

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07319

研究課題名(和文) 選択的オートファジーを制御する液胞膜因子の構造機能解析

研究課題名(英文) Structure-function analysis of a vacuolar membrane factor that controls selective autophagy

研究代表者

藤岡 優子 (Fujioka, Yuko)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：80399964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはオートファジーの開始点PASの構成因子であるVac8に着目し構造機能研究を行った。その結果、PASは液体のような性質を持つ複合体(液滴)であり、Vac8はAtg13を介してPASと液胞膜を繋ぎとめる働きをしていることを明らかにした。また飢餓で誘導されるPAS(飢餓PAS)とCvt経路に働くPAS(選択的PAS)では、その構成因子が異なることが知られていたが、われわれはVac8とAtg13の役割は共通であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーがどのように引き起こされるのかを理解することは、それ自体が科学の発展に寄与するだけでなく、オートファジーの機能不全が関与する、神経変性疾患をはじめとする各種疾患の治療法、治療薬の開発をする上で重要な基盤となる。本研究成果によって、オートファジーの始動機構の一端を明らかにすることができたが、今後も引き続き研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied the structure and function of Vac8, a component of the PAS that mediates autophagy initiation. Our results show that the PAS is a complex with liquid-like properties (droplets) and that Vac8 acts as a link between the PAS and the vacuolar membrane via Atg13. Additionally, we suggested that the roles of Vac8 and Atg13 in PAS tethering to the vacuole are common between starvation-induced autophagy and the Cvt pathway although the components of the starvation PAS and the selective PAS functioning in the Cvt pathway were known to be different.

研究分野：生物学

キーワード：オートファジー

## 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、栄養飢餓などに応じて、細胞が自身の構成成分である細胞質やオルガネラをリソソーム/液胞に輸送し、分解する現象である。その分解産物はリソソーム/液胞から排出され、新たなタンパク質の合成などに再利用される。オートファジーは当初、選択性のないバルクな分解システムであると考えられていた。しかし研究の進展とともに、ユビキチン-プロテアソーム分解系のように分解対象を選択して分解する『選択的オートファジー』の存在が明らかになってきた。これまでの研究によって、選択的オートファジーが細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしていることや、その分解対象が核、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内オルガネラから、病原体、凝集したタンパク質まで多岐に渡っていることが明らかになりつつある。さらに、選択的オートファジーの破綻は神経変性疾患を引き起こすことが報告されており、例えば不要なミトコンドリアの分解不全がパーキンソン病を引き起こすこと、またタンパク質凝集体の分解不全がアルツハイマー病やハンチントン病などの原因になることが示唆されている。

オートファジーが誘導されると、被分解物を細胞質から隔離する『オートファゴソーム』と呼ばれる二重膜構造体が形成される。出芽酵母では、飢餓条件下約 20 種類ある Atg タンパク質の殆どが液胞近傍のプレオートファゴソーム構造体 (pre-autophagosomal structure : PAS) に局在し、隔離膜の形成に働く。Vac8 は出芽酵母の液胞膜上に局在するタンパク質で、他の Atg タンパク質とともに PAS に共同在する。Vac8 は娘細胞への液胞輸送や、出芽酵母の核の一部が液胞にダイレクトに食いちぎられる選択的な分解、piecemeal microautophagy of the nucleus (PMN)、さらには選択的オートファジーの 1 つである cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) 経路に必須の役割を持つ。また飢餓誘導のバルクオートファジーには必須ではないが、その効率的進行に重要である。Vac8 の立体構造の特徴としては、11 個のアルマジロリピートを持っていることが配列から予測されていること、N 末端の SH4 ドメインがミリストイル化、パルミトイル化されて液胞膜に局在することが挙げられる。酵母における PAS は液胞膜近傍に形成されることから、液胞膜局在タンパク質 Vac8 は PAS の液胞近傍での構築において中心的な役割を担うことが強く示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまで PAS における役割についてほとんど解析が行われて来なかった Vac8 に着目し、その構造機能研究を展開することで、PAS の構造および形成機構を解明し、オートファジーの始動機構を明らかにすることを研究目的とする。また飢餓で誘導される PAS (飢餓 PAS) と Cvt 経路に働く PAS (選択的 PAS) では、その構成因子が異なることが知られているため、その差異を明らかにすることも研究目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 結晶構造解析

Vac8 とその結合因子 Atg13 について、様々な長さのコンストラクトを大腸菌で発現、精製し、様々な組み合わせで複合体を形成させ結晶化のスクリーニングを行った。得られた結晶について放射光施設で回折データを収集し、構造決定を行った。

