

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840076

研究課題名(和文)オートファゴソーム形成開始に関わる分子群と細胞内オルガネラの相互作用

研究課題名(英文) Interactions between organelles and molecules related to autophagosome formation

研究代表者

渋谷 周作 (Shibutani, Shusaku)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20534473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オルガネラの一つであるエンドソーム・リソソームの損傷はオートファジーを誘導することが知られており、このことが細胞内寄生菌や不良リソソームの隔離除去に関わると考えられている。ULK1複合体はオートファジー初期に働く因子であるが、損傷エンドソーム・リソソームにULK1複合体がリクルートされてくることが知られている。本研究では、ULK1複合体の構成因子の一つであるFIP200に注目し、解析した。FIP200が損傷エンドソームにリクルートされるのに必要なドメイン、FIP200がULK1と相互作用するのに必要なドメインを決定し、これらのドメインの機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：It has been known that damage to endosomes or lysosomes induces autophagy, and this autophagy induction appears to be related to the isolation/elimination of invasive bacteria and damaged lysosomes. The ULK1 complex, a protein complex that functions at early stages of autophagy, is known to be recruited to damaged endosomes/lysosomes, suggesting that the recruitment plays a role in the autophagy induction around damaged endosomes/lysosomes. In this study, we focused on FIP200, a subunit of the ULK1 complex, and identified the regions of FIP200 that are responsible for its recruitment to damaged endosomes and for its interaction with ULK1, respectively. We further analyzed the functions of these regions in autophagy induction.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー Atg

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物で広く保存された細胞内大規模分解システムである。オートファジーが誘導されると「オートファゴソーム」と呼ばれる二重膜小胞が細胞内に出現し、ついでリソソームと融合することで、オートファゴソーム内の細胞質成分が分解される。近年、オートファジーががん・神経変性・感染症などの抑制から発生・分化まで多岐にわたる生理機能を持つことが判明し、注目を集めているが、オートファジー必須タンパク質 (Atg タンパク質) の発見が 1990 年代と比較的最近であるため、オートファジーの基本的な分子メカニズムがまだ十分に解明されておらず、このことがオートファジーの臨床への応用を阻む一因になっている。特に、オートファジーのメカニズムを理解する上で、各 Atg タンパク質の機能をより正確に理解することが極めて重要であるが、未だ機能がよく分かっていない Atg タンパク質が複数存在する。

2. 研究の目的

本研究では、Atg タンパク質複合体である ULK1 複合体 (ULK1, FIP200, Atg13, Atg101 からなる) に注目した。ULK1 複合体は、オートファジー経路の最も初期の段階で働いているという証拠があるが、そのオートファジー誘導メカニズムについてはほとんど解明されていない。

本研究では特に、ULK1 複合体のサブユニットの一つである FIP200 に注目した。FIP200-ノックアウト (KO) 細胞が過去に作成され報告されている。FIP200-KO 細胞ではオートファジー活性が欠失しており、また、ULK1 のオートファゴソーム形成サイトへのリクルートも認められないことから、FIP200 が ULK1 複合体の足場タンパク質として機能している可能性が高いと考えられる。本研究においては、以下の (1) ~ (3) に述べる ULK1 複合体の機能解析を目的とした。

(1) ULK1 複合体 (FIP200) のオートファゴソーム形成場所へのリクルート:

ULK1 複合体は、Atg タンパク質の中でも、最も初期にオートファジー形成場所にリクルートされてくるタンパク質複合体である。また、各種 Atg ノックアウト細胞を用いたヒエラルキー解析の結果からも、オートファジー経路の最も上流に位置することが示されている。しかし、ULK1 複合体がオートファゴソーム形成サイトにどのようなメカニズムでリクルートされるのか不明である。上記のように FIP200-KO 細胞では ULK1 のリクルートが起こらないことから、FIP200 が ULK1 複合体のオートファゴソーム形成サイトへのリクルートを担う足場タンパク質である可能性が高い。したがって、FIP200 リ

クルートのメカニズムを解析することが、ULK1 複合体リクルートを理解する上で重要だと考えられる。

(2) オートファジーによる細胞内サルモネラの増殖抑制:

サルモネラは非貪食細胞の細胞内に侵入し、エンドソーム由来の小胞から細胞質内に脱出して増殖しようとする。このとき、細胞質内に侵入してきたサルモネラをオートファゴソームが選択的に捕獲し、増殖抑制に働くことが知られている。したがって、細胞内サルモネラの増殖抑制能を見ることで、対細菌オートファジーの機能を評価することができる。

(3) ULK1 複合体形成:

FIP200 はセリン-スレオニンキナーゼ活性を持つ ULK1 と複合体を形成する。FIP200 のどの領域が ULK1 との複合体形成に必要なのかは知られていない。

3. 研究の方法

FIP200 ノックアウト細胞に各種の FIP200 ドメイン欠損ミュータントを安定発現させ、それらの変異体の表現形を解析することで、FIP200 の各種ドメインの役割を調べた。

(1) ULK1 複合体 (FIP200) のオートファゴソーム形成場所へのリクルート:

FIP200 のオートファゴソーム形成場所へのリクルートを評価するために、当研究室ですでに論文報告があるポリスチレンビーズによるオートファジー誘導実験系を用いた。この実験系においては、トランスフェクション試薬で処理したポリスチレンビーズを細胞内にエンドサイトーシスで取り込ませる。その後、エンドソーム膜がトランスフェクション試薬の影響で損傷を受け、そのときにエンドソーム膜タンパク質のコピキチン化が起こり、コピキチン化依存的に各種の Atg タンパク質がリクルートされてくるのが分かっている。

