Lysosomal size matters. In

- Traffic* (Vol. 21, Issue 1, pp. 60–75). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/tra.12714>
- Dermaut, B., Norga, K. K., Kania, A., Verstreken, P., Pan, H., Zhou, Y., Callaerts, P., & Bellen, H. J. (2005). Aberrant lysosomal carbohydrate storage accompanies endocytic defects and neurodegeneration in *Drosophila* benchwarmer. *Journal of Cell Biology*, 170(1), 127–139. <https://doi.org/10.1083/jcb.200412001>
- Dhanyasi, N., VijayRaghavan, K., Shilo, B. Z., & Schejter, E. D. (2021). Microtubules provide guidance cues for myofibril and sarcomere assembly and growth. *Developmental Dynamics*, 250(1), 60–73. <https://doi.org/10.1002/dvdy.227>
- Fujita, N., Huang, W., Lin, T., Groulx, J.-F., Jean, S., Nguyen, J., Kuchitsu, Y., Koyama-Honda, I., Mizushima, N., Fukuda, M., & Kiger, A. (2017). Genetic screen in *Drosophila* muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.23367.001>
- Grewal, S. S., Evans, J. R., & Edgar, B. A. (2007). *Drosophila* TIF-IA is required for ribosome synthesis and cell growth and is regulated by the TOR pathway. *Journal of Cell Biology*, 179(6), 1105–1113. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709044>
- Hashimshony, T., Senderovich, N., Avital, G., Klochendler, A., de Leeuw, Y., Anavy, L., Gennert, D., Li, S., Livak, K. J., Rozenblatt-Rosen, O., Dor, Y., Regev, A., & Yanai, I. (2016). CEL-Seq2: Sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0938-8>
- Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N., & Yanai, I. (2012). CEL-Seq: Single-Cell RNA-Seq by Multiplexed Linear Amplification. *Cell Reports*, 2(3), 666–673. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.003>
- Haunerland, N. H. (1996). Mini-Review Insect Storage Proteins: Receptors. In *Biochem. Molec. Biol* (Vol. 26, Issue 96).
- Hirose, T., Ninomiya, K., Nakagawa, S., & Yamazaki, T. (2023). A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 24, Issue 4, pp. 288–304). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00558-8>
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 151(6), 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>
- Khaminets, A., Heinrich, T., Mari, M., Grumati, P., Huebner, A. K., Akutsu, M., Liebmann, L., Stolz,

- A., Nietzsche, S., Koch, N., Mauthe, M., Katona, I., Qualmann, B., Weis, J., Reggiori, F., Kurth, I., Hübner, C. A., & Dikic, I. (2015). Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature*, 522(7556), 354–358. <https://doi.org/10.1038/nature14498>
- Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, 3(5), 452–460. <https://doi.org/10.4161/auto.4451>
- Komatsu, M. (2022). p62 bodies: Phase separation, NRF2 activation, and selective autophagic degradation. In *IUBMB Life* (Vol. 74, Issue 12, pp. 1200–1208). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/iub.2689>
- Liang, M., Hody, C., Yammine, V., Soin, R., Sun, Y., Lin, X., Tian, X., Meurs, R., Perdrau, C., Delacourt, N., Oumalis, M., Andris, F., Conrard, L., Kruys, V., & Gueydan, C. (2023). eIF4EHP promotes Ldh mRNA translation in and fruit fly adaptation to hypoxia. *EMBO Reports*, 24(7). <https://doi.org/10.15252/embr.202256460>
- Lőrincz, P., Mauvezin, C., & Juhász, G. (2017). Exploring autophagy in *Drosophila*. In *Cells* (Vol. 6, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells6030022>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Machado, S. A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., da Silva, D. S. S., Farias, G. R., de Oliveira Santos, I., Baptista, L. B., & Magalhães, K. G. (2022). Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. In *Nutrition and Metabolism* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00694-0>
- Mauvezin, C., Ayala, C., Braden, C. R., Kim, J., & Neufeld, T. P. (2014). Assays to monitor autophagy in *Drosophila*. *Methods*, 68(1), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.03.014>
- Mindell, J. A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annual Review of Physiology*, 74, 69–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142317>
- Mochida, K., Oikawa, Y., Kimura, Y., Kirisako, H., Hirano, H., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2015). Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature*, 522(7556), 359–362. <https://doi.org/10.1038/nature14506>
- Montagna, A., Vajente, N., Pendin, D., & Daga, A. (2020). In vivo Analysis of CRISPR/Cas9 Induced Atlastin Pathological Mutations in *Drosophila*. *Frontiers in Neuroscience*, 14.

- <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.547746>
- Morishita, H., Kanda, Y., Kaizuka, T., Chino, H., Nakao, K., Miki, Y., Taketomi, Y., Guan, J. L., Murakami, M., Aiba, A., & Mizushima, N. (2020). Autophagy Is Required for Maturation of Surfactant-Containing Lamellar Bodies in the Lung and Swim Bladder. *Cell Reports*, 33(10). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108477>
- Morishita, H., & Mizushima, N. (2019). Diverse Cellular Roles of Autophagy Autophagosome: a double-membrane structure enclosing cytoplasmic materials. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 35, 453–475. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818>
- Murakawa, T., Kiger, A. A., Sakamaki, Y., Fukuda, M., & Fujita, N. (2020). An autophagy-dependent tubular lysosomal network synchronizes degradative activity required for muscle remodeling. *Journal of Cell Science*, 133(21). <https://doi.org/10.1242/jcs.248336>
- Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 8, pp. 439–458). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0241-0>
- Nezis, I. P., Simonsen, A., Sagona, A. P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T. E., Stenmark, H., & Brech, A. (2008). Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *Journal of Cell Biology*, 180(6), 1065–1071. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711108>
- Nishimura, T. (2020). Feedforward Regulation of Glucose Metabolism by Steroid Hormones Drives a Developmental Transition in *Drosophila*. *Current Biology*, 30(18), 3624-3632.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.043>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Pimm, M. L., & Henty-Ridilla, J. L. (2021). New twists in actin-microtubule interactions. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 32, Issue 3, pp. 211–217). American Society for Cell Biology. <https://doi.org/10.1091/MBC.E19-09-0491>
- Quinn, L., Lin, J., Cranna, N., Amanda Lee, J. E., Mitchell, N., & H, R. (2012). Steroid Hormones in *Drosophila*: How Ecdysone Coordinates Developmental Signalling with Cell Growth and Division. In *Steroids - Basic Science*. InTech. <https://doi.org/10.5772/27927>
- Rigon, L., De Filippis, C., Napoli, B., Tomanin, R., & Orso, G. (2021). Exploiting the potential of

- drosophila models in lysosomal storage disorders: Pathological mechanisms and drug discovery. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030268>
- Rusten, T. E., Lindmo, K., Juhász, G., Sass, M., Seglen, P. O., Brech, A., & Stenmark, H. (2004). Programmed Autophagy in the Drosophila Fat Body Is Induced by Ecdysone through Regulation of the PI3K Pathway. In *Developmental Cell* (Vol. 7). <http://www.developmentalcell.com/>
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Alessandro Gennarino, V., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., S. Polishchuk, R., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., & Ballabio, A. (2009). A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science*, 24(325). <https://doi.org/10.1126/science.1098641>
- Sartori, R., Romanello, V., & Sandri, M. (2021). Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. In *Nature Communications* (Vol. 12, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20123-1>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. In *Cell* (Vol. 168, Issue 6, pp. 960–976). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Scott, R. C., Schuldiner, O., & Neufeld, T. P. (2004). Role and Regulation of Starvation-Induced Autophagy in the Drosophila Fat Body internal reserve of nutrients. In this catabolic process, cytoplasm is engulfed within double-membrane vesicles known as autophagosomes, which subsequently fuse. In *Developmental Cell* (Vol. 7). <http://www.developmentalcell.com/>
- Semenza, G. L. (2014). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 47–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104720>
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W. A., Palazzo, A. F., Kozlov, M. M., & Rapoport, T. A. (2010). Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell*, 143(5), 774–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.007>
- Sillence, D. J. (2013). Glucosylceramide modulates endolysosomal pH in Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 109(2), 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.03.015>
- Takáts, S., Nagy, P., Varga, Á., Pircs, K., Kárpáti, M., Varga, K., Kovács, A. L., Hegedus, K., & Juhász, G. (2013). Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila. *Journal of Cell Biology*, 201(4), 531–539. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211160>
- Tian, Y., Li, Z., Hu, W., Ren, H., Tian, E., Zhao, Y., Lu, Q., Huang, X., Yang, P., Li, X., Wang, X.,