#### (2) 機能解析

システインに反応するリン脂質を含んだ巨大脂質膜小胞 (giant unilamellar vesicle, GUV) を調製し、精製 Vac8 と混合することで Vac8 を GUV 上に固定した。飢餓 PAS の足場複合体である Atg1 複合体 (Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31 の 5 つのタンパク質で形成される複合体) の各構成因子および選択的 PAS の足場タンパク質 Atg11 は、昆虫細胞あるいは大腸菌を用いて発現、精製した。相分離実験はディッシュ上でタンパク質を混合させることで行った。相分離過程の観察、酵母における PAS の観察および光褪色後蛍光回復実験は共焦点レーザー顕微鏡 FV3000 を用いて行った。1,6-hexanediol の添加実験は酵母をジギトニン処理してから行った。GUV と Atg1 複合体液滴との相互作用実験はチャンバーに GUV 溶液を充填したのち、マイクロピペットを用いて GUV 近傍に Atg1 複合体溶液を添加することで行った。高速 AFM 観察は、蛍光顕微鏡一体型のプローブスキャン型高速 AFM 装置を用いてスライドガラス上で行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 結晶構造解析

Vac8 と Vac8-Atg13 複合体の結晶化スクリーニングを行った結果、良好な結晶が得られ、Vac8 の結晶構造を決定することができた。しかしながら、われわれの結晶構造では Vac8 に結合している Atg13 の電子密度が確認できなかった。一方、海外の他のグループから Vac8 と核膜上に局在するタンパク質 Nvj1 の複合体の X 線結晶構造解析の論文が報告された。われわれが得ている結晶の分解能よりも高い 2.4 オングストロームの結晶構造であったため、コンストラクトを参考にするなどして、Atg13 との複合体の結晶構造の決定へ向けて実験を進めていたが、その後 Vac8-Atg13 複合体の結晶構造も 2.9 オングストロームの分解能で他のグループから報告された。Vac8 は Nvj1 と類似した結合様式で Atg13 とも結合していた。しかし、それぞれの複合体構造では 4 次構造が大きく異なっており、Vac8 の二つの機能、すなわち PMN と Cvt 経路では、Vac8 は異なる 4 次構造で機能していることが示唆された。

#### (2) 機能解析

他のグループから構造が報告されたことから、精製した Vac8 と人工膜を用いた機能解析実験を行うことにした。Vac8 は N 末端にある複数のシステイン残基がミリスチル化やパルミトイル化などの脂質修飾を受けることで液胞膜に局在し機能する。これらシステイン残基を化学的に脂質修飾することで、Vac8 を GUV 上に固定した。Vac8 を蛍光標識して蛍光顕微鏡観察を行うことで、Vac8 が GUV 膜上に均一に分布することを確認した。得られた Vac8-GUV を液胞の模倣体として用いて、PAS の *in vitro* 再構成研究に着手した。

われわれはこれまで、Atg1 複合体は Atg13 と Atg17 が異なる 2 ヶ所で互いに結合することで高次多量体を形成し、それがオートファジーの始動に重要な役割を果たしていることを報告した (Yamamoto et al., Dev Cell 2016)。Atg1 複合体はその構成タンパク質に長い天然変性領域があり、飢餓 PAS は飢餓時に出現する一過的な構造体である。われわれはこの特徴が液-液相分離するタンパク質の特徴に類似していることに気が付いた。液-液相分離とは、核酸、天然変性領域を持つタンパク質、多価の結合をし得るタンパク質などが、弱い相互作用を複数箇所で行うことによって、液体のような性質をもつ集合体 (液滴) を形成する現象である。例えば現在、核小体やストレス顆粒などが液-液相分離状態であると考えられており、凝集体とは異なり、これら液滴の内外では活発に分子が入り出していることがわかってきた。液滴はタンパク質分子とオルガネラの間の機能単位として、オンデマンドの反応槽のように機能している。われわれは、PAS も液-液相分離で形成された液滴の一種ではないかという着想を得、*in vitro* 再構成研究に Atg1 複合体を導入するにあたって、まずこれを検証することにした。

PAS が液滴であるかどうかを調べるために、光褪色後蛍光回復法で PAS における GFP-Atg13 の挙動を調べた。この実験は、PAS を形成させた後に強いレーザーを局所的に照射し消光させ、周りの細胞質からの蛍光タンパク質の流入によって蛍光強度が戻るか否かを調べる。PAS の蛍光は数秒内に回復したことから、GFP-Atg13 は PAS と細胞質の間を頻りに往來していることがわかった。また、巨大な PAS を形成させ中心部のみを消光したところ、ドーナツ状になった蛍光が 0.7 秒程で円盤状の蛍光へと均一化したことから、PAS 内部の流動性も高いことが明らかになった。この高い内部流動性は、蛍光相関分光法でも確かめられた。

液滴は形状可変性があり、エネルギー的に不利な界面を出来るだけ小さくするように互いに融合したり、球形になったり、オストヴァルト熟成したりすることが知られている。GFP-Atg13 をガラクトースで発現誘導する株を作製し、オートファジー誘導後の PAS の形成過程を注意深く観察した結果、まず小さな PAS が複数出現し、それらが互いに融合して 1 つの大きな PAS となること、融合後は速やかに球形になることが分かった。頻度は低いが、大きい方の PAS が成長する過程で小さい方の PAS が消失していく現象、すなわちオストヴァルト熟成と思われる現象も観察された。さらに液-液相分離阻害剤として広く用いられている 1,6-hexanediol で酵母を処理すると PAS は速やかに消失し、この試薬を除去すると小さな PAS が多数出現しそれらは融合を繰り返して大きな球形の PAS となった。以上の結果から、PAS は液-液相分離で形成された液滴であると結論づけた。