蛍光タンパク質 mStrawberry を付加した FIP200 (mSt-FIP200) を安定発現する細胞を作成し、mSt-FIP200 のコピキチン化エンドソームへのリクルートを評価した。このとき、内在性 FIP200 の影響を除くために FIP200-KO MEF 細胞を用いた。

(2) オートファジーによる細胞内サルモネラの増殖抑制:

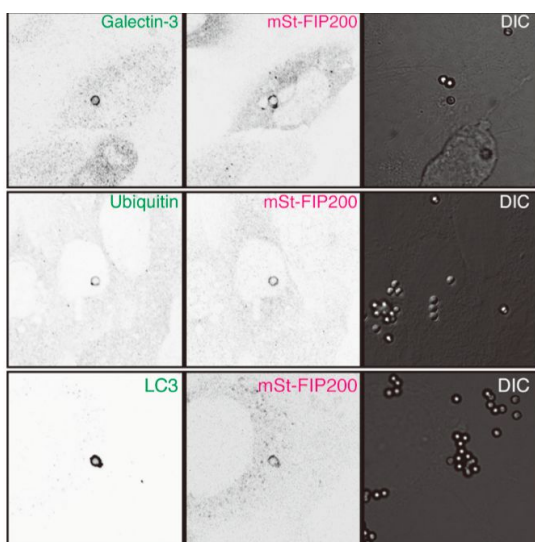
FIP200 の各種ドメインの発現がサルモネラの増殖にどう影響するかを調べるため、サルモネラ感染後の細胞内における増殖を、顕微鏡下でサルモネラ数をカウントして判定した。

(3) ULK1 複合体形成:

FIP200 のどの領域が ULK1 との複合体形成に必要なかを調べるために、各種の FIP200 ドメイン欠損ミュータントと ULK1 との相互作用を Co-IP 法により判定した。

4. 研究成果

(1) まず、mSt-FIP200 が Galectin3 陽性の損傷エンドソームへの mSt-FIP200 のリクルートされることを確認した(図:上段)(エンドソーム損傷により、エンドソーム内腔の糖タンパク質が細胞質にさらされ、糖鎖結合能を持つ Galectin3 によって認識される)。このとき、上記のようにユビキチン化も起こっており(図:中段)、オートファゴソームマーカーである LC3 と mSt-FIP200 との共存も確認された(図:下段)



次に、mSt-FIP200 の各種ドメイン欠損ミュータントを作成し、同様にユビキチン陽性エンドソームへのリクルートを観察した。その結果、mSt-FIP200 のビーズへのリクルートが著しく減弱する FIP200 ミュータントが得られた(本報告書においては「ドメイン1」欠損ミュータントとする)。ビーズの代わりにサルモネラを用いたときにも同様の実験結果が得られた。

逆に、FIP200 ドメイン1のみでも、ユビキチン陽性エンドソームへのリクルートが認められたことから、ドメイン1が FIP200 のリクルートに必要な十分であることが示された。

(2) 細胞内に侵入したサルモネラ増殖抑制に対する、FIP200 ミュータント発現の影響を調べた。その結果、野生型細胞において、ドメイン1の過剰発現によりサルモネラ増殖が悪化した。このことから、ドメイン1の過剰発現が内在性の FIP200 の機能を抑制し、結果としてサルモネラに対するオートファジーが抑制されたと考えられた。ドメイン1が内在性の FIP200 をどのようにして阻害し

たのかを明らかにすることは将来の検討課題であるが、上記のようにドメイン1単独でユビキチン陽性エンドソームヘリクルートされ得ることから、現時点での推測としては、ドメイン1が内在性 FIP200 と競合してユビキチン陽性エンドソームに結合し、内在性 FIP200 (および内在性 ULK1 複合体) のリクルートを阻害したためではないかと予想している。

(3) 各種 FIP200 欠損ミュータントと ULK1 の相互作用を Co-IP 法で確認した結果、FIP200 の ULK1 相互作用ドメイン(「ドメイン2」とする)が判明した。ドメイン1とドメイン2は別の領域にあり、ドメイン2は FIP200 のユビキチン陽性エンドソームへのリクルートには必要ではない(実験(1)の結果)。しかし、FIP200 ドメイン2欠損ミュータントは FIP200-KO 細胞に導入してもオートファジー活性を回復することができないことから、ドメイン2は FIP200 の機能に必須であることが分かった。

以上の結果から、ULK1 複合体がオートファジーの基質であるユビキチン陽性エンドソームにリクルートされる際には、FIP200 のドメイン1がリクルートを担い、ドメイン2が ULK1 との複合体形成に関わることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

- [1] 渋谷周作, 吉森保. 選択的オートファジー:メカニズムと膜の起源. 日本膜学会雑誌. 2015; 40(1): 9-20 査読無
- [2] Shibutani ST, Yoshimori T. Autophagosome formation in response to intracellular bacterial invasion. *Cell Microbiol.* 2014 Nov; 16: 1619-1626. 査読有
- [3] Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.* 2014; 24: 58-68. 査読有
- [4] 渋谷周作, 吉森保 (2014). オートファジー. 医学のあゆみ. 2014; 249:375. 査読無
- [5] Hamasaki M, Shibutani ST, Yoshimori T. Up-to-date membrane biogenesis in the autophagosome formation. *Curr*

Opin Cell Biol. 2013; 25: 455-460.
査読有

〔学会発表〕(計1件)

[1] Shibutani ST, Imai K, Kusaba T, Yoshimori T . Recruitment of Atg Proteins to Selective Autophagy Substrates. 2014, Gordon Research Conference (Autophagy in Stress, Development & Disease). Lucca, Italy.

6 . 研究組織

(1)研究代表者
渋谷 周作 (SHUSAKU SHIBUTANI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20534473

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし