

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06567

研究課題名（和文）液-液相分離によるオートファジー関連結合反応の制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of autophagy-related binding reactions by liquid-liquid phase separation

研究代表者

藤岡 優子 (Fujioka, Yuko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：80399964

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）：オートファジーの始動はPASが担っている。ユビキチン様タンパク質Atg8は、ユビキチン結合系に類似した酵素反応でホスファチジルエタノールアミンと可逆的に結合し、オートファジーの膜伸長に直接関わる重要な分子であるが、その意義についてはこれまでわかっていなかった。本研究では新たに液-液相分離の視点を導入することで、細胞内におけるAtg8結合反応系の真の制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では従来型の酵素学的研究のみ行われてきたオートファジー結合系に液-液相分離の概念を導入することで、これまでとは全く異なる視点からの研究が展開された。このような視点に基づいた研究は先進的であり、オートファジーのメカニズム解明に革新をもたらしたばかりでなく、今後は液-液相分離による細胞内反応制御という細胞生物学における新しい切り口の研究領域の創成にも貢献していくものと考えられる。

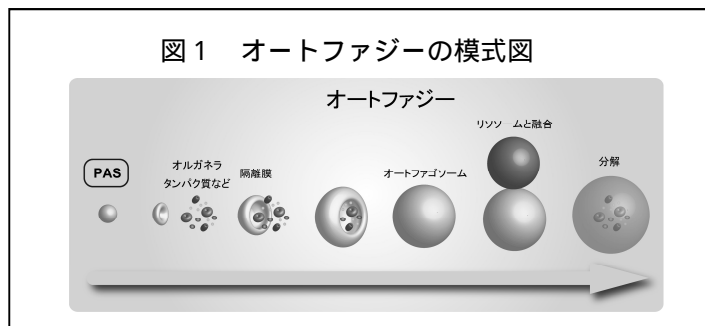
研究成果の概要（英文）：PAS is responsible for initiating autophagy. The ubiquitin-like protein Atg8 is reversibly conjugated with phosphatidylethanolamine in an enzymatic reaction similar to the ubiquitin-binding system and is an important molecule directly involved in membrane elongation during autophagy. However, its precise role in autophagy has not yet been elucidated. By introducing a new perspective of liquid-liquid phase separation, this study revealed the mechanism of the actual regulation of the Atg8-conjugation reaction system in the cell.

研究分野：生化学

キーワード：オートファジー

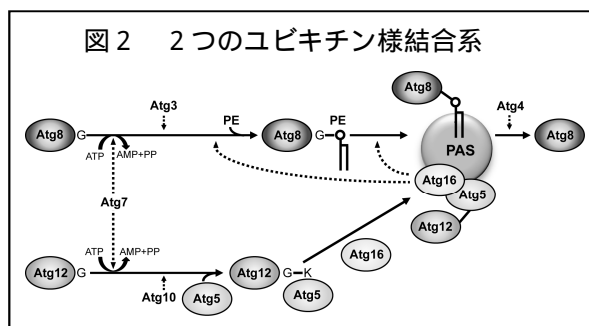
1. 研究開始当初の背景

細胞内のタンパク質やオルガネラが適切に分解されることは、細胞が正常に機能するために重要である。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/液泡に輸送し、分解する現象である。オートファジーが飢餓などで誘導されると、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(図1)。出芽酵母では飢餓条件下、約20種類あるAtg(AuTophagy)タンパク質の殆どが液泡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が、そのメカニズムは依然として謎に包まれている。Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31の5つのタンパク質からなるAtg1複合体は、それぞれの因子が数十コピーからなる高次の多量体を形成することでPASの足場を形成し、オートファジーの始動に働く。研究代表者らはこれまでに、天然変性タンパク質であるAtg13がAtg17同士を架橋することでAtg1複合体の高次会合を引き起こすこと、それがPAS構築およびオートファジー始動に重要であることを明らかにした(Dev. Cell, 2016)。さらに研究代表者らはAtg1複合体が試験管内において液-液相分離を引き起こし、球状の会合体(液滴)を形成すること、酵母におけるPASも液滴の性質を持つことを見出した(Nature, 2020)。細胞内には核小体やストレス顆粒など、膜のないオルガネラが多数存在しており、それらは天然変性タンパク質や核酸などが液-液相分離することで形成される。膜のないオルガネラの特徴として、必要な時に現われ、不要になると消失するようなダイナミックな動態を示すこと、周囲との速い分子交換や高い内部流動性などの液体の性質を持つことが知られている。すなわちPASは膜のないオルガネラの一つであると考えられた。