- Kovács, A. L., Yu, L., & Zhang, H. (2010). *C. elegans* Screen Identifies Autophagy Genes Specific to Multicellular Organisms. *Cell*, *141*(6), 1042–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.034>
- Tikhomirova, M. S., Kadosh, A., Saukko-Paavola, A. J., Shemesh, T., & Klemm, R. W. (2022). A role for endoplasmic reticulum dynamics in the cellular distribution of microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *119*(15). <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Tsuboyama, K., Koyama-Honda, I., Sakamaki, Y., Koike, M., Morishita, H., & Mizushima, N. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science*, *354*(6315), 1036–1041. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7680>
- Wang, X., Yu, L., & Wu, A. R. (2021). The effect of methanol fixation on single-cell RNA sequencing data. *BMC Genomics*, *22*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07744-6>
- Xiong, J., Luu, T. T. T., Venkatachalam, K., Du, G., & Zhu, M. X. (2023). Glutamine Produces Ammonium to Tune Lysosomal pH and Regulate Lysosomal Function. *Cells*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/cells12010080>
- Yamada, T., Habara, O., Kubo, H., & Nishimura, T. (2018). Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in drosophila. *Development (Cambridge)*, *145*(6). <https://doi.org/10.1242/dev.158865>
- Zhang, J., Schulze, K. L., Robin Hiesinger, P., Suyama, K., Wang, S., Fish, M., Acar, M., Hoskins, R. A., Bellen, H. J., & Scott, M. P. (2007). Thirty-one flavors of *Drosophila* Rab proteins. *Genetics*, *176*(2), 1307–1322. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066761>
- Zhang, X., Li, S., & Liu, S. (2022). Juvenile Hormone Studies in *Drosophila melanogaster*. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.785320>
- Zhang, Y., & Xi, Y. (2015). Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Tissue Science & Engineering*, *06*(01). <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000141>
- Zhang, Y., Yan, L., Zhou, Z., Yang, P., Tian, E., Zhang, K., Zhao, Y., Li, Z., Song, B., Han, J., Miao, L., & Zhang, H. (2009). SEPA-I Mediates the Specific Recognition and Degradation of P Granule Components by Autophagy in *C. elegans*. *Cell*, *136*(2), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.022>
- Zhao, N., Kamijo, K., Fox, P. D., Oda, H., Morisaki, T., Sato, Y., Kimura, H., & Stasevich, T. J. (2019). A genetically encoded probe for imaging nascent and mature HA-tagged proteins in vivo. *Nature*

Communications, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10846-1>

Zhou, W., Wang, H., Yang, Y., Chen, Z. S., Zou, C., & Zhang, J. (2020). Chloroquine against malaria, cancers and viral diseases. In *Drug Discovery Today* (Vol. 25, Issue 11, pp. 2012–2022). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.09.010>

Zirin, J., Nieuwenhuis, J., & Perrimon, N. (2013). Role of Autophagy in Glycogen Breakdown and Its Relevance to Chloroquine Myopathy. *PLoS Biology*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001708>

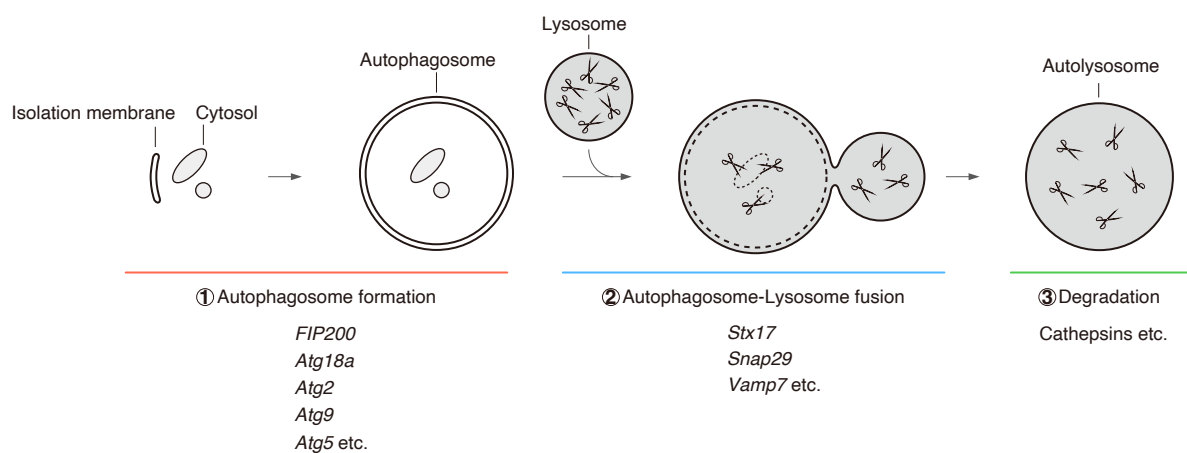


図1 オートファジーの模式図

オートファジーは主に3つのステップから成る。①オートファゴソーム形成 (Autophagosome formation); 隔離膜 (Isolation membrane) が伸張し、細胞質成分がオートファゴソーム内部に包み込まれる。閉じた二重膜構造体をオートファゴソームと呼ぶ。②オートファゴソームとリソソームの融合 (Autophagosome-Lysosome fusion); オートファゴソームとリソソームの融合は、Stx17-Snap29-Vamp7 からの SNARE 複合体によって促進される。③分解 (Degradation); オートファゴソームとリソソームが融合したハイブリッドオルガネラをオートリソソーム (Autolysosome) と呼ぶ。リソソーム由来の酸性加水分解酵素によってオートファゴソームの内膜と内容物が分解される。本研究に関わる遺伝子を各ステップの下に記した。

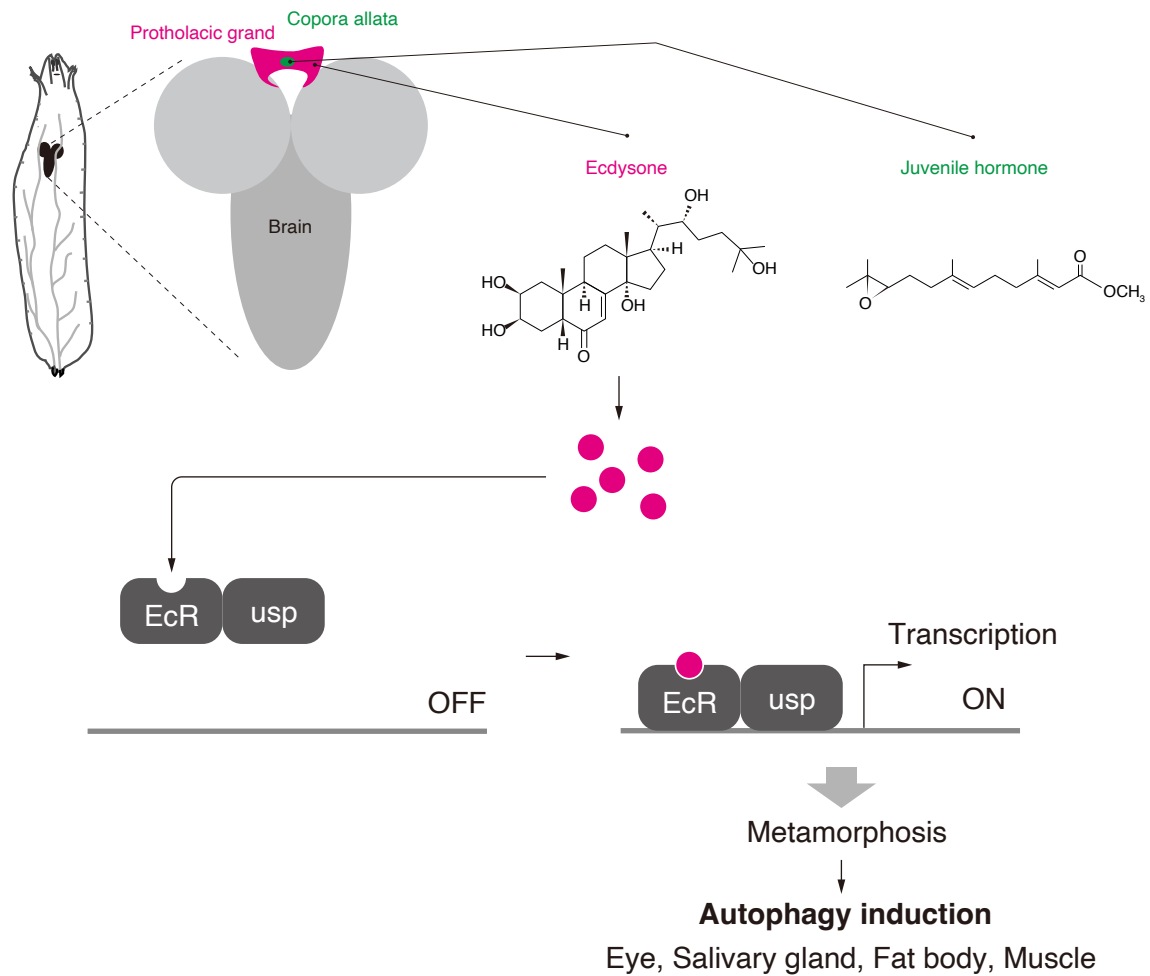


図2 変態ホルモンによるオートファジーの誘導

ショウジョウバエの脳にある2種類のホルモン産生細胞が変態に関わっている。Protholacic gland (マゼンタ) が変態ホルモン Ecdysone を、Copora allata (緑) が幼若ホルモン Juvenile hormone をそれぞれ分泌する。Ecdysone は、核内受容体 Ecdysone receptor (EcR) に受容される。EcR は ultraspiracle (usp) と複合体を形成する転写因子である。Ecdysone を受容した EcR は転写を調節し、発生を誘導する。この転写の調節によって、ショウジョウバエでは眼 (eye)、唾液腺 (Salivary gland)、脂肪体 (fat body)、筋細胞 (Muscle) でオートファジーが誘導されることが考えられている。

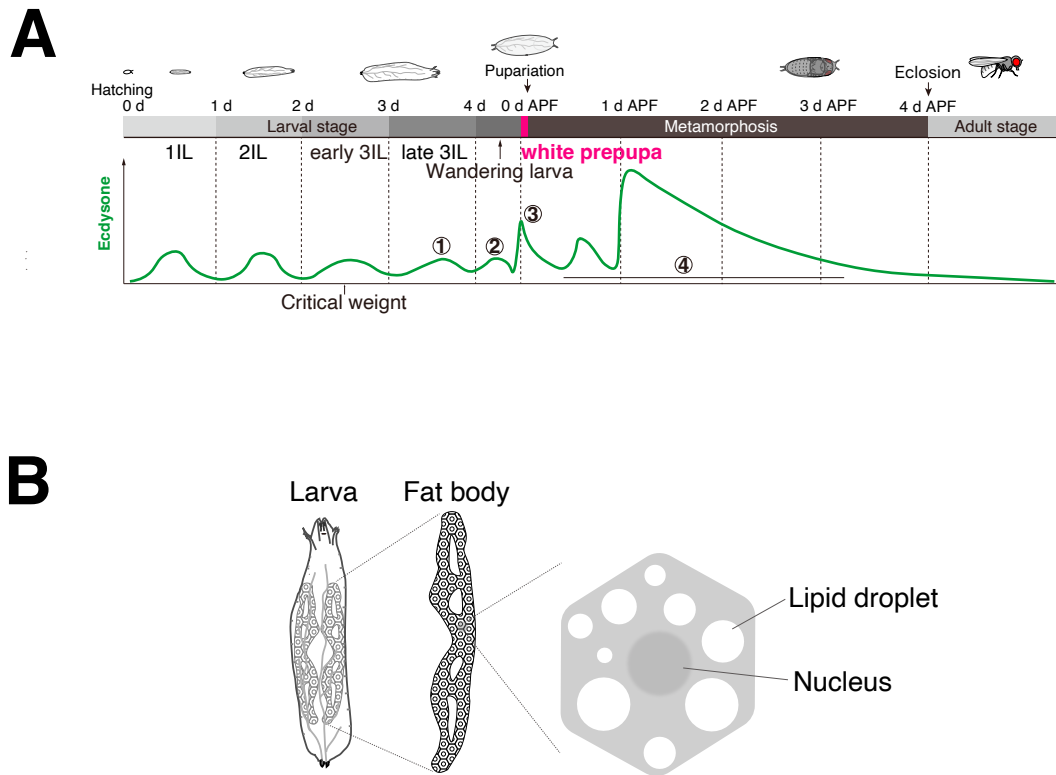
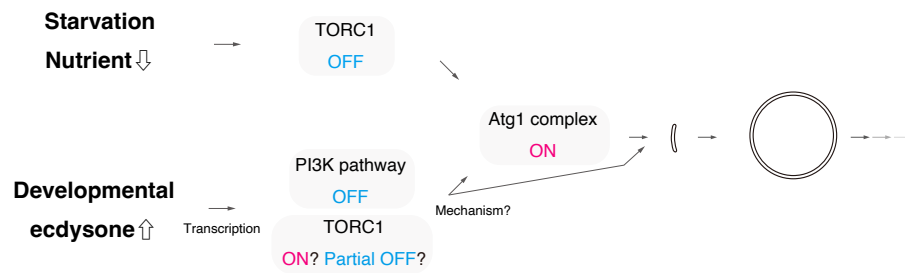


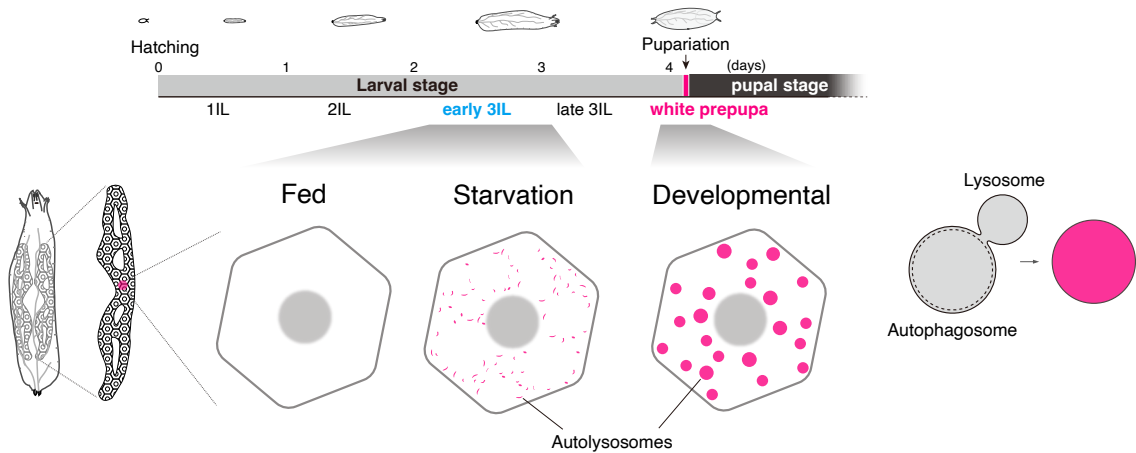
図3 幼虫の発生と脂肪体の形態

(A) 発生に伴う体液中の Ecdysone 濃度の変化。①から④までの Ecdysone の濃度パルスが変態に関わっている。(B) 脂肪体の形態。大きな房状の形態を持つ脂肪体は幼虫体積の大部分を占めている。脂肪体を構成する細胞は、細胞質に巨大な脂肪滴 (Lipid droplet) をもつ。

A



B



C

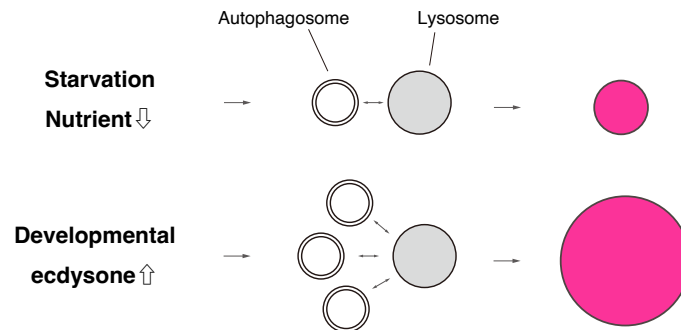


図4 ショウジョウバエ脂肪体のオートファジー

ショウジョウバエの脂肪体では、飢餓と変態ホルモンの2種類の入力によってオートファジーが誘導される。(A) 飢餓と変態ホルモンによるオートファジー誘導メカニズム。飢餓によるオートファジー誘導はTORC1複合体に依存するが、変態ホルモンによるオートファジー誘導はTORC1複合体に依存しない。(B) オートリソソームの形態に見られる違い。early 3IL期の幼虫を飢餓条件(stv)におくと、1 μm 程の比較的小さいオートリソソームが形成される。一方、white prepupa期に見られる変態ホルモン誘導性オートファジーの場合(Developmental)には、肥大したオートリソソームが見られる。(C) これまでに提唱されているホルモン誘導型オートファジーにおけるオートリソソーム肥大化のモデル。

