

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03670

研究課題名(和文) ULK1高次集積複合体によるオートファジー誘導シグナル感知機構の総合的理解

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the higher-order assembly of the ULK1 complex that senses autophagy-inducing signals

研究代表者

山本 林 (Yamamoto, Hayashi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：80551283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー誘導に関わるULK1複合体へのシグナル伝達機構の解析から、mTORC1複合体とULK1の相互作用領域を配列中央の天然変性領域と特定し、シグナルの受け手となる因子が進化の過程でAtg13の天然変性領域からULK1へと移行していることを明らかにした。ULK1複合体の形成に関わる領域をULK1、ATG13、FIP200でそれぞれ特定し、さらにULK1複合体同士が自己集積することで液滴様の性質を持つことを見出した。ATG9ベシクルのリクルート機構として出芽酵母でのAtg13依存性経路に加えて、哺乳類は選択的オートファジー基質依存性経路を新たに獲得していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類でのオートファジー誘導機構については具体的な分子機構が不明であったが、mTORC1複合体とULK1の相互作用領域を特定することで、シグナル伝達機構が進化の過程で大きく変化し、哺乳類ではより複雑化していることを明らかにした。この成果は、哺乳類オートファジー研究に新たな視点を提供するだけでなく、創薬ターゲットとしてのULK1の有用性を示すものとなる。ATG9ベシクルのリクルート機構として新たに見出した分解基質依存性経路は、細胞内品質管理に関わる選択的オートファジーの効率化、厳密化のために獲得した経路と考えられ、恒常性オートファジーや選択的オートファジーの制御に関わる新しい発見である。

研究成果の概要(英文)：Upon induction of autophagy, a double membrane-bound autophagosome is generated and fuses with lysosomes to degrade its contents. However, it remains unclear how the ULK1 complex receives the autophagy-inducing signals from the mTORC1 complex. In this study, we found that the intrinsically disordered region (IDR) of ULK1 directly interacts with the mTORC1 complex. In yeast, the TORC1-interacting region is the IDR of Atg13. Thus, our findings indicate that the signal recognition system is shifted from Atg13 to ULK1 during evolution. We also identified the regions of ULK1, ATG13, and FIP200 involved in the formation of the ULK1 complex and found that the ULK1 complex further assembles with each other to form liquid droplet-like structures in vivo. We also found that ATG9 vesicles are recruited via selective autophagy substrates in addition to the ATG13-dependent pathway found in yeast. We show that mammals have acquired a selective autophagy substrate-dependent pathway during evolution.

研究分野：分子生物学、生化学、オートファジー

キーワード：オートファジー ULK1複合体 シグナル伝達 高次集積体 分子機構 液滴形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物が備える細胞内大規模分解システムであり、飢餓環境を生き延びる生存戦略の1つであるだけでなく、細胞内品質管理、初期胚発生、腫瘍形成抑制、神経変性疾患抑制、細菌感染防御など様々な高次生理機能に関わることが知られている。飢餓シグナルによってオートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる単膜が形成され、細胞質の一部を取り囲むように伸長した後、最終的に端が閉じて二重膜構造のオートファゴソームとなる。完成したオートファゴソームはリソソームや液胞と融合することで内容物を分解し、得られた分解産物を再利用することで細胞は飢餓環境を生き延びる。

オートファゴソーム形成に関わる因子として、これまでに多くの ATG (autophagy-related) タンパク質が同定されている。オートファゴソーム形成の初期ステップでは、哺乳類 ULK1 複合体 (出芽酵母 Atg1 複合体) が小胞体近傍 (出芽酵母では液胞近傍) に局在化することが知られている。近年の研究から、出芽酵母 Atg1 複合体の形成メカニズムについて多くの知見が得られている。Atg1 複合体は Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31 という 5 つのサブユニットで構成され、上流キナーゼである TORC1 複合体からの飢餓シグナルを受け取る主要因子が Atg13 である。Atg13 は富栄養条件下において高度にリン酸化されているが、飢餓シグナルを受けて脱リン酸化されることで Atg1 と複合体を形成する。また、Atg13 は Atg17-Atg29-Atg31 複合体との相互作用部位を 2 つ持っており、脱リン酸化によってこれらの相互作用が増強されることで Atg1 複合体同士が自己相互作用して高次集積体となる。この Atg1 高次集積体が scaffold となることで下流 ATG タンパク質の局在化が促され、オートファゴソーム形成に必須の PAS (pre-autophagosomal structure) が形成される。Atg1 高次集積体の形成を制御する Atg13 のリン酸化は TORC1 複合体によるものであるが、Atg13 がどうやって TORC1 複合体からの飢餓シグナルを受け取っているのか具体的な分子メカニズムは分かっていない。