Atg1複合体がPASの足場を形成したのち、下流Atg因子がPAS局在することでオートファゴソーム形成が進行する。ユビキチン様タンパク質であるAtg8とAtg12は共通の活性化酵素(E1)であるAtg7により活性化されたのち、結合酵素(E2)であるAtg3とAtg10にそれぞれ受け渡され、最終的にはAtg8-PE(phosphatidylethanolamine)結合体とAtg12-Atg5結合体を形成する(図2)。



これら結合体はPASおよび伸張中の隔離膜上に局在し、オートファゴソーム形成に働く。Atg12-Atg5結合体は細胞質で恒常的に形成されるのに対し、Atg8-PE結合体は飢餓時にのみ大量に形成されることが知られており、それがオートファゴソーム形成に重要である。すなわち後者には飢餓時に反応を亢進させるメカニズムが存在すると思われる。研究代表者らはこれまで、2つの結合系についてX線結晶構造解析とin vitroでの結合反応再構成系という手法を用いて研究を行ない、これら因子群の立体構造と特異的な結合反応のメカニズム解明を進めてきた。その過程で、in vitroではAtg7はAtg8をその特異的E2酵素であるAtg3だけでなく、Atg12のE2酵素であるAtg10へも効率的に受け渡してしまうこと、その結果Atg8はAtg5と結合体を形成してしまうことに気がついた(Nat. Struct. Mol. Biol., 2012)。同様にin vitroではAtg7はAtg12をAtg10だけでなくAtg3にも受け渡してしまう。一方で細胞内ではAtg8はPEに、Atg12はAtg5に厳密にコントロールされて結合することから、in vitroの系には何か重要な要素が欠けていると思われる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が最近見出した『PASは足場複合体が液-液相分離することで形成された膜のないオルガネラである』という知見を発展させ、液滴状PASとPASに局在する下流Atgタンパク質群との関連性の解析を通して、これまでとは異なる新しい見方からPASの機能を捉え直すことである。2つのAtg結合系は、オートファジー関連膜のマーカーとしての有用性からオートファジー研究の黎明期から注目されてきたものの、その反応制御や分子機能に関して深い理解がなされぬまま現在に至る。本研究を遂行することによって、長らく不明であった詳細な制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、液滴である PAS が Atg 結合反応に果たす役割を明らかにするため、in vitro における再構成実験を行うとともに、得られた知見を出芽酵母を用いた in vivo 実験により検証する。

(1) in vitro 再構成実験

精製した Atg1 複合体 を in vitro で液-液相分離させることで Atg1 複合体液滴を作製し、PAS 液滴のモデルとして用いる。そして蛍光標識した 2 つの結合系の構成タンパク質を順次添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて液滴に対する各因子の局在を定量的に調べる。さらに様々な組み合わせで結合系の因子を液滴に導入し、因子間相互作用が局在に与える影響を解析する。次に Atg8 結合系の因子群 (PE としてリポソームも含める) Atg12 結合系の因子群、あるいはその両方を ATP と混合することで、Atg8-PE 結合反応と Atg12-Atg5 結合反応を in vitro 再構成し、それに対する Atg1 複合体液滴添加の影響を解析する。

(2) in vivo 実験

(1) で得られた知見について、出芽酵母を用いた変異体実験により検証する。

4. 研究成果

精製した Atg1 複合体 を in vitro で液-液相分離させることで Atg1 複合体液滴を作製し、PAS 液滴のモデルとして用いた。まず、Atg8-PE を形成するために必要な 2 つのコピキチン様結合系を構成するタンパク質群 (Atg7、Atg3、Atg8、Atg10、Atg12-Atg5-Atg16 複合体) を蛍光標識したうえで、PAS 液滴にそれぞれ添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて液滴に対する各因子の局在および浸潤度を定量的に調べた。その結果、Atg8 や Atg12-Atg5-Atg16 複合体が速やかに液滴内に浸潤する一方で、当初の予想に反してそれ以外の因子は液滴内に浸潤しづらいことが明らかになった。この結果から、PAS 液滴が Atg8 脂質化反応の反応場として働くことが強く示唆された。そこで、結合系の因子群 (PE としてリポソームも含める) を ATP と混合することで、Atg8-PE 結合反応を in vitro 再構成し、それに対する PAS 液滴添加の影響を解析した。その結果、PAS 液滴存在下で、Atg8-PE 形成が促進されることが明らかとなった。