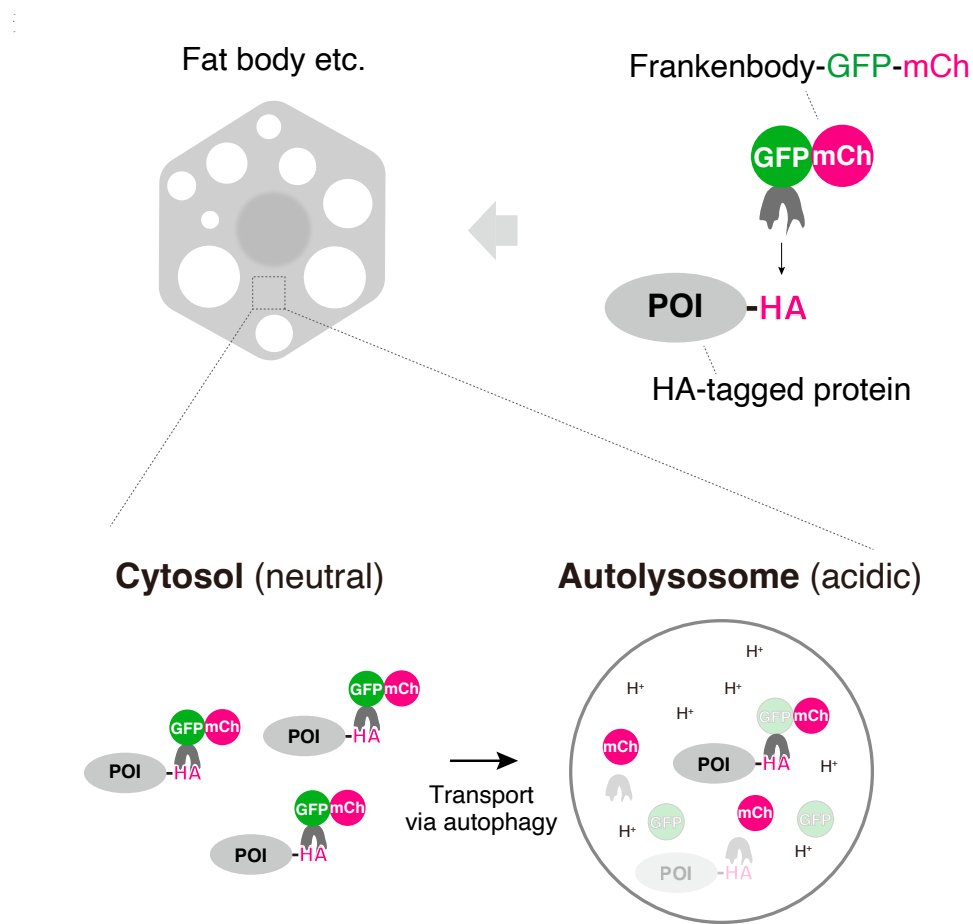


図5 Frankenbody を用いたオートファジー分解の可視化システム

HA タグを付加したタンパク質と、HA タグに対する遺伝子コード型の抗体プローブである Frankenbody に GFP と mCherry (mCh) をタンデムにつないだコンストラクト (Franken-GFP-mCh) を同時に発現させることにより、HA タグ付きタンパク質のオートファジー分解を可視化できる。HA タグ付きのタンパク質と Franken-GFP-mCh の複合体がオートリソソームに運ばれると、mCherry はオートリソソーム内部でも蛍光を発するが、GFP は消光する。

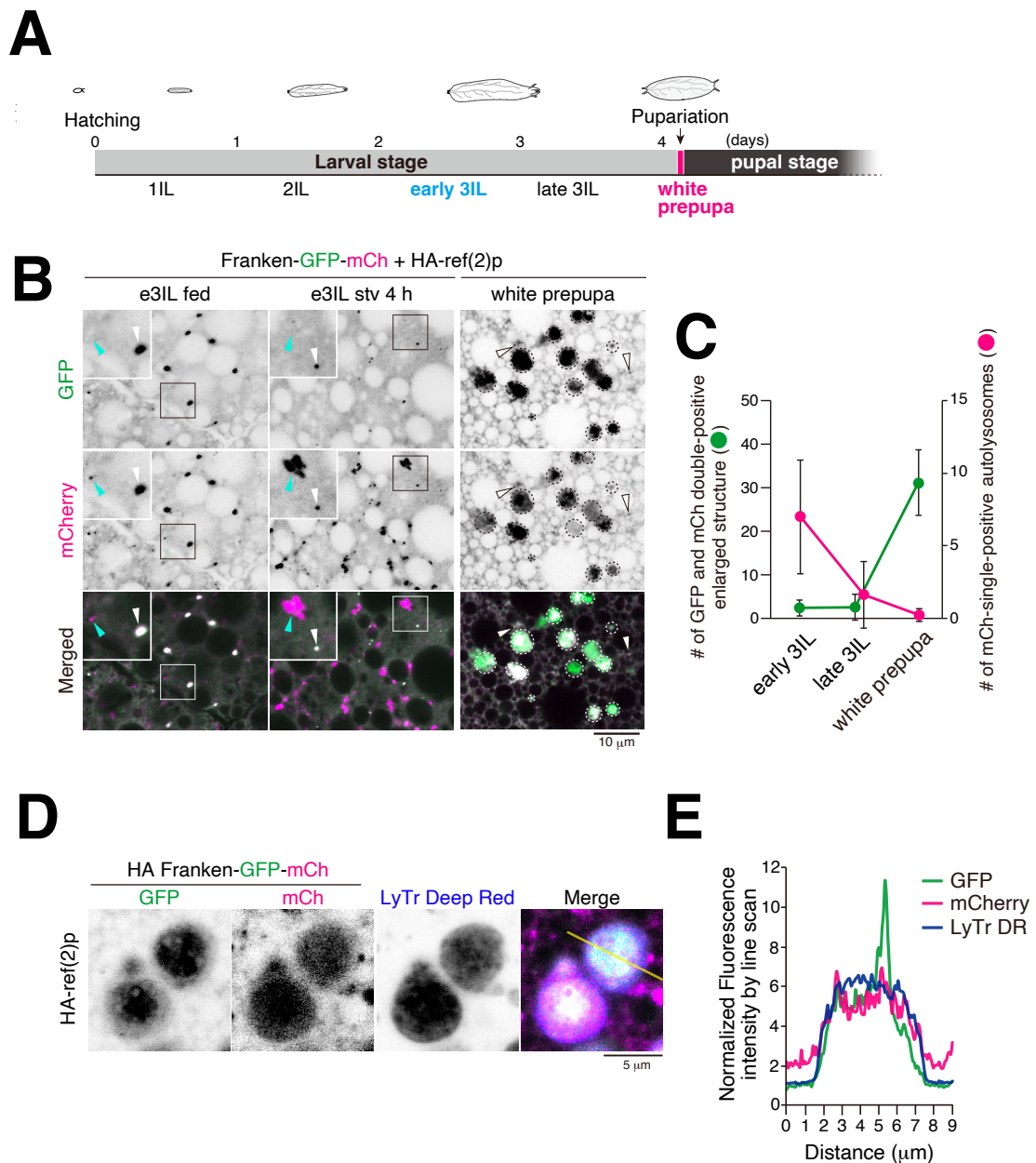
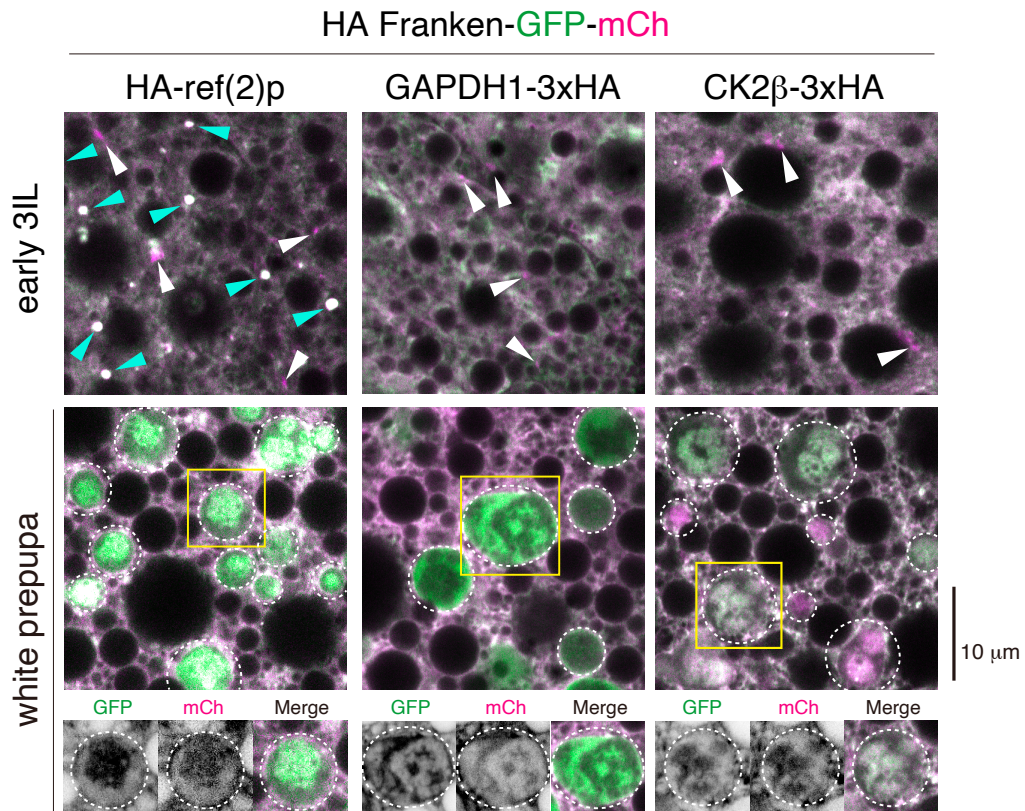


図6 飢餓誘導性とホルモン誘導性オートファジーの比較

(A) 脂肪体を観察した2つのタイムポイント。飢餓によりオートファジーを誘導する際は、early 3IL (e3IL) 期の幼虫を飢餓条件に4時間おいた。ホルモン誘導性オートファジーは、late 3IL 期から蛹期初期に見られる。よって、white prepupa 期の脂肪体を観察した。(B) Franken-GFP-mCh による HA-ref(2)p のオートファジー分解の可視化。富栄養条件 (fed) と飢餓条件 (stv 4 h) の early 3IL、もしくは white prepupa の脂肪体における Franken-GFP-mCh の蛍光を共焦点顕微鏡で観察した。青矢頭は mCh のみ陽性のオートリソソーム、白矢頭は mCh と GFP 両方陽性の ref(2)p 液滴を示す。white prepupa の画像の点線で囲った構造は、直径 5 μ m 程の GFP と mCherry 双方陽性の肥大した構造を示す。(C) mCherry のみ陽性のオートリソソーム (マゼンタ) と GFP と mCherry の双方陽性の肥大した構造 (緑) の数の発生に伴う変化。(D) GFP と mCherry 双方が陽性の肥大した構造は、リソソームの染色試薬である Lysotracker により染色される。(E) パネル D のマージ画像上の黄線における蛍光強度のラインプロット。