哺乳類 ULK1 複合体は ULK1 (Atg1)、ATG13、ATG101、FIP200 からなり、mTORC1 複合体からの飢餓シグナルを受けて小胞体近傍に局在化するが、出芽酵母 Atg13 とは異なり、哺乳類 ATG13 は富栄養条件下において高度にリン酸化されているわけではない。蛍光顕微鏡観察では、出芽酵母 Atg1 複合体と同様に ULK1 複合体も飢餓シグナルを受けて明るい輝点を形成する、つまり高次集積していると考えられるが、出芽酵母で定義された PAS に相当する構造体は哺乳類では不明であり、ULK1 複合体がどうやって飢餓シグナルを受け取り、複合体・高次集積体形成を制御しているのか分かっていない。また、哺乳類における下流 ATG タンパク質の局在化は出芽酵母での局在化ヒエラルキーとは異なり、特に ATG9 ベシクルの局在化と ULK1 複合体の関係については出芽酵母の場合と大きく異なることが知られている。ATG タンパク質群は高度に保存されているが、哺乳類と出芽酵母ではオートファジー制御機構に違いが見られ、こういった差異がなぜ生じるのかについても説明が付いていない。

2. 研究の目的

哺乳類でのオートファジー誘導メカニズムについては、mTORC1 複合体から ULK1 複合体へのシグナル伝達、ULK1 複合体の形成および高次集積化、並行して局在化する ATG9 ベシクルとの関係など不明な点が多く、出芽酵母における Atg1 複合体、Atg9 ベシクルの場合と比較して多くの相違点がある。哺乳類ではオートファジー自体がより高度な生理機能に関わることから、オートファジー誘導の段階で出芽酵母とは異なる制御が行われ、より複雑化していることが推測される。ULK1 複合体を中心としたオートファジー誘導メカニズムの解明はオートファジー研究分野の重要課題として残されており、また、オートファジー亢進剤などオートファジー誘導シグナルを人為的に制御する創薬の観点から見ても、その機能が多岐にわたる mTORC1 複合体と比べて、オートファジー特異的な ULK1 複合体は創薬ターゲットとして適していると考えられる。そこで本研究では、オートファジー誘導が ULK1 複合体によってどのように制御されているか、ULK1 複合体の各サブユニットの機能ドメインに着目することで分子メカニズムの点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) mTORC1 複合体から ULK1 複合体へのシグナル伝達メカニズムの解析

ULK1 複合体と mTORC1 複合体の相互作用について解析を行った。過去の知見から mTORC1 複合体が ULK1 と相互作用することが見出されていたため、ULK1 のドメイン欠損変異体および点変異体を作成し、mTORC1 複合体構成因子 Raptor との相互作用について免疫沈降実験で解析を行った。ULK1 は N 末端キナーゼドメイン、中央の天然変性領域、C 末端 MIT ドメインに分けられるため、構造予測および配列保存性を参考に ULK1 変異体の作成を行った。免疫沈降実験によって得られた ULK1 変異体の候補を ULK1 ULK2 DKO 細胞に安定発現させて、ULK1 および ATG13 のリン酸化状態、オートファジー活性について解析を行った。

(2) ULK1 複合体の高次集積メカニズムの解析

ULK1 複合体の形成メカニズムを明らかにするため、ULK1、ATG13、FIP200 の変異体解析を行った。上記の ULK1 に加えて ATG13 と FIP200 についても同様に構造予測および配列保存性を参考にドメイン欠損変異体および点変異体を作成し、各サブユニット間の相互作用を免疫沈降実験で解析した後、ULK1 ULK2 DKO 細胞、ATG13 KO 細胞、FIP200 KO 細胞に安定発現させてリン酸化状態およびオートファジー活性の解析を行った。また、各変異体を安定発現

させた際の細胞内局在および集積状況について蛍光顕微鏡解析を行った。これらの解析の過程で、出芽酵母の PAS と同様、哺乳類においても ULK1 複合体が高次集積する様子が観察された。細胞内で観察される ULK1 高次集積体が液滴様の性質を持つ可能性が示唆されたため、ULK1 複合体の主要サブユニットを昆虫細胞で大量発現させて、リコンビナントタンパク質の調製を行い、*in vitro* での相互作用解析および複合体再構成実験を行った。

