

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06210

研究課題名(和文)新規オートファジーを制御するUlk1のリン酸化解析とその生理的・病理的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of Ulk1 phosphorylation to control alternative autophagy and elucidation of its physiological and pathological significance

研究代表者

鳥居 暁 (Torii, Satoru)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト准教授

研究者番号：10444001

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)：生物を構成する細胞には、オートファジーという自らのタンパク質などを分解し再利用するメカニズムが備わっている。私の所属研究室においては、オートファジーには大きく二つの経路(通常型と新規)があることを以前に報告した。両経路においてタンパク質Ulk1が必須であることがわかっていたが、その制御機構は明らかになってなかった。本研究において、Ulk1タンパク質はセリンの746番目のリン酸化によって制御されることで、下流の二つのオートファジーへの分岐が調節されていることが明らかとなった。さらに、このリン酸化を目印に使うことで生体内での二つの経路を区別しその活性状態をモニタリングできるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは様々な生体現象や疾患にとって重要であることがわかっているが、その中で二種類のオートファジーが、どのように使い分けられているのかは、これまで不明だった。本研究は、その制御メカニズムを発見したもので、オートファジー研究に重要な知見を与えるものである。さらに、今回作製したUlk1の746番目セリンのリン酸化抗体を用いることにより、新規オートファジーを捕捉することが初めて可能となったことから、新規オートファジーに関する研究の今後の発展が期待でき、将来的にはオートファジー異常に関連した疾患治療のための医薬設計に指針を与える可能性がある。

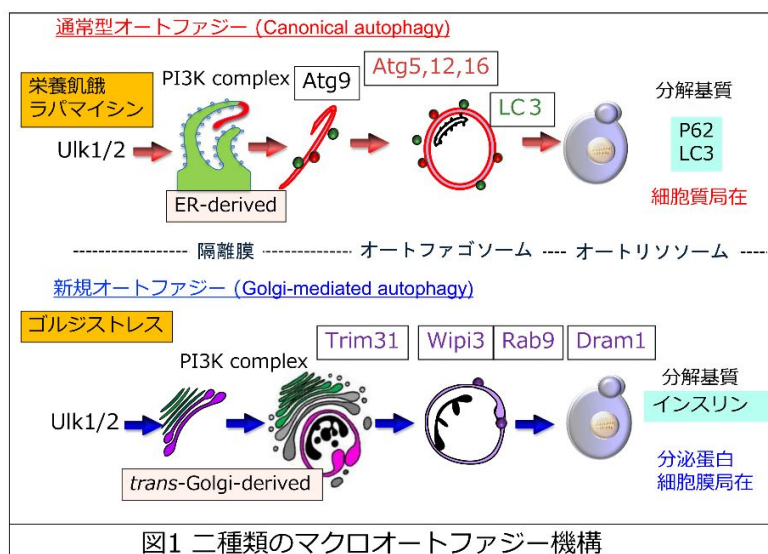
研究成果の概要(英文)：Autophagy is a catabolic process in which cellular contents, such as proteins, are degraded. In addition to canonical autophagy, my colleagues previously discovered alternative autophagy. Ulk1 is involved in both autophagic pathways. However, the detailed molecular mechanisms of Ulk1 regulation remains unclear. In this study, we find that Ulk1 is phosphorylated at Ser746 in the initiation of alternative autophagy, but not that of canonical autophagy. The activation of alternative autophagy in tissues can be observed by using anti-p-Ulk1746 antibody.

研究分野：細胞生物学(オートファジーと細胞死)

