

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14641

研究課題名(和文)哺乳類オートファジーの始動を制御するULK複合体の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of the ULK complex that regulates mammalian autophagy initiation.

研究代表者

鈴木 浩典(SUZUKI, Hironori)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：20625694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーに関わるタンパク質群の多くは、出芽酵母からヒトに至る真核生物において広く保存されている。しかし、一部は高等真核生物に固有の因子であり、高等真核生物のオートファジーを理解するためには、それらの詳細な構造機能解析が必須となる。本研究では固有の因子の一つであるFIP200に注目し、ULK複合体としてオートファジーの始動に関わる各因子(ULK1, Atg13, Atg101)との相互作用解析を行った。Atg101を除く3者は互いに相互作用して複合体を形成することが明らかとなった。その相互作用様式は出芽酵母のホモログと類似点がある一方で、高等真核生物に特有のものもあることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学研究は生体構成の単純なモデル生物を利用して、その作動原理や機能を解明することが多いが、一方でそれは必ずしもヒトなどの高等生物にそのまま当てはめることができない。オートファジーはモデル生物として出芽酵母を用いてその基本的な作動原理の多くが解明されてきたが、本研究はヒトのタンパク質を用いて実施した研究であり、得られた知見も出芽酵母とは似て非なる部分もあった。そのため、ヒトなどの高等生物のオートファジーの理解や、オートファジーに関わる疾患の解明やその治療薬開発の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Many proteins involved in autophagy are widely conserved in eukaryotes from budding yeast to humans. However, some of the proteins are unique to higher eukaryotes such as humans. Analysis of the structure and function of these proteins are essential to understand autophagy in higher eukaryotes.

In this study, I focused on FIP200, which is one of the factors unique to higher eukaryotes. Moreover, I analyzed the interaction of FIP200 with each factor of ULK complex, ULK1, Atg13 and Atg101, involved in autophagy initiation in higher eukaryotes. I found that Atg101 interacted only with Atg13, while the other three interacted with each other to form ULK complex. The mode of interaction of the three proteins in higher eukaryotes had some similarities with budding yeast homologues, while some specificity to higher eukaryotes.

研究分野：構造生物化学

キーワード：オートファジー X線結晶構造解析 分子間相互作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マクロオートファジー(以後、オートファジー)は真核生物に広く保存された基本的な細胞内分解システムである。オートファジーは多様な生理的機能を担っており、その異常により癌や神経変性疾患、感染症、代謝性疾患など重篤な疾患が引き起こされる。出芽酵母を用いて、これまでに多数の Atg 蛋白質が同定された。その多くはヒトなどの高等生物でも保存されている。哺乳類におけるオートファジーは以下の様な過程で進行する。まず、細胞質中の小胞体近傍の Autophagosome formation site に Atg 蛋白質群が集積する。続いて、この部分から隔離膜が出現し、湾曲伸長しながら被分解物を取り囲む。形成された二重膜構造体はオートファゴソームと呼ばれる。その後、オートファゴソームの外膜はリソソームと融合し、内膜ごとリソソーム内の加水分解酵素によって分解される。この過程に関わる分子群は複合体形成能や遺伝学的な解析から、ULK 複合体、Phosphatidylinositol 3 キナーゼ(PI3K)複合体、Atg9、Atg2- WIPI 複合体、Atg12-5-16L1 結合系、LC3-PE (phosphatidylethanolamine)結合系の 6 つのグループに分けることができる。このうちコピキチン様の Atg12-Atg5-Atg16L1 結合系、LC3 (Atg8)-PE 結合系の各因子においては、酵母の因子とともにヒトの因子でも構造解析・機能解析が進められ、よく理解が進んでいる。しかしながら、それ以外の Atg 蛋白質群については実際にそれらがどのように機能してオートファゴソーム形成に関わっているのか未解明な部分が多い。また高等生物に特有の因子も存在することから、出芽酵母とヒトなどの高等生物とでオートファジーの過程が異なる可能性が考えられる。オートファジーという複雑な膜動態を伴う現象の分子機構を解明、およびオートファジーが関与する疾患を理解するためには、これらの因子、特に高等生物に固有のものについての構造機能解析が強く求められる。