(3) ATG9 ベシクルの局在化メカニズムの解析

出芽酵母において Atg9 ベシクルは Atg1 複合体の下流に位置しており、飢餓誘導性のオートファジーでは Atg9 ベシクルの PAS への局在化は Atg13 に依存する。しかし、哺乳類ではオートファジー誘導条件に関わらず ATG9 ベシクルは ULK1 複合体とは独立に局在化することが報告されている。これらの相違は、出芽酵母には存在しない哺乳類固有の選択的オートファジー基質によるものと仮説を立て、選択的オートファジー基質 5 種類の全 KO 細胞 (Penta KO 細胞) を用いて ULK1 複合体および ATG9 ベシクルの局在解析実験を行った。また、同条件下においては、ATG9 の局在化が ATG13 依存的である可能性を検証するため、ATG13 のドメイン欠損変異体を用いて免疫沈降実験を行った

(4) Atg1 複合体へのシグナル伝達メカニズムの解析

哺乳類 ULK1 複合体での解析と並行して、出芽酵母 Atg1 複合体へのシグナル伝達メカニズムの解析を行った。出芽酵母では Atg13 が TORC1 複合体依存的にリン酸化されていることから、Atg13 のドメイン欠損変異体および点変異体を作成し、TORC1 複合体との相互作用について免疫沈降実験で解析を行った。Atg13-Kog1/Raptor 相互作用部位として得られた変異体候補について、Atg13 自身のリン酸化による相互作用変化の可能性を検証するため、リン酸化および非リン酸化ミミック変異体を作成し、*atg13Δ*細胞に発現させて相互作用およびオートファジー活性の測定を行った。

4. 研究成果

(1) mTORC1 複合体から ULK1 複合体へのシグナル伝達メカニズムの解析

ULK1 のドメイン欠損変異体と Raptor の免疫沈降実験を行った結果、ULK1 は中央の天然変性領域 (279-827 残基) を介して Raptor と相互作用することが明らかとなった。天然変性領域をさらに細かく分割して相互作用領域の絞り込みを行い、最終的に数残基の欠失によって Raptor との相互作用が失われる変異体 Δ AA を得た。 Δ AA 変異体を ULK1 ULK2 DKO 細胞に安定発現させたところ、オートファジー非誘導条件下であっても mTORC1 複合体による ULK1 のリン酸化が低下することが示されたが、リン酸化が完全に失われるようなことはなく、オートファジー活性への影響も限定的であった。研究成果(4)にあるように、出芽酵母では Atg13 と Kog1/Raptor の相互作用が失われることで Atg13 のリン酸化状態が大きく変化し、オートファジー誘導時の活性が野生型 Atg13 よりも顕著に高いことから、哺乳類では ULK1-Raptor 相互作用だけではオートファジー誘導シグナルの説明に十分ではないと考えられる。飢餓シグナルの伝達メカニズムの一部は出芽酵母の TORC1-Atg13 経路から哺乳類の mTORC1-ULK1 経路に移行しているものと考えられるが、哺乳類ではより複雑化している可能性をこれらの結果は示している。

(2) ULK1 複合体の高次集積メカニズムの解析

ULK1、ATG13、FIP200 の各種変異体を用いた免疫沈降実験から、ULK1-ATG13 相互作用および ATG13-FIP200 相互作用に必要な領域を確認し、これらに加えて新たな ATG13-FIP200 相互作用領域を ATG13 配列中に見出した。この結果は、出芽酵母 Atg13 が Atg17-Atg29-Atg31 複合体との相互作用部位を 2 つ持つこととよく似ているが、Atg13 の脱リン酸化による相互作用の制御は哺乳類 ATG13 には見られず、その相互作用様式は異なっていると考えられる。それぞれの相互作用が失われる変異体でオートファジー活性を測定したところ、いずれも活性低下は限定的であったことから、哺乳類 ULK1-ATG13-FIP200 相互作用は相互に補完的であることが示唆された。これらの結果は、哺乳類では恒常性オートファジーの活性が高く、mTORC1 複合体からの飢餓シグナルの重要性が出芽酵母ほど顕著ではないという可能性を示唆している。飢餓誘導性オートファジーだけでなく、オルガネラ選択的オートファジーを対象とした解析や、神経細胞のようなオートファジー活性の影響が異なる細胞での解析、あるいはマウスなど個体レベルでの解析、加齢など長期間の解析が今後の課題として挙げられる。

上記解析の過程で各種変異体の蛍光顕微鏡観察を行い、哺乳類細胞においても ULK1 が PAS 様の輝点として観察されることを見出した。ULK1 複合体の高次集積体と考えられる PAS 様の輝点は、選択的オートファジー基質の 1 つである p62 condensate (液滴) の近傍に観察され、さらに、特定の変異体では p62 condensate を取り囲むような様子も観察された。これらの結果は ULK1 高次集積体が液滴としての性質を備える可能性を示唆している。そこで、ULK1 複合体の主要構成因子である ATG13 と FIP200 をリコンビナントタンパク質として調製し、*in vitro* で混合したところ、ATG13 と FIP200 だけで凝集する様子が捉えられた。