キーワード：オートファジー Ulk1 リン酸化 RIPK3

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、隔離膜と呼ばれる膜構造で細胞質成分を覆い、オートファゴソームと呼ばれる二重膜に取り囲んだ後に、オートリソソーム内でミトコンドリアなどの細胞小器官やタンパク質を分解する機構である。酵母を用いた解析によって多くのオートファジー関連タンパク質(Atg)が同定され(引用文献1)、オートファジーの初期応答には Atg1 や Atg5 の制御する共役機構が重要であることが見出されてきた(図1)。酵母 Atg1 の哺乳類ホモログとして Ulk1 および Ulk2 が同定されており、このタンパク質はリン酸化酵素(キナーゼ)として下流因子をリン酸化してオートファジーを促進することがわかっていた(図1)。Ulk1 はそれ自体リン酸化によって制御されており、申請者は以前に Ulk1 の脱リン酸化酵素(ホスファターゼ)として PPM1D/Wip1 を明らかにすることで Ulk1 の制御機構の一端を見出していた(引用文献2)。近年、所属研究室の研究によって、新規のオートファジーが発見された(引用文献3、図1)。この新規オートファジーは主に DNA 損傷によって誘導され Atg5 に依存せずに実行されるオートファジーである。新規オートファジーの実行分子の多くは、従来型オートファジーと異なっているが、Ulk1 に関しては共通に利用されている。ここで大きな疑問として (1)同じ Ulk1 というタンパク質を経由するにも関わらず、二種類のオートファジーをどのように選択して誘導(分岐)できるのか? (2)なぜ二種類のオートファジーがあるのか? 新規オートファジーの生理的、病理的意義は何か? という点が考えられる。



### 2. 研究の目的

(1)本研究では上記2点

の「問い」の回答を示すことが研究の目的である。

(2)問い(1)を解決する上でリン酸化に注目して研究を行う。今までの Ulk1 のリン酸化解析は従来型オートファジーへの正か負かの活性の変化、すなわち「ON/OFF」を見るだけのものではあった。一方、本研究は、従来型オートファジーと新規オートファジーを使い分ける「分岐器: ターンアウトスイッチ」としての役割を担うリン酸化を見出すものである。

(3)問い(2)を解決する上で、抗リン酸化抗体を作製し解析に用いる。新規オートファジーに特異的な Ulk1 リン酸化は、当然新規オートファジーのマーカーともなりうるため、この抗体を用いることで新規オートファジーの生理的な動向を可視的に解析することが可能となる。「ON/OFF」だけに注目した場合は見いだされなかったこのような発想はこれまでにないものであり、生理的、病理的意義の解明においてこの研究分野に新しいアイディアとブレイクスルーをもたらすと考える。

### 3. 研究の方法

(1)新規オートファジーに特異的な Ulk1 リン酸化部位の同定(2018年度)

野生型のマウス線維芽細胞(MEF)と従来型オートファジーが起きない Atg5KO MEF に DNA 損傷誘導試薬エトポシドを投与し、Ulk1 タンパク質を免疫沈降して濃縮後、サンプルを LC-MS/MS にかき、Ulk1 特異的な配列ペプチドからリン酸化部位を同定する。野生型と Atg5KO の結果を比較して新規オートファジーに特異的なリン酸化部位を選抜する。その際に既に見つかっている「ON/OFF」に関わるリン酸化、脱リン酸化は除外する。

### (2)リン酸化と新規オートファジーの関連：細胞生物学的解析(2018年度-2019年度)

(1)で同定したリン酸化部位に関してセリン等をアラニンに置換した非リン酸化型変異体(例:SA 変異体)もしくはセリン等をアスパラギン酸に変異したリン酸化模倣変異体(例:SD 変異体)を作製する。Atg5 と Ulk1 を共に無くした Atg5/Ulk1 ノックアウト MEF に上記の変異体をそれぞれ stable に発現する細胞株を作製する。この細胞株の新規オートファジー誘導能をオートリソソームの肥大化を指標にして解析する。周辺配列情報から Ulk1 の上流の酵素(キナーゼ or ホスファターゼ)を特定できる場合があるので、データベースを用い関連論文を参考にして特定する。予測が立った場合に、上流酵素と Ulk1 との直接の結合やキナーゼアッセイによる *in vitro* の酵素活性の解析を行う。さらにはその酵素の阻害剤やノックアウト MEF を用いることで新規オートファジーとの関連性を示す。