### 2. 研究の目的

出芽酵母においては Atg1 複合体(Atg1-13-17-29-31)がオートファジーの起点となるが、高等生物においては ULK 複合体であり、これは 4 つの因子 ULK1/2(Atg1 のホモログ)、Atg13、FIP200 (Atg17 の機能類縁体)、Atg101 で構成される。FIP200 と Atg101 は高等生物に特有の因子であり、出芽酵母とそれ以外の生物とでオートファジーの開始機構が異なることが予想され、これらについての構造機能解析が高等生物のオートファジー指導の理解に必要である。Atg101 については研究代表者らによって全体構造と機能の一端が明らかとなっていたため (Suzuki *et al.*, 2015), 本研究ではもう一つの特有な因子である FIP200 の構造を明らかにするとともに、ULK1 や Atg13、Atg101 も含めた 4 者複合体での全体像の把握と機能解析を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) タンパク質の調製

##### 【FIP200】

全長体の発現を昆虫細胞発現系により行った。発現および精製の過程で分解物が生じることが明らかとなったため、FIP200 分子を N 末端が和知 C 末端側に分け、発現コンストラクトの検討を行った。

##### 【ULK1】

全長体の発現を昆虫細胞発現系で行うとともに、Atg13 との相互作用に関与するとされる C 末端側のドメインのみの調製を大腸菌発現系または昆虫細胞発現系で行った。溶解度の向上や精製を簡便に行うためマルトース結合タンパク質 (MBP) を付加しての発現も検討した。

##### 【Atg13】

全長体の発現を大腸菌発現系により行った。ただし、すでに明らかとなっている Atg101 との結合が見られなかったため、適切な立体構造を保持していないと考えられた。そのため、昆虫細胞発現系でも試料調製を行った。Atg13 の C 末端側の天然変性領域 (IDR) は FIP200 や ULK1 との相互作用に重要であることから、領域を区切ったコンストラクトを GST 融合タンパク質として大腸菌発現系により調製した。

#### (2) 調製サンプルの性状解析と結晶化スクリーニング

(1)の発現サンプルはいずれもゲル濾過クロマトグラフィーにて単一のピークとなるまで精製を行った。それらの試料は動的光散乱法 (DLS) により単分散であるか否かを調査するとともに、CD スペクトル測定により二次構造情報を取得し、結晶化妥当性の評価をした。その上で、結晶化スクリーニングを実施した。スクリーニングは sitting drop 蒸気拡散法により 20°C で行った。結晶化剤として市販のスクリーニングキットを用いた。

#### (3) タンパク質間相互作用の解析

(1)および(2)を完了したサンプルを用い、pull-down アッセイにより相互作用領域を決定した。相互作用領域が限定されたら、等温滴定カロリーメトリー (ITC) によって、その結合定数を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) タンパク質の調製と性状解析

#### 【FIP200】

ヒト FIP200 の全長は 1594 アミノ酸残基からなる。全長体は一部切断を受けることから、背う段が予想される領域をトリミングした試料 (FIP200FLmimic) を調製した。併せて、N 末端側 (アミノ酸残基 1-624) と C 末端側 (アミノ酸残基 838-1594) に分割した試料も調製した。これらは DLS による性状解析と CD スペクトルによる二次構造解析を行った (図 1)。DLS から、それぞれの分子サイズは 58.3 nm, 26.4 nm, 30.4 nm であった。CD スペクトルから  $\alpha$ -helix に富んだ構造であることがわかった。アミノ酸配列から計算される分子量と併せて考えると、分子全体が細長い構造をしていることが予想された。