(3) ATG9 ベシクルの局在化メカニズムの解析

ULK1 複合体および ATG9 ベシクルの PAS 様構造体への局在化について Penta KO 細胞を用いて蛍光顕微鏡観察を行ったところ、ULK1 複合体の局在化は (野生型細胞での結果と同様) ATG9 に依存しない一方で、ATG9 ベシクルの局在化は ULK1 複合体に依存するようになることが分かった。この結果は、これまで哺乳類と出芽酵母で異なると考えられていた局在化ヒエラ

ルキーが実は同じであったことを示しており、進化の過程で高度に保存されたメカニズムであることが示唆された。また、Penta KO 細胞において ATG9 ベシクルは ATG13 との相互作用で局在化することが新たに見出され、哺乳類 ATG9 ベシクルの局在化には ATG13 依存性経路と選択的オートファジー基質依存性経路の 2 つがあることが明らかとなった。選択的オートファジー基質依存性経路は進化の過程で獲得した新しいメカニズムと考えられ、これらの相互作用は選択的オートファジーの亢進や選択性の厳密化などに寄与していると考えられる。

(4) Atg1 複合体へのシグナル伝達メカニズムの解析

出芽酵母 Atg13 の各種変異体を用いた解析から Kog1/Raptor との相互作用に必須の領域を特定した。この領域の欠損変異体あるいは点変異体を出芽酵母に発現させると、オートファジー非誘導条件であっても Atg13 のリン酸化状態が顕著に低下し、飢餓誘導性オートファジーの活性が亢進することが示された。また、Atg13-Kog1/Raptor 相互作用は Atg13 自身のリン酸化によってネガティブに制御されていることが明らかとなった。興味深いことに Atg13-Kog1/Raptor 相互作用に必要な Atg13 の領域は出芽酵母近縁種では保存されているものの、哺乳類 ATG13 では保存されておらず、進化の過程でオートファジーシグナルの伝達・受容システムが大きく変化したことが強く示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Pang Yu, Yamamoto Hayashi, Sakamoto Hirokazu, Oku Masahide, Mutungi Joe Kimanthi, Sahani Mayurbhai Himatbhai, Kurikawa Yoshitaka, Kita Kiyoshi, Noda Nobuo N., Sakai Yasuyoshi, Jia Honglin, Mizushima Noboru | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Evolution from covalent conjugation to non-covalent interaction in the ubiquitin-like ATG12 system | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 289 ~ 296 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-019-0204-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Mizushima Noboru, Matsui Takahide, Yamamoto Hayashi | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 YKT6 as a second SNARE protein of mammalian autophagosomes | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Autophagy | 6. 最初と最後の頁 176 ~ 177 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2018.1532262 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Matsui Takahide, Jiang Peidu, Nakano Saori, Sakamaki Yuriko, Yamamoto Hayashi, Mizushima Noboru | 4. 巻 217 |
| 2. 論文標題 Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 2633 ~ 2645 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201712058 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tamura Norito, Nishimura Taki, Sakamaki Yuriko, Koyama-Honda Ikuko, Yamamoto Hayashi, Mizushima Noboru | 4. 巻 591 |
| 2. 論文標題 Differential requirement for ATG2A domains for localization to autophagic membranes and lipid droplets | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Letters | 6. 最初と最後の頁 3819 ~ 3830 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12901 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Uematsu Masaaki、Nishimura Taki、Sakamaki Yuriko、Yamamoto Hayashi、Mizushima Noboru | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Accumulation of undegraded autophagosomes by expression of dominant-negative STX17 (syntaxin 17) mutants | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Autophagy | 6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1464 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2017.1327940 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本 林 |
| 2. 発表標題 オートファジー始動複合体の動的相互作用と分子集合形態の解析 |
| 3. 学会等名 ConBio 2017 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本 林 |
| 2. 発表標題 オートファジータンパク質群の動的相互作用と分子集合形態の解析 |
| 3. 学会等名 第68回 日本電気泳動学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 山本 林 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 医歯薬出版 | 5. 総ページ数 272 |
| 3. 書名 医学のあゆみ オートファジー 分子機構・生物学的意義・疾患との関わり | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 山本 林 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 224 |
| 3. 書名 実験医学・増刊 The オートファジー 研究者たちの集大成が見える最新ビジュアルテキスト | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究協力者 | 水島 昇 (Mizushima Noboru) (10353434) | 東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授 (12601) | |