A



B

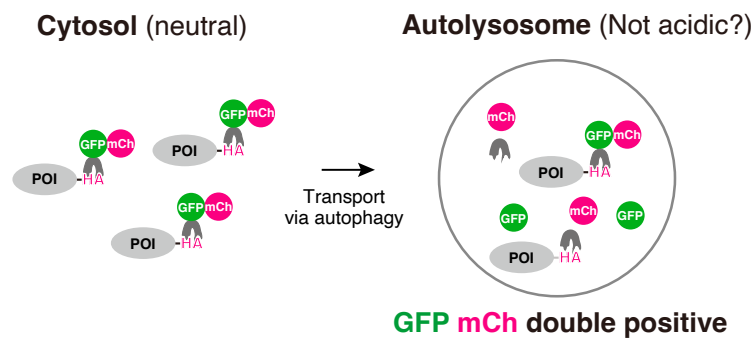


図7 ホルモン誘導性オートファジーではオートリソソーム内の GFP が消光しない

(A) HA タグ付きタンパク質を HA-ref(2)p 以外の GAPDH-3HA や、CK2b-3xHA に変えても、early 3IL 期では mCherry のみ陽性のオートリソソームが観察される。一方、white prepupa 期脂肪体のオートリソソームでは GFP が消光しない。(B) オートリソソームに運ばれた GFP が消光しないということは、オートリソソーム内の pH が上昇していることを示唆する。

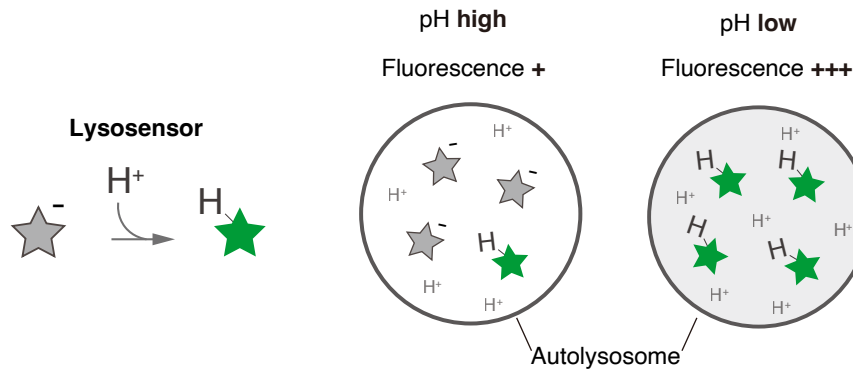
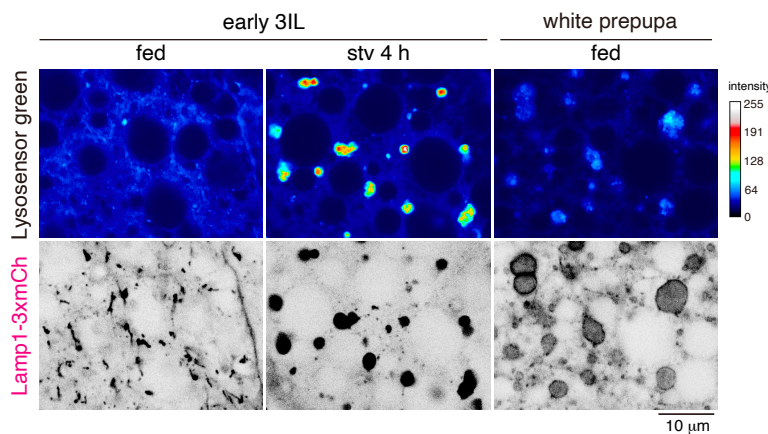
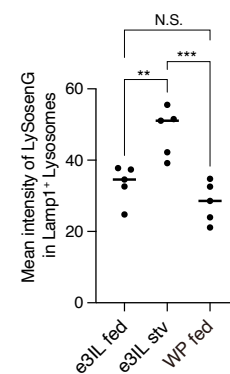
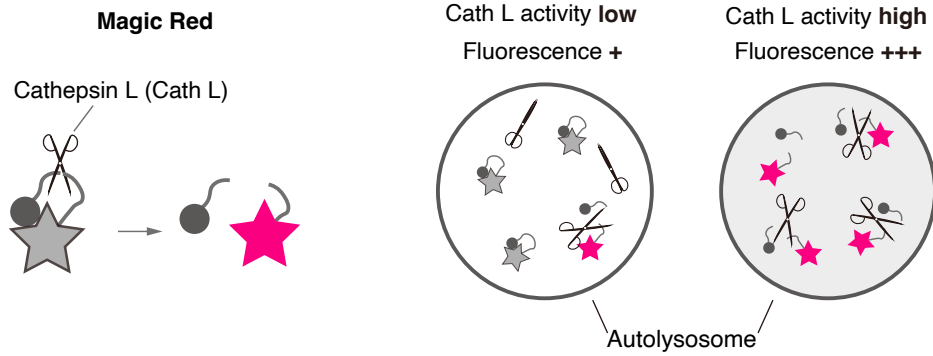
A**B****C**

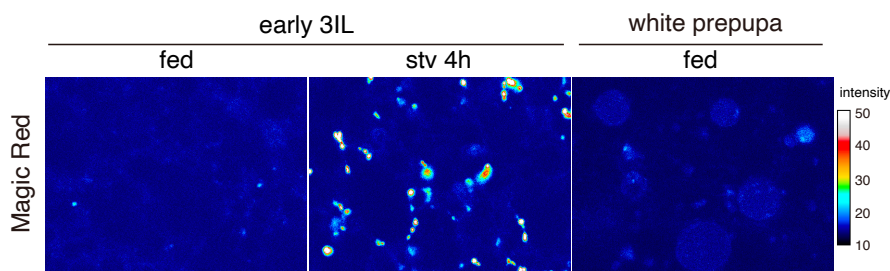
図 8 white prepupa 脂肪体のオートリソソームは高い pH を持つ

(A) Lysosensor green が pH に伴い蛍光を発する仕組みの模式図。Lysosensor green はリソソームの内腔においてプロトン化される。Lysosensor green のプロトン化状態はリソソームの pH と比例する。リソソームの pH が高い場合、少数の Lysosensor green 分子のみが蛍光を発する。一方、リソソームの pH が低い場合には、多くの Lysosensor green 分子が蛍光を発する。従って、リソソーム内の Lysosensor green の蛍光強度を測ることによりリソソームの pH を評価できる。(B) Lamp1-3xmCh を発現させた個体の脂肪体を Lysosensor green で染色した際の顕微鏡画像。左から、富栄養条件に置いた early 3IL (fed)、飢餓条件に 4 時間おいた early 3IL (stv 4 h)、white prepupa。(C) 各条件で Lysosensor green の蛍光強度の平均値を定量した結果。n = 5 (Tukey's test)

A



B



C

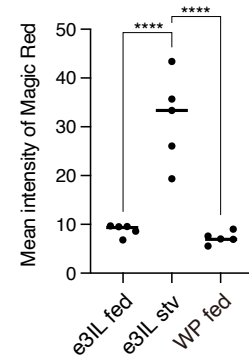


図 9 white prepupa 脂肪体のオートリソソームの分解活性は低下している

(A) Magic Red が分解活性に依存して蛍光を発する仕組み。Magic Red はリソソームプロテアーゼである Cathepsin L により切断される配列を持つ化合物であり、切断を受けると赤色の蛍光を発する。従って、リソソームの分解活性が低ければ、Magic Red の蛍光強度は低く、分解活性が高ければ Magic Red の蛍光強度は高くなる。(B) 脂肪体を Magic Red で染色した際の顕微鏡画像。左から、富栄養条件に置いた early 3IL (fed)、飢餓条件に 4 時間おいた early 3IL (stv 4 h)、white prepupa。(C) 各条件で Magic Red の蛍光強度の平均値を定量した結果。n = 5 (Sidak' s test)