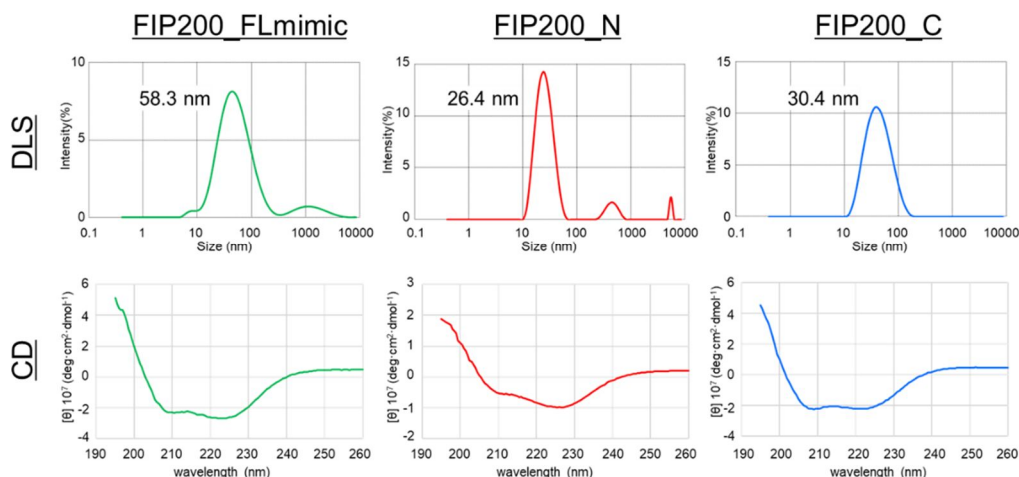


図 1. FIP200 の調製と性状解析

#### 【ULK1】

ヒト ULK1 の全長は 1051 アミノ酸残基からなる。種々の方法で全長体の発現を試みたが、調製はできなかった。そこで、C 末端側 (アミノ酸残基 834-1051) のみを調製することとした (ULK1\_C)。ただし、C 末端側ドメイン単独では試料が凝集してしまうため、MBP 融合タンパク質 (MBP-ULK1\_C) として調製するか、あるいは結合相手である Atg13 と共発現して調製する必要があることが明らかとなった。

#### 【Atg13】

ヒト Atg13 の全長は 517 アミノ酸残基からなる。N 末端側 (アミノ酸残基 1-190) は HORMA ドメインと呼ばれ、Atg101 との相互作用に関わる。大腸菌で発現した試料は SDS-PAGE で全長体ではあるものの、Atg101 との相互作用を検出できなかった。すなわち、HORMA ドメインが適切な立体構造を保持していないことが考えられた。この点を回避するため、昆虫細胞で発現した全長 Atg13 を準備した。当該試料は Atg101 と結合することが可能であり、適切な立体構造を保持していると考えられた。

#### 【Atg101】

大腸菌で調製した試料で結晶構造が報告されているため、試料調製は容易であったが、前述のその他の試料が昆虫細胞での発現が必須であり、特に相互作用相手である Atg13 の安定化のためには共発現が必要であるため、昆虫細胞での発現系を利用して調製することとした。

### (2) タンパク質間相互作用の解析

Atg101 と Atg13 の相互作用領域を除いて、4 者の相互作用関係および相互作用領域が十分に同定されていなかったため、pull-down アッセイおよび ITC により解析を行った。

#### 【Atg13 と ULK1】

Atg13 は前述の通り、517 アミノ酸残基からなり、その C 末端側は IDR である。また、ULK1 は出芽酵母 Atg1 のホモログである。出芽酵母においては、Atg13 の IDR と Atg1 の C 末端側ドメインが相互作用することが明らかとなっている。ヒト Atg13 と ULK1 においても、Atg13 の IDR と ULK1\_C が相互作用することが考えられた。Atg13 の IDR を断片化し、どの領域が ULK1\_C と相互作用するか否かを検討したところ、最も C 末端側 (アミノ酸残基 490-517) の領域が重要であることが明らかとなった (図 2)。ITC を用いて、Atg13\_490-517 と MBP-ULK1\_C の結合定数を決定したところ、およそ 60 nM であった。

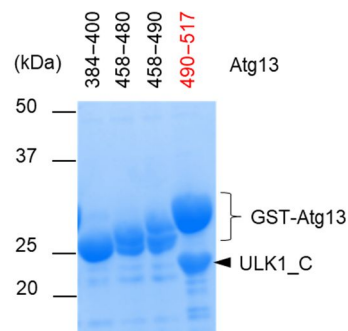


図 2. Atg13 と ULK1 の相互作用

#### 【FIP200 と Atg13】

FIP200 は巨大なタンパク質であるが、その N 末端側は出芽酵母の Atg17 のホモログであるとされる。出芽酵母では Atg13 が IDR 上の 2 箇所（384-410 および 436-457）で Atg17 と相互作用する。ヒトのホモログタンパク質でどのようになるか検証した。FIP200 は C 末端側ではなく、Atg17 ホモログである N 末端側で Atg13 と相互作用することが明らかとなった（図 3A）。さらに領域を絞っていくと、Atg13 の 368-400 および 436-457 の 2 箇所が FIP200 の N 末端側との相互作用に重要であり、まさに出芽酵母の場合と同様の相互作用様式であることが示唆された（図 3B）。結合定数を決定するため、それぞれの領域のペプチドを調製したが、368-400 の領域はペプチドが会合してしまい、ITC 測定を行うことができなかった。436-457 の領域はペプチドとして調製可能であり、ITC 測定を実施したところ、FIP200 の N 末端側との結合定数はおよそ 20 nM であった。また、FIP200 の N 末端側とは、490-517 領域（ULK1 との相互作用領域）は結合しない。