#### (3)-1 抗リン酸化抗体の使用とマーカーとしての有用性(2018年度-2019年度)

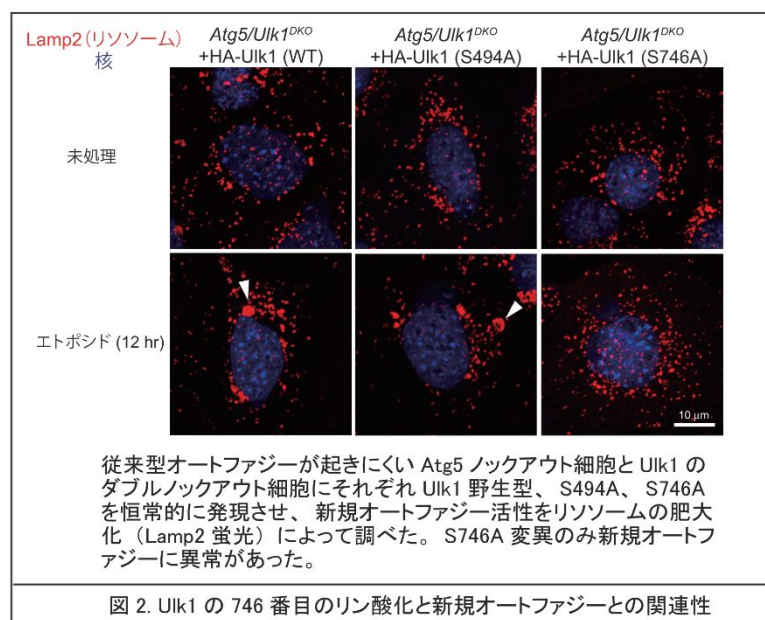
上記の細胞を用いた実験と並行して、抗リン酸化抗体の作製を逐次進める。抗リン酸化抗体ができ次第、ウェスタンブロットによるリン酸化の同定、細胞染色による解析を行う。さらに免疫電子顕微鏡法を用いて、詳細にどの構造物に局在するかを解析する。Ulk1/2 のノックアウト MEF もしくは SA 変異体等をネガティブコントロールとして偽陽性を排除し解析を行う。リン酸化のタイミング(無刺激、DNA 損傷誘導時等) 変異体実験での新規オートファジーへの必要性を吟味し、新規オートファジーマーカーとして使用できるか結論を出す。

#### (3)-2 新規オートファジーの生理的意義、病理学的影響の解明(2019年度-2020年度)

今までの新規オートファジーの解析には、Atg5 ノックアウトの状態にすることで従来型オートファジーを排除し、その際でも起こるオートファジーを解析するのが通例だった。しかし上記の抗リン酸化抗体を用いることで野生型のマウス組織でも新規オートファジーの誘導を可視化することが可能だと考えられる。野生型および Ulk1 ノックアウトマウスを用いて抗リン酸化抗体で各種組織での免疫組織化学を行い、新規オートファジーの実行部位を探る。さらにマウスに種々の DNA 損傷等のストレスを加えた上で同様の解析を行い、いかなるストレスに応じてどの細胞、組織で新規オートファジーが誘導されるかを明らかにする。

## 4. 研究成果

2018-2020 年度において、研究方法に沿って実験を



行った結果、(1)DNA 傷害(エトポシド処理)によって新規オートファジーを誘導した際のUlk1のリン酸化をMS/MS解析し、新規オートファジーに特異的なリン酸化として494番目セリンや746番目セリンなどを複数同定した。(2)そのリン酸化されるセリン部位をアラニン置換した変異体を恒常的に発現したAtg5/Ulk1ノックアウト細胞株を作製し、オートリソソームの肥大化を指標にして新規オートファジーへの影響を調べた。その結果、746番目のセリンのリン酸化が新規オートファジー誘導に必須であることを見出した(図2)。(3)同定したリン酸化セリンを認識する抗リン酸化抗体を作製した。この抗体は細胞染色及び免疫沈降実験において十分な結果を得ることができ、解析の結果からリン酸化Ulk1はゴルジ体に特異的に局在することがわかった(図3、4)。(4)このリン酸化のキナーゼを同定する上でリン酸化セリンの周辺配列に着目した。その結果、ネクロプトーシス誘導因子のRIPK3がキナーゼであることがわかり(図5)、DNA傷害依存的な新規オートファジーにはRIPK3が必須であることを見出した(図6)。さらにRIPK3はネクロプトーシス経路とは独立して、新規オートファジーに関与することがわかった