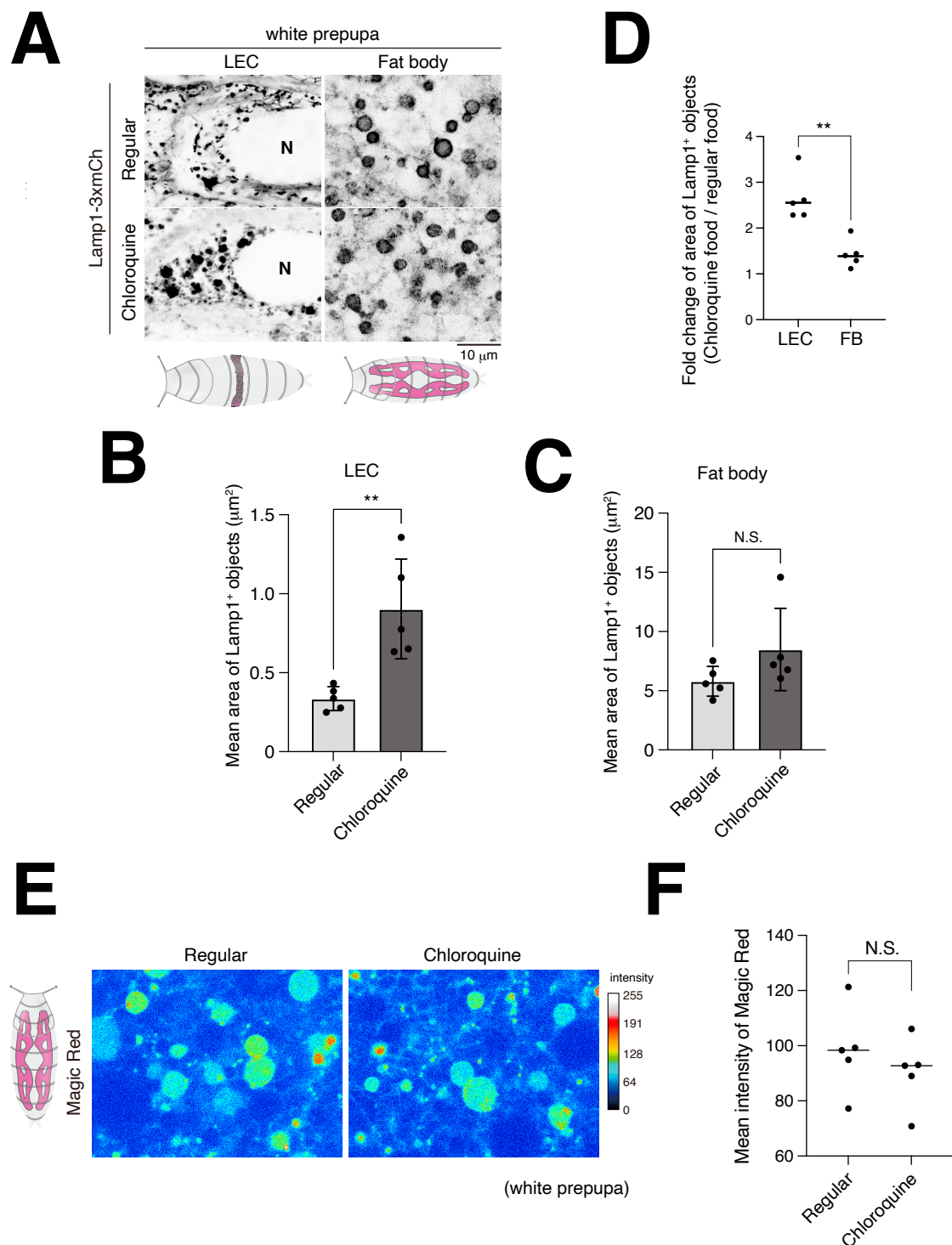


図 10 white prepupa 期の脂肪体ではオートリソソームの分解活性が低下している

(A-D) Chloroquine の投与が white prepupa の LEC と脂肪体のオートリソソームの大きさに与える影響。

(A) 共焦点顕微鏡を用いて撮影した LEC 及び脂肪体の Lamp1 陽性のリソソームの画像。(B) Chloroquine 投与による LEC の Lamp1-3xmCh 陽性オートリソソームの大きさの変化。(C) Chloroquine 投与による脂肪体の Lamp1-3xmCh 陽性オートリソソームの大きさの変化。(D) LEC と脂肪体における Chloroquine 投与によるオートリソソームの肥大化率の比較。n=5 (t-test) (E-F) Chloroquine 投与が white prepupa 脂肪体のオートリソソームの分解活性に与える影響。(E) white prepupa の脂肪体を Magic Red で染色し、共焦点顕微鏡で撮影した画像 (F) 各条件の Magic Red 陽性の構造体の蛍光強度の比較。n=5 (t-test)

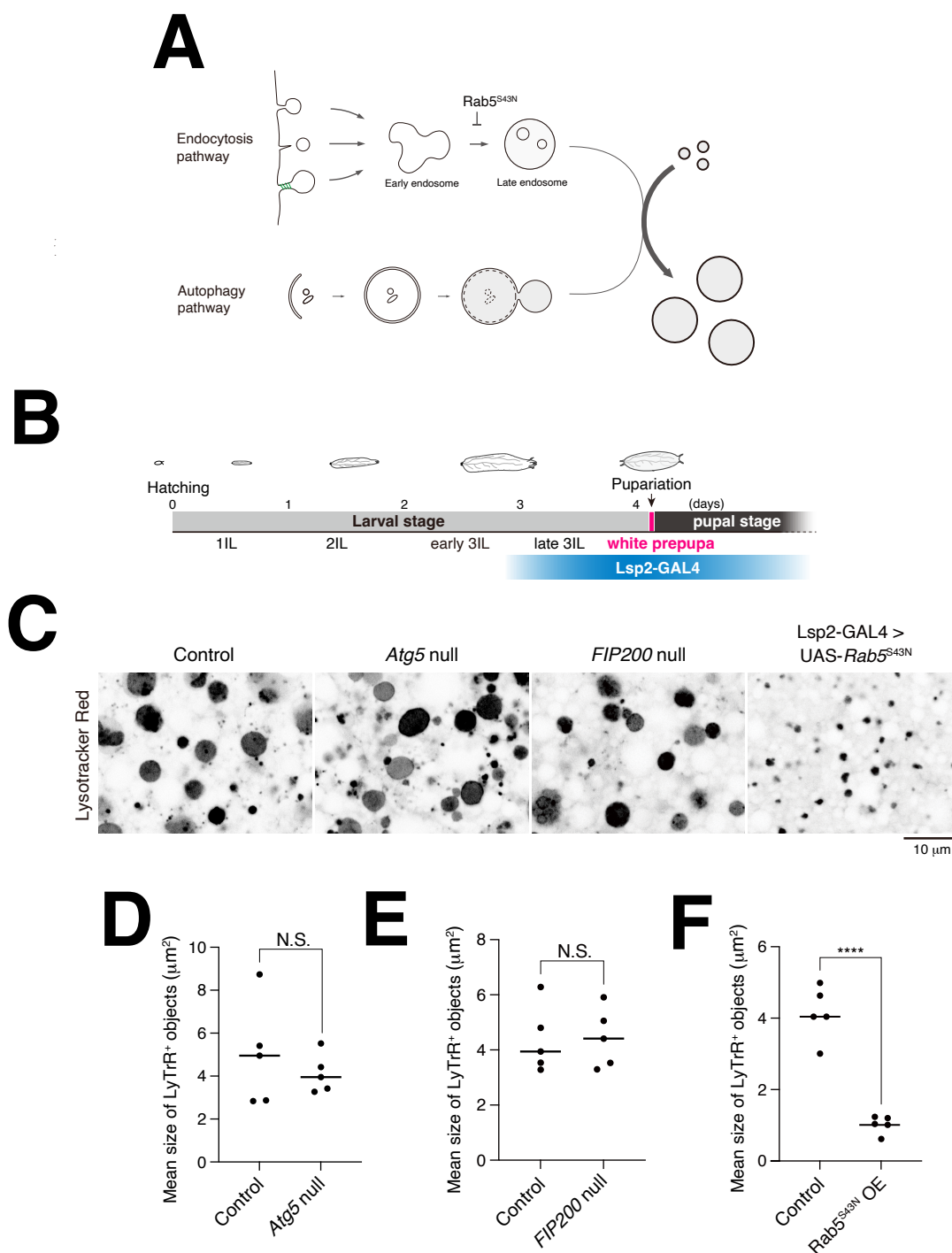


図 11 オートリソソームの肥大にはオートファジー経路よりもエンドサイトーシス経路の寄与が大きい
 (A) オートファジー経路とエンドサイトーシス経路の模式図。Rab5^{S43N} の過剰発現は、初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟を阻害する。(B) Lsp2-GAL4 ドライバーは、Late 3IL から蛹期初期にかけて脂肪体特異的に UAS の下流に位置する遺伝子の発現を誘導する。(C-F) オートファジー経路もしくは、エンドサイトーシス経路の阻害がリソソームの肥大化に与える影響。(C) white prepupa の脂肪体を Lysotracker Red で染色し、共焦点顕微鏡を用いて撮影した画像。(D) コントロールと *Atg5* null 系統の脂肪体における Lysotracker Red 陽性のリソソームのサイズの比較。n = 5 (t-test) (E) コントロールと *FIP200* null 系統の脂肪体における Lysotracker Red 陽性のリソソームのサイズの比較。n = 5 (t-test) (F) コントロールもしくは Rab5^{S43N} を Lsp2-GAL4 により脂肪体特異的に過剰発現した系統における Lysotracker Red 陽性のリソソームのサイズの比較。n = 5 (t-test)