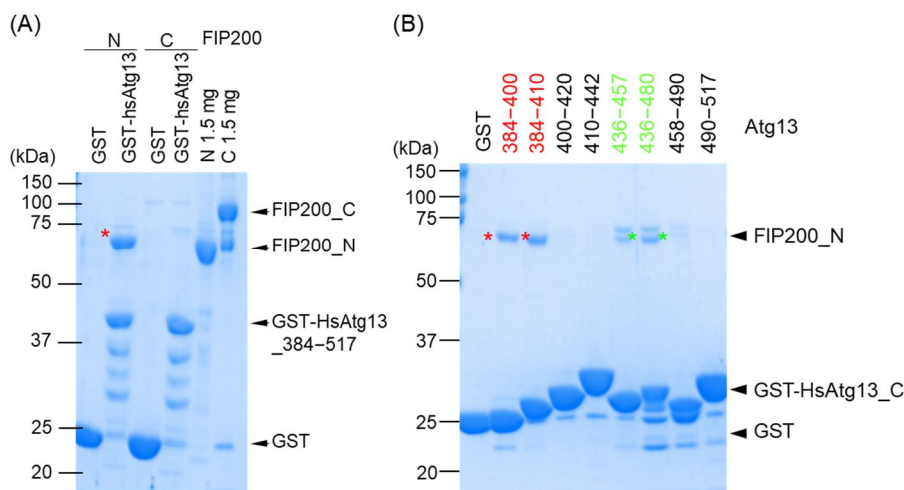


図 3. FIP200 と Atg13 の相互作用

#### 【FIP200 と ULK1】

前述したように FIP200 と ULK1 はそれぞれ出芽酵母の Atg17 と Atg1 のホモログとされる。出芽酵母においては両者の相互作用は報告されていない。他方、哺乳類では細胞内で FIP200 と ULK1 が直接相互作用することが報告されている（Ganley *et al.*, 2009）。この点について *in vitro* で検討した。ULK1\_C は単体では凝集してしまうことから、Atg13 の C 末端（458-517 領域または 490-517 領域）と共発現し、複合体を形成した試料を用いた。前述したように FIP200\_N と Atg13 の当該領域は直接相互作用しない（図 3B）。他方、ULK1\_C と Atg13 を共発現させた試料では FIP200\_N との相互作用が確認できた（図 4）。

#### (3) 結晶化スクリーニング

相互作用解析で使用した試料を用いて、結晶化スクリーニングを行ったが、いずれも良質な結晶は得られなかった。FIP200 に関しては、その分子形状が細長いことが予想され、特に分子の長軸方向での分子間接触が限定されるため、結晶成長が進みにくいことが一因であると考えられた。ULK1\_C は、単体の性状が悪いこと、それを回避するために MBP 融合タンパク質としたが、その場合には溶解度が上がりすぎてしまうことが要因となって結晶が得られにくくなっているものと考えられた。また、これらの分子形状や性状と併せて、複合体とした場合にはその結合が安定なものではない（強い結合ではない）ため、安定な複合体としての存在比率が相対的に低く、その結果として結晶が得られなかったと考えられた。