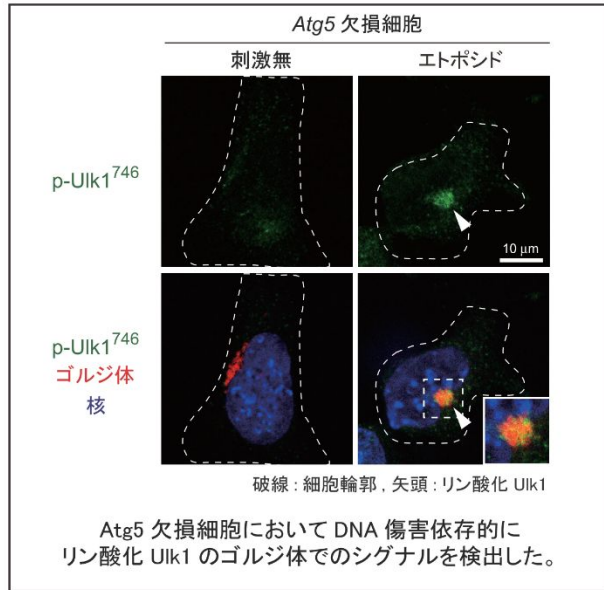
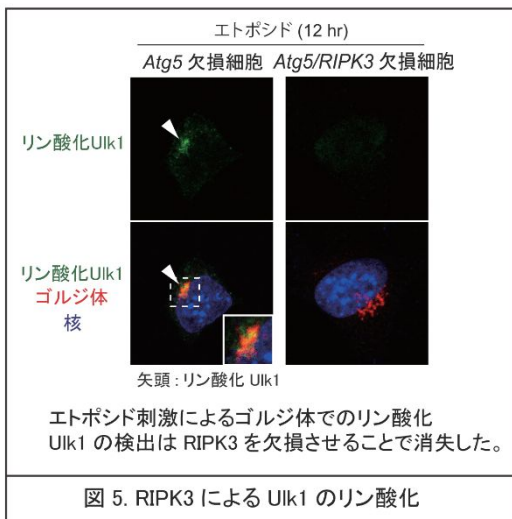