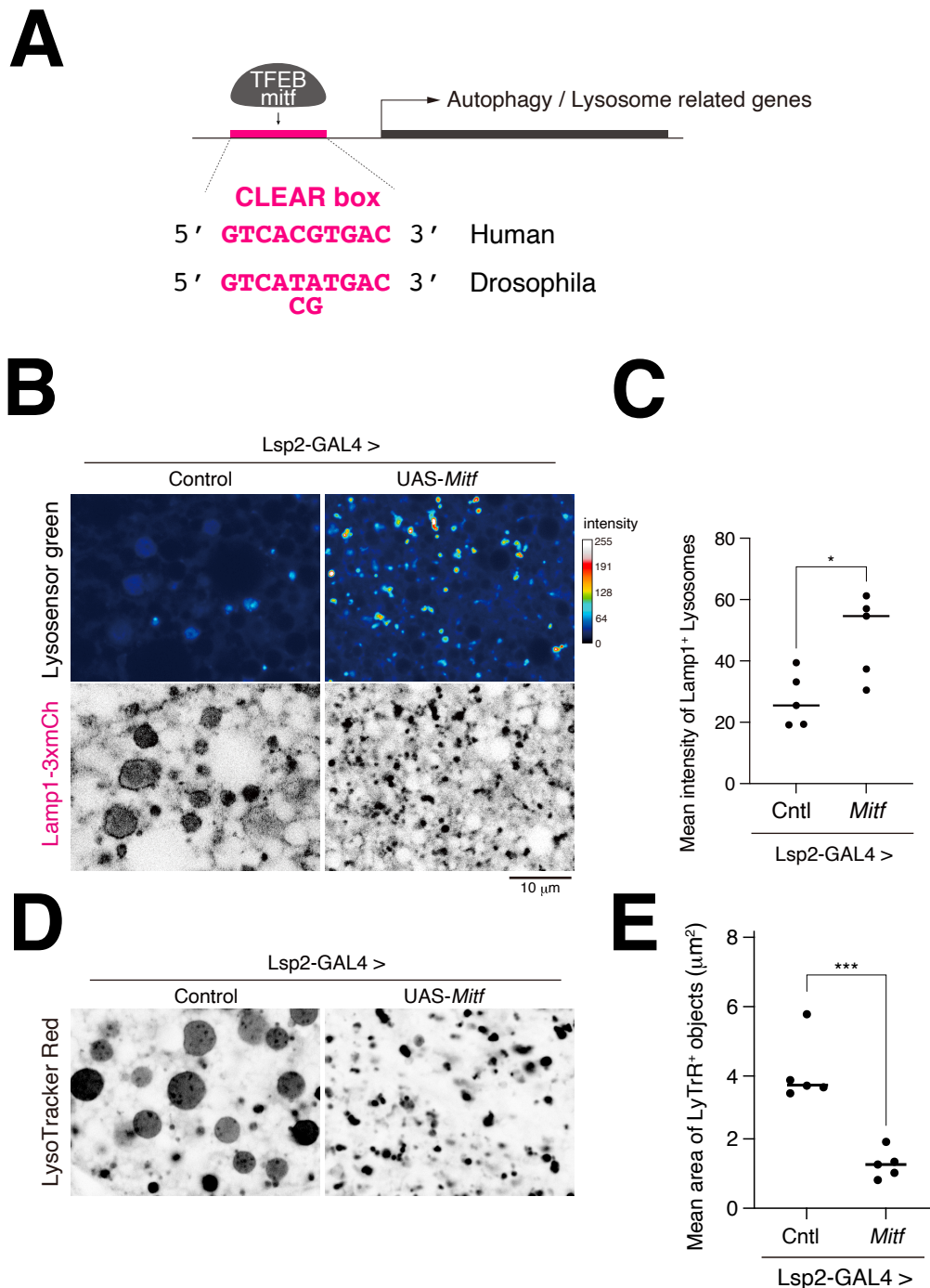
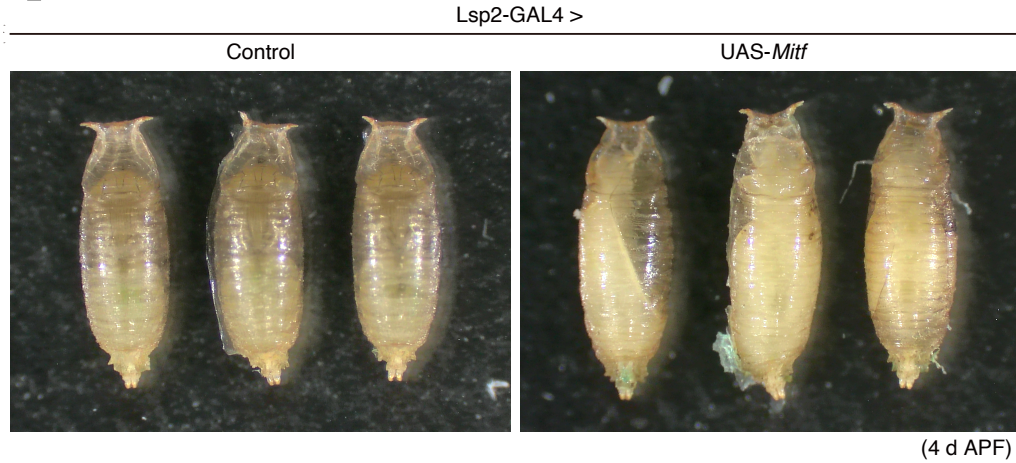


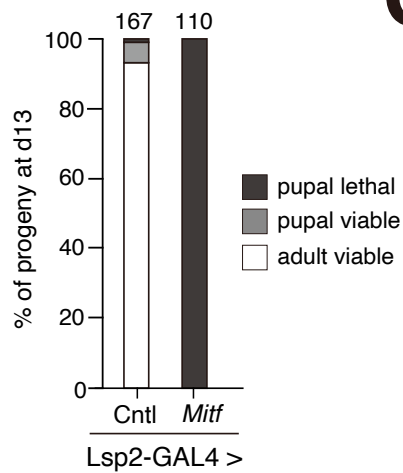
図 12 *Mitf* の過剰発現によるオートリソソームの強制的な活性化

(A) TFEB/Mitf による転写活性化の模式図。TFEB/Mitf はオートファジーやリソソームに関連する遺伝子の上流に位置する CLEAR box に結合し、その発現を誘導する。(B-C) *Mitf* の過剰発現によるオートリソソームの酸性化の促進。(B) Lamp1-3xmCh を発現する脂肪体を Lysosensor green により染色し、共焦点顕微鏡を用いて撮影した画像。(C) Lamp1 陽性のリソソームにおける Lysosensor green の蛍光強度の比較。各条件につき 5 個体から得られた脂肪体の Lysosensor green の蛍光強度の平均を計算した。(t-test) (D-E) *Mitf* の過剰発現によるオートリソソーム肥大化の抑制。(D) 各条件の white prepupa 脂肪体を LysoTracker Red 陽性のオートリソソームを、共焦点顕微鏡を用いて撮影した画像。(E) LysoTracker Red 陽性オートリソソームの面積の平均値の比較。n=5 (t-test)

A



B



C

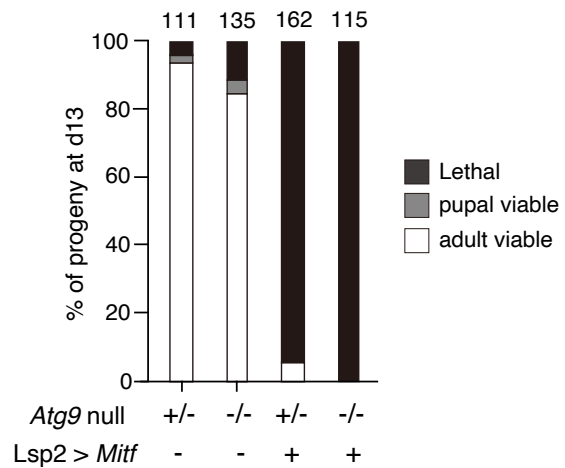


図 13 オートリソソームの強制的な活性化が蛹の生存に与える影響

(A) 4 d APF の蛹を、実体顕微鏡を用いて撮影した画像。Lsp2-GAL4 により脂肪体特異的に *Mitf* を過剰発現した個体では、蛹期に致死となった。(B) コントロールおよび脂肪体特異的に *Mitf* を過剰発現した個体の生存率の比較。棒グラフの上部には調べた個体数を記した。(C) *Atg9* 欠損と *Mitf* の過剰発現を組み合わせた際の生存率の変化。棒グラフの上部には調べた個体数を記した。