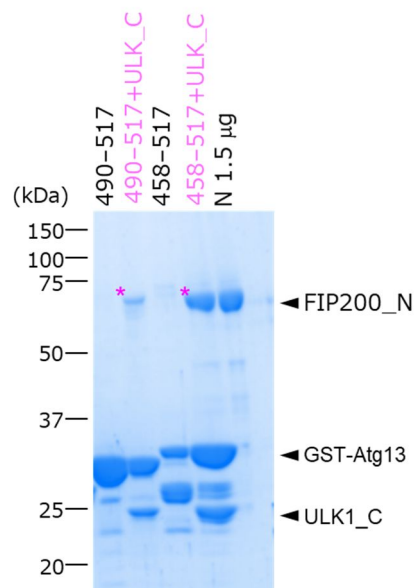


図 4. FIP200 と ULK1 の相互作用

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masataka Ito, Hironori Suzuki, Shuji Noguchi	4. 巻 20
2. 論文標題 Chlorine K-edge X-ray absorption near-edge structure discrimination of crystalline solvates and salts in organic molecules.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Crystal Growth and Design	6. 最初と最後の頁 4892-4897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.cgd.0c00790	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 Masataka Ito, Rika Shiba, Hironori Suzuki, Shuji Noguchi	4. 巻 109
2. 論文標題 1.Chlorine K-edge X-ray absorption near-edge structure analysis of clarithromycin hydrochloride metastable crystal.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Science	6. 最初と最後の頁 2095-2099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2020.03.015	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 Masaya Ymaguchi, Kenji Satoo, Hironori Suzuki, Yuko Fujioka, Yoshinori Ohsumi, Fuyuhiko Inagaki, Nobuo N. Noda	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.2018.03.013	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29件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本隆矢, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 ホスラブコナゾール-L-リシン エタノール溶媒和物の脱溶媒機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黄珍妃, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 塩酸プロムヘキシシ多形のX線吸収微細構造分析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤雅隆, 丸山紗季, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 オルメサルタンメドキシミルの結晶構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木浩典, 岩田萌美, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 X線吸収端近傍構造スペクトル測定によるインドメタシン結晶多形の判別と固体分散体中の結晶状態の評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井出村泰明, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 ペミロラストカリウムの多成分結晶化による水和物転移の抑制
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村祐子, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 アルベンダゾールの共結晶調製による溶解性改善
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤雅隆, 渡辺竜矢, 鈴木浩典, 寺田勝英, 野口修治
2. 発表標題 共結晶化によるイソソルピドの潮解性改善および吸湿機構の解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 我妻杏美, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 スプレードライヤーを用いた医薬品原薬の苦味マスキング
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田邊優衣, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 X線吸収端近傍構造解析によるファモチジンとその共結晶の性状解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大桑星, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 共結晶化によるピリドスチグミン臭化物の潮解性改善
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木航, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 カルメロース類を用いた苦味マスキングの検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松島将仁, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 シメチジン結晶多形のX線吸収端近傍微細構造解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Huang Zhenni, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 Evaluation of the crystal polymorphs of bromhexine hydrochloride by X-ray absorption fine structure spectroscopy
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 太田寧々, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 X線吸収端近傍構造スペクトル解析によるクロピドグレル結晶多形の評価
3. 学会等名 日本薬学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 我妻杏美, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 スプレードライヤーを用いた医薬品原薬の苦味マスキング
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤雅隆, 渡辺竜矢, 鈴木浩典, 寺田勝英, 野口修治
2. 発表標題 共結晶化によるイソソルピドの潮解性改善および吸湿機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田寧々, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 チエノピリジン系医薬品結晶多形のX線吸収端近傍構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松島将仁, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 X線吸収端近傍微細構造解析によるシメチジン結晶多形の評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村祐子, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 共結晶化によるアルベンダゾールの溶解性改善
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井出村泰明, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 ペミロラストカリウムの多成分結晶化による潮解性改善
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Huang Zhenni, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 XAFSによるプロムヘキシリン塩酸塩の結晶多形の評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井出良汰, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 スプレードライヤーを用いた医薬品原薬の苦味マスキング
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤雅隆, 坂本知昭, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 テラヘルツ分光法を用いたインジナピル硫酸塩溶媒和物の脱溶媒挙動解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木浩典, 岩田萌美, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 X線吸収端近傍構造スペクトル測定によるClまたはS含有医薬品原薬結晶多形の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺竜矢, 小柳佑士郎, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 寺田勝英, 野口修治
2. 発表標題 共結晶化によるイソソルピドの吸湿性改善と吸湿機構の解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺竜矢, 小柳佑士郎, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 寺田勝英, 野口修治
2. 発表標題 イソソルビドの共結晶化による吸湿性改善
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中水慧, 伊藤雅隆, 坂本知昭, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 テラヘルツ分光法を用いたモデル錠剤中の原薬の定量
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田萌美, 鈴木浩典, 伊藤雅隆, 野口修治
2. 発表標題 Cl含有医薬品原薬結晶および固体分散体のX線吸収端近傍構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田明日美, 伊藤雅隆, 鈴木浩典, 野口修治
2. 発表標題 XAFSを用いたエレトリプタン臭化水素酸塩の結晶多形の評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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
---------	---------