次に、精製したタンパク質を用いて *in vitro* での液滴形成を試みた。Atg13 と Atg17-Atg29-Atg31 複合体を生理的条件下で混合すると、速やかに液滴を形成した。この液滴は PAS と同様、互いに融合し、融合後は速やかに球形になった。Atg1 は液滴の形成には必須ではないが、液滴に容易に取り込まれた。上述のように Atg13 と Atg17 は異なる 2 ヶ所で互いに結合することで高次多量体を形成するが、そのどちらの結合を阻害する変異も液滴形成を阻害した。すなわち Atg13 による Atg17 の架橋が、液-液相分離のメカニズムとなっていることが明らかとなった。

液滴をカバーガラスにのせ高速原子間力顕微鏡で観察すると、ランダムに配置された Atg17 の S 字構造がゆらめいているところが観察された。一方カバーガラスに正電荷を与えると、Atg17 の S 字構造が規則正しく、密に詰まった像が得られた。このことは、外的要因によって、液滴が液体の性質から固体の性質へ変化することを示唆している。一般的に液滴は、液体の状態から徐々に分子間の相互作用を強め、ゲル状態を経て固体化すると考えられており、一連の変化をエージング (Ageing) と呼ぶ。エージング前後の構造変化を可視化できた例はほぼ皆無であるが、今回の高速原子間力顕微鏡像はそれを明らかにできたと思われる。

前述した通り、Vac8 は脂質化修飾されて液胞膜上に局在するタンパク質で、Atg13 と直接結合する。PAS の液胞膜局在を Vac8 が担っているのではないかと考え、Vac8 を欠損させた酵母で PAS を観察した結果、液胞から離れて PAS が形成されることがわかった。すなわち Vac8 と Atg13 の結合によって液滴である PAS は液胞上に局在すると考えられた。そこで PAS が液胞膜上に局在する状態を *in vitro* で再構成する実験を行った。前述の Vac8-液胞再構成系に対し、Atg1 複合体液滴を吹きかけた結果、膜上の Vac8 と液滴内の Atg13 の相互作用依存的に液滴は GUV 膜に結合し、まるで液胞膜上に局在する PAS のような姿となった。興味深いことに、GUV 膜上にアンカリングされた液滴はガラスに乗せた時よりも液体度が高く、膜上を激しく動きまわりながら活発に融合して大きな球状の液滴となった (Fujioka et al., Nature 2020)。

選択的 PAS では Atg17-Atg29-Atg31 複合体の代わりに Atg11 が土台として働くと考えられる。Atg11 について、飢餓 PAS 同様に *in vitro* での液滴の形成を試みた。精製した Atg11 は、塩濃度を低下させることによって単独でも液滴を形成することができたが、Atg13 と複合体を形成することによって、より効率的に液滴を形成することがわかった。また、Atg11-Atg13 複合体の液滴は、Vac8 と相互作用することが示唆された。このことから、飢餓 PAS と同様、選択的 PAS も Atg13 と Vac8 の特異的相互作用で Vac8 と結合し、その結果液胞に繫留されることが示唆され

た。今後は、出芽酵母を用いた実験や、人工膜を用いた実験を取り入れることなどにより、選択的 PAS の機能解析を行っていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Yamaguchi Masaya, Satoo Kenji, Suzuki Hironori, Fujioka Yuko, Ohsumi Yoshinori, Inagaki Fuyuhiko, Noda Nobuo N.	4. 巻 430
2. 論文標題 Atg7 Activates an Autophagy-Essential Ubiquitin-like Protein Atg8 through Multi-Step Recognition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 249 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2017.12.002	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 Fujioka Yuko, Alam Jahangir Md., Noshiro Daisuke, Mouri Kazunari, Ando Toshio, Okada Yasushi, May Alexander I., Knorr Roland L., Suzuki Kuninori, Ohsumi Yoshinori, Noda Nobuo N.	4. 巻 578
2. 論文標題 Phase separation organizes the site of autophagosome formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 301 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-1977-6	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 Yamasaki Akinori, Alam Jahangir Md., Noshiro Daisuke, Hirata Eri, Fujioka Yuko, Suzuki Kuninori, Ohsumi Yoshinori, Noda Nobuo N.	4. 巻 77
2. 論文標題 Liquidity Is a Critical Determinant for Selective Autophagy of Protein Condensates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1175.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.12.026	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 藤岡優子	4. 巻 272
2. 論文標題 オートファジーと液 - 液相分離	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 763-768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤岡優子, Jahangir Md. Alam, 野田展生
2. 発表標題 オートファゴソーム形成場PASの液-液相分離を介した構築原理
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所HP <a href="https://www.bikaken.or.jp/">https://www.bikaken.or.jp/</a>
---

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
--	---------------------------	-----------------------	----