表1 脂肪体に関連した実験に使用したショウジョウバエの遺伝子型

	Panel #	Genotype	Stage	Temp (°C)
図6	6B	<i>UAS-Frankenbody:GFP:mCh, Cg-GAL4/+; +/UAS-HA:ref(2)p</i>	early 3IL, white prepupa	25°C
	6C	<i>UAS-Frankenbody:GFP:mCh, Cg-GAL4/+; +/UAS-HA:ref(2)p</i>	early 3IL, late 3IL, white prepupa	25°C
	6D	<i>UAS-Frankenbody:GFP:mCh, Cg-GAL4/+; +/UAS-HA:ref(2)p</i>	white prepupa	25°C
図7	7A	<i>UAS-Franken:GFP:mCh, Cg-GAL4/+; +/UAS-HA:ref(2)p</i>	white prepupa	25°C
		<i>UAS-Franken:GFP:mCh, Cg-GAL4/+; +/UAS-GAPDH1:3xHA</i>	white prepupa	25°C
		<i>UAS-Franken:GFP:mCh, Cg-GAL4/+; +/UAS-CK2β:3xHA</i>	white prepupa	25°C
図8	8B	<i>endo_promoter-Lamp1:3xmCherry^{1-9M}/CyO</i>	early 3IL, white prepupa	25°C
図9	9B	<i>w¹¹¹⁸; +/+; +/+</i>	early 3IL, white prepupa	25°C
図10	10A	<i>endo_promoter-Lamp1:3xmCherry1-9M/CyO</i>	white prepupa	25°C
	10E	<i>w¹¹¹⁸; +/+; +/+</i>	white prepupa	25°C
図11	11C	<i>w/Y; +/+; +/+</i>	white prepupa	25°C
		<i>Atg5^{5cc5}/Y; +/+; +/+</i>	white prepupa	25°C
		<i>FIP200^{3F5}/FIP200^{4G7}</i>	white prepupa	25°C
		<i>UAS-Rab5^{S43N}/+; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C
	11D	<i>w/Y; +/+; +/+</i>	white prepupa	25°C
		<i>Atg5^{5cc5}/Y; +/+; +/+</i>	white prepupa	25°C
	11E	<i>FIP200^{3F5}/FIP200^{4G7}</i>	white prepupa	25°C
		<i>FIP200^{4G7}/+</i>	white prepupa	25°C
	11F	<i>UAS-LacZ/+; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C
		<i>UAS-Rab5^{S43N}/+; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C
図12	12B	<i>UAS-LacZ/endo_promoter-Lamp1:3xmCherry^{1-9M}; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C
		<i>UAS-Mitf/endo_promoter-Lamp1:3xmCherry^{1-9M}; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C
	12D	<i>UAS-LacZ/+; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C
		<i>UAS-Mitf/+; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C
図13	13A, B	<i>UAS-LacZ/+; Lsp2-GAL4/+</i>	at day13	25°C
		<i>UAS-Mitf/+; Lsp2-GAL4/+</i>	at day13	25°C
	13C	<i>Atg9^{GAL4KO}/+; Lsp2-GAL4/+</i>	at day13	25°C
		<i>Atg9^{GAL4KO}/Atg9^{d51}; Lsp2-GAL4/+</i>	at day13	25°C
		<i>Atg9^{GAL4KO}/+; Lsp2-GAL4/UAS-Mitf</i>	at day13	25°C
		<i>Atg9^{GAL4KO}/Atg9^{d51}; Lsp2-GAL4/UAS-Mitf</i>	at day13	25°C
図14	14B, C	<i>UAS-LacZ/+; Lsp2-GAL4/+</i>	3IL	25°C
		<i>UAS-LacZ/+; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C
		<i>UAS-Mitf/+; Lsp2-GAL4/+</i>	white prepupa	25°C

表 3 蛍光イメージングにおける FV3000 の各種設定

		X Dimension Panel #	Y Dimension [μm/pixel]	Z Dimension [μm/Slice]	Objective Lens	Sampling Speed [μs/pixel]	Integratio n Count	Zoom	PMT Voltage [V]	Confocal Aperture [μm]	Laser Wavelength h [nm]	Laser Transmiss ivity [%]	Detection Wavelength [nm]
図6	6B	0.08	0.08	1	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	EGFP (485), mCherry (503)	239 (1 x [Airy unit])	EGFP (488), mCherry (561)	EGFP (0.5), mCherry (0.5)	EGFP (500-540), mCherry (570-670)
	6C	0.08	0.08	1	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	EGFP (485), mCherry (503)	239 (1 x [Airy unit])	EGFP (488), mCherry (561)	EGFP (0.5), mCherry (0.5)	EGFP (500-540), mCherry (570-670)
	6D	0.08	0.08	1	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	EGFP (485), mCherry (565), LytrDR (438)	251 (1 x [Airy unit])	EGFP (488), mCherry (561), LytrDR (640)	EGFP (0.5), mCherry (1.0), LytrDR (0.1)	EGFP (500-540), mCherry (570-670), LytrDR (650-750)
図7	7A	0.08	0.08	1	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	EGFP (485), mCherry (503)	239 (1 x [Airy unit])	EGFP (488), mCherry (561)	EGFP (0.5), mCherry (0.5)	EGFP (500-540), mCherry (570-670)
図8	8B	0.08	0.08	-	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	LysosenG (430), mCherry (~503)	239 (1 x [Airy unit])	LysosenG (488), mCherry (561)	LysosenG (0.7), mCherry (1.8)	LysosenG (500-540), mCherry (570-670)
図9	9B	0.08	0.08	-	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	Magic Red (426)	261 (1 x [Airy unit])	Magic Red (561)	Magic Red (0.2)	Magic Red (570-670)
図10	10A_LEC	0.08	0.08	-	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	mCherry (~495)	261 (1 x [Airy unit])	mCherry (561)	mCherry (0.5)	mCherry (570-670)
	10A_Fat_body	0.08	0.08	-	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	mCherry (~620)	261 (1 x [Airy unit])	mCherry (561)	mCherry (4.4)	mCherry (570-670)
	10E	0.08	0.08	-	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	Magic Red (426)	261 (1 x [Airy unit])	Magic Red (561)	Magic Red (0.2)	Magic Red (570-670)
図11	11C	0.08	0.08	-	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	Lysotracker R (~505)	261 (1 x [Airy unit])	Lysotracker R (561)	Lysotracker R (0.3)	Lysotracker R (570-670)
図12	12B	0.08	0.08	-	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	LysosenG (430), mCherry (~503)	239 (1 x [Airy unit])	LysosenG (488), mCherry (561)	LysosenG (0.7), mCherry (1.8)	LysosenG (500-540), mCherry (570-670)
	12D	0.08	0.08	-	UPLSAPO 60XS2	4	3	x2.6	Lysotracker R (~505)	261 (1 x [Airy unit])	Lysotracker R (561)	Lysotracker R (0.3)	Lysotracker R (570-670)
図22	22B	0.259	0.259	2	UPLSAPO 30XS	2	None	x1.6	Hoechst (~555), GFP (~389), Alexa594 (~438)	529 (2.31 x [Airy unit])	Hoechst (405), GFP (488), Alexa594 (561)	Hoechst (~0.1), GFP (~0.1), Alexa594 (~0.1)	Hoechst (430-470), GFP (500-540), Alexa594 (570-670)
	22D	0.09	0.09	0.3	UPLSAPO 60XS2	2	None	x2.3	Hoechst (500), GFP (575), Alexa594 (457)	529 (1 x [Airy unit])	Hoechst (405), GFP (488), Alexa594 (561)	Hoechst (~0.6), GFP (~0.2), Alexa594 (~0.1)	Hoechst (430-470), GFP (500-540), Alexa594 (570-670)
図23	23B	0.276	0.276	1	UPLSAPO 30XS	2	None	x1.5	EGFP (~438)	135 (0.632 x [Airy unit])	GFP (488)	GFP (~0.5)	GFP (500-600)

謝辞

この研究は、東京工業大学科学技術創成研究院藤田研究室で行われました。研究室を進めるための良い環境と、十分な設備を用意してくださり、約7年間お世話になりました指導教員である藤田尚信准教授に感謝申し上げます。

藤田研で私は、自分が持っているデータと過去の知見をよく照らし合わせて、実験的検証が可能な範囲の新しいアイデアを出し、そのアイデアを発表できるまで十分に検証することに真剣に向き合いました。この経験は、私が今後いろいろなことに挑戦するための基礎になると思います。

また、研究室が立ち上がったばかりの頃、私の研究について一緒に議論してくださった中村毅博士、川口紘平博士にも大変お世話になりました。

藤田研究室で出会った他のラボメンバーにも、様々な良い刺激を受けました。感謝申し上げます。

Frankenbody は、木村宏博士、Ning Zhao 博士、Timothy J. Stasevich 博士から分与していただきました。厚く御礼申し上げます。

本研究で行なった Six-cells RNA-seq のプロトコールは、九州大学の大川恭行博士が主催する研究室から分与されたものです。そのプロトコールで作成した cDNA ライブラリーのシーケンスは大川研究室に所属する原田哲仁博士、田中かおり博士に実施していただきました。トランスクリプトーム解析に関して初心者の私の疑問点を丁寧に説明していただき、誠にありがとうございました。

TEM を用いた DIOMs の観察では、東京医科歯科大学リサーチコアセンター組織解析ユニットの酒巻有里子博士にサンプルの染色などを依頼しました。TEM の使用方法など、細かく指導していただいたこと、感謝申し上げます。

ショウジョウバエのストックは、Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC), Vienna Drosophila Resource Center (VDRC), NIG-FLY (National institute of Genetics), Fly ORF から入手しました。感謝申し上げます。

Atg5 null 系統、FIP200 null 系統は、Jun Hee Lee 博士から分与され、Atg9 null 系統は GC. Chen 博士から分与されました。誠にありがとうございました。

博士課程の同期である内野哲志氏、柿原慧遵氏、後藤尚紀氏、谷口剛樹氏とはいろいろなことを語り合いました。ありがとう。

ここまで長い間、研究をすることができたのは両親と弟、家族の支えがあつてできたことです。特に母には心配をかけました。これまで支えてもらってきたことを忘れず、自分もまた誰かの支えであるような人間でありたいと思います。

2024 年 1 月 11 日 村川 直柔