図 3. Ulk1 の 746 番目のセリン残基のリン酸化とゴルジ体での局在

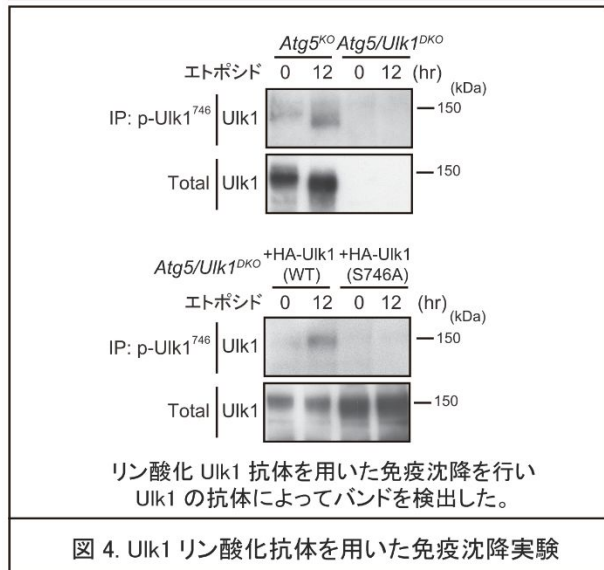


図 4. Ulk1 リン酸化抗体を用いた免疫沈降実験

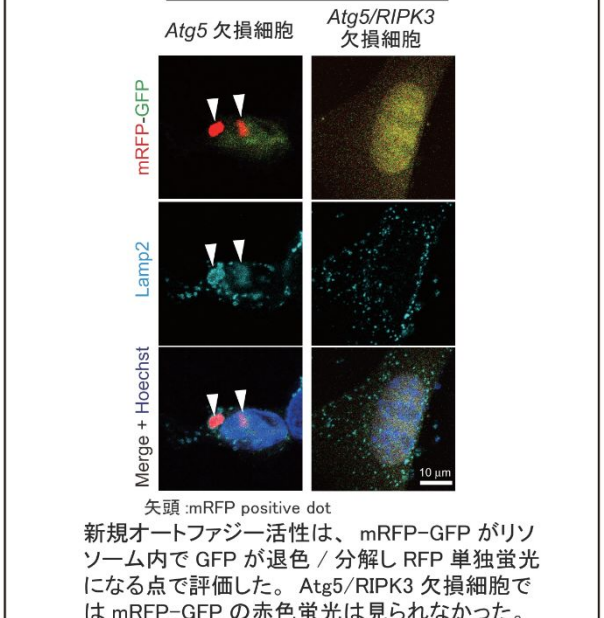
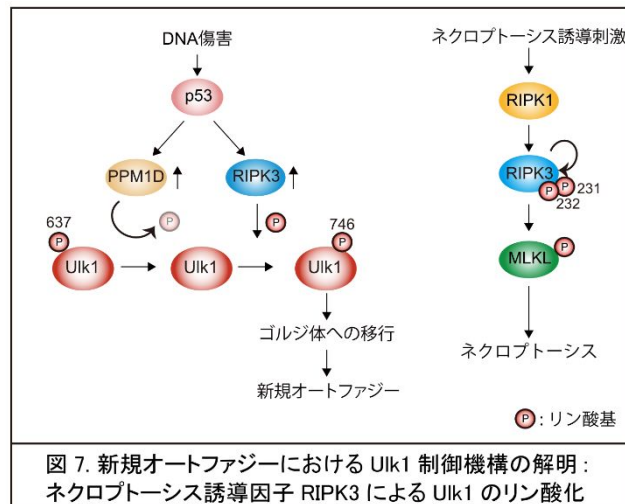


図 6. 新規オートファジー活性へのRIPK3の関与

(図7)。この実験の過程で、新規オートファジーの新たな基質としてインテグリン 5 を同定した。これらの研究結果をまとめた論文は *Nature Communications* に 2020 年 3 月に受理され、4 月にオンラインにて公開された(引用文献 4)。成果報告段階までの 1 年間で引用数も 15 件されており(引用文献 5 等) 国内外で高く評価されている。

2020 年度は、さらに新規オートファジーの生理的意義、病理学的影響の解明に関して解析を進めた。今までの新規オートファジーの解析には、上記細胞の実験でも見られるように、Atg5 ノックアウトの状態にすることで従来型オートファジーを排除し、その際でも起こるオートファジーを解析するのが通例だった。そこで、上記の抗リン酸化抗体を用いることで野生型

のマウス組織でも新規オートファジーの誘導を可視化することができるか解析した。抗リン酸化抗体で各種組織での免疫組織化学を行った結果、24 週齢のマウスにおいて、ストレスに弱い胸腺細胞での Uik1 のリン酸化のシグナルを検出した。このことからこの抗リン酸化抗体が組織中での新規オートファジー誘導のマーカーとして有用であることが示唆された。この抗体染色は新規オートファジーのマーカーとして使用できる可能性が見出された。



#### <引用文献>

- (1) Mizushima *et al.* The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107-132 (2011).
- (2) Torii S<sup>\*</sup>, Yoshida T<sup>\*</sup>, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. Identification of PPM1D as an essential Uik1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO Reports*, 17, 1552-1564 (2016). (\*equal contribution)
- (3) Nishida, Y *et al.*, Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, 461, 654-658 (2009).
- (4) Torii S<sup>\*\*</sup>, Yamaguchi H, Nakanishi A, Arakawa S, Honda S, Moriwaki K, Nakano H, Shimizu S<sup>\*\*</sup>. Identification of a phosphorylation site on Uik1 required for genotoxic stress-induced alternative autophagy. *Nature Communications*, 11, 1754 (2020). (\*\*Corresponding author)
- (5) Licheva *et al.* Phosphoregulation of the autophagy machinery by kinases and phosphatases. *Autophagy*, in press (2021). DOI: 10.1080/15548627.2021.1909407