一方、Atg8 結合系によって形成される脂質化 Atg8 は、細胞膜をはじめとする PAS ではない場所で形成されると、Atg4 という脱脂質化酵素によって速やかに脱脂質化されることが知られていた。そこで研究代表者らは Atg4 の制御因子を長らく探索してきたが、これまでその因子を同定できていなかった。本研究において液滴存在下で in vitro の Atg8 脱脂質化実験を行ったところ、液滴が存在すると Atg8 の脱脂質化反応が阻害されることを見出した。つまり Atg4 の酵素活性の制御は、他の分子との相互作用や、リン酸化などの翻訳後修飾によって立体構造が変化することによって行われているというよりは、むしろ PAS 液滴内部に浸透しづらいという局在の制限に起因していることが示唆された。

さらに、近年予測構造の正確性が話題となっているプログラムである AlphaFold2 を用いた予測構造をもとに、Atg1 複合体液滴 (PAS 液滴) における Atg8-PE の脱脂質化反応制御の分子機構に焦点を当てて様々な解析を行った。PAS の足場タンパク質 Atg17 と E3 酵素複合体の構成タンパク質 Atg12 の複合体構造から、相互作用に重要と思われる残基を同定し、変異実験を行った。その結果、プルダウンアッセイにおいて Atg12 と Atg17-Atg29-Atg31 間の結合がみられなかった変異体では、液滴への Atg12 の濃縮が起こらないことが明らかになった。また、出芽酵母においても変異体株では PAS に Atg12-Atg5-Atg16 複合体が局在しなくなった。これらの実験から、Atg12-Atg17 間相互作用が Atg12-Atg5-Atg16 複合体を PAS に濃縮するメカニズムであることが示唆された。今後は分子間の相互作用をより詳細に検討するために、NMR と ITC を利用した解析を合わせて行っていく。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Cui Jin, Ogasawara Yuta, Kurata Ikuko, Matoba Kazuaki, Fujioka Yuko, Noda Nobuo N., Shibasaki Masakatsu, Watanabe Takumi	4. 巻 144
2. 論文標題 Targeting the ATG5-ATG16L1 Protein-Protein Interaction with a Hydrocarbon-Stapled Peptide Derived from ATG16L1 for Autophagy Inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 17671 ~ 17679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c07648	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 Y, Noda NN	4. 巻 69
2. 論文標題 Biomolecular condensates in autophagy regulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceb.2020.12.011	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 Kodera N, Noshiro D, Dora SK, Mori T, Habchi J, Blocquel D, Gruet A, Dosnon M, Salladini E, Bignon C, Fujioka Y, Oda T, Noda NN, Sato M, Lotti M, Mizuguchi M, Longhi S, Ando T	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural and dynamics analysis of intrinsically disordered proteins by high-speed atomic force microscopy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 181-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41565-020-00798-9	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤岡優子、野田展生
2. 発表標題 オートファジーにおける相分離の機能、Roles of liquid-liquid phase separation in autophagy
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤岡優子
2. 発表標題 Phase separation provides a reaction chamber for autophagy progression
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤岡優子、野田展生
2. 発表標題 液 - 液相分離によるオートファジーの始動機構
3. 学会等名 第8回北海道大学部局横断シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤岡優子
2. 発表標題 オートファジーにおける相分離の機能
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤岡優子
2. 発表標題 液 - 液相分離によるオートファジーの始動機構
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第46回討論会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡優子
2. 発表標題 相分離によるオートファジーの駆動原理
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 藤岡優子（加藤 昌人、白木 賢太郎、中川 真一 編）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 247
3. 書名 フロントランナー直伝 相分離解析プロトコール	

1. 著者名 藤岡優子、野田展生（廣瀬 哲郎、加藤 昌人、中川 真一 編）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 223
3. 書名 相分離 メカニズムと疾患	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 遺伝子病制御研究所 生命分子機構分野HP https://mechanism.igm.hokudai.ac.jp/

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