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sato Shigeto, Noda Sachiko, Torii Satoru, Amo Taku, Ikeda Aya, Funayama Manabu, Yamaguchi Junji, Fukuda Takahiro, Kondo Hiromi, Tada Norihiro, Arakawa Satoko, Watanabe Masahiko, Uchiyama Yasuo, Shimizu Shigeomi, Hattori Nobutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Homeostatic p62 levels and inclusion body formation in CHCHD2 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab057	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 Klionsky Daniel J, ...many authors..., Torii Satoru, ...many authors..., and Tong Chun-Kit	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	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 Yamaguchi Hirofumi, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Kimiko, Katoh Kaoru, Miyake Koichi, Miyake Noriko, Fujikake Nobuhiro, Sakurai Hajime Tajima, Arakawa Satoko, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18892-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Torii Satoru, Honda Shinya, Murohashi Michiko, Yamaguchi Hirofumi, Shimizu Shigeomi	4. 巻 111
2. 論文標題 Autophagy involvement in oncogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3993~3999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14646	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 Torii Satoru, Shimizu Shigeomi	4. 巻 16
2. 論文標題 Involvement of phosphorylation of ULK1 in alternative autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1532 ~ 1533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1776476	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 Torii Satoru, Yamaguchi Hirofumi, Nakanishi Akira, Arakawa Satoko, Honda Shinya, Moriwaki Kenta, Nakano Hiroyasu, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a phosphorylation site on Ulk1 required for genotoxic stress-induced alternative autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15577-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato H, Okabe K, Miyake M, Hattori K, Fukaya T, Tanimoto K, Beini S, Mizuguchi M, Torii S, Arakawa S, Ono M, Saito Y, Sugiyama T, Funatsu T, Sato K, Shimizu S, Oyadomari S, Ichijo H, Kadowaki H, Nishitoh H.	4. 巻 3
2. 論文標題 ER-resident sensor PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life science alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Torii S, Kasai S, Yoshida T, Yasumoto KI, Shimizu S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase Parkin: Relationships with Other Causal Proteins in Familial Parkinson's Disease and Its Substrate-Involved Mouse Experimental Models.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21041202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otsubo K, Maeyashiki C, Nibe Y, Tamura A, Aonuma E, Matsuda H, Kobayashi M, Onizawa M, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Torii S, Itakura E, Watanabe M, Oshima S.	4. 巻 594
2. 論文標題 Receptor-Interacting Protein Kinase 3 (RIPK3) inhibits autophagic flux during necroptosis in intestinal epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS letters	6. 最初と最後の頁 1586-1595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13748	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 Honda S, Arakawa S, Yamaguchi H, Torii S, Tajima Sakurai H, Tsujioka M, Murohashi M, Shimizu S.	4. 巻 432
2. 論文標題 Association Between Atg5-independent Alternative Autophagy and Neurodegenerative Diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of molecular biology	6. 最初と最後の頁 2622-2632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.01.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Muraoka Naoto, Nara Kaori, Tamura Fumiya, Kojima Hidenori, Yamakawa Hiroyuki, Sadahiro Taketaro, Miyamoto Kazutaka, Isomi Mari, Haginiwa Sho, Tani Hidenori, Kurotsu Shota, Osakabe Rina, Torii Satoru, Shimizu Shigeomi, Okano Hideyuki, Sugimoto Yukihiro, Fukuda Keiichi, Ieda Masaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08626-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 鳥居暁, 山口啓史, 中西啓, 荒川聡子, 本田真也, 森脇健太, 中野裕康, 清水重臣.
2. 発表標題 新規オートファジーに必須なULK1のリン酸化とネクロトーシス実行因子RIPK3の関与.
3. 学会等名 第1回細胞死コロキウム (招待講演)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Torii S, Yamaguchi H, Nakanishi A, Arakawa S, Honda S, Moriwaki K, Nakano H, and Shimizu S.
2. 発表標題 Regulation of phosphorylation of Ulk1 in alternative autophagy.
3. 学会等名 The 15th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥居暁, 山口啓史, 中西啓, 荒川聡子, 本田真也, 森脇健太, 中野裕康, 清水重臣.
2. 発表標題 RIPK3によるDNA傷害依存的な新規オートファジーの制御.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S and Shimizu S.
2. 発表標題 The role of PPM1D in regulating DNA damage-induced autophagy.
3. 学会等名 Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥居暁, 吉田達士, 荒川聡子, 本田真也, 清水重臣.
2. 発表標題 オートファジーによるDNA傷害誘導性アポトーシスの制御
3. 学会等名 第27回日本Cell death学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S and Shimizu S.
2. 発表標題 Regulation of DNA damage-induced apoptosis by autophagy.
3. 学会等名 Australia-Japan Meeting on Cell Death. (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------