

博士（薬 学） 松 下 美奈子

学位論文題名

Structural and Functional Analyses of
Atg5/Atg16 Complex Essential for Autophagy

(オートファジーに必須な Atg5/Atg16複合体の立体構造と機能の解析)

学位論文内容の要旨

【序論】

オートファジーとはユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ細胞内の主要な分解機構であり、全ての真核生物に保存されている。出芽酵母において、液胞近傍の小さな構造体である PAS (pre-autophagosomal structure) の付近から出現した膜構造（隔離膜）がカップ状に伸びてタンパク質やオルガネラといった細胞内成分を取り囲み、閉じて球状の二重膜構造体であるオートファゴソームとなる。続いてオートファゴソームが液胞に融合し内膜ごと内容物を液胞内に放出することで、細胞内成分が液胞内分解酵素により分解される。

オートファゴソームの形成には少なくとも 16 種類のオートファジー関連タンパク質 (Atg タンパク質) が必要であり、それらは phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) 複合体や Atg12 結合系などに分類される。ユビキチン結合系と類似した結合システムである Atg12 結合系では、Atg12 が活性化酵素 Atg7 と結合酵素 Atg10 の働きにより Atg5 にイソペプチド結合を介して結合する。更に Atg16 の N 末端側領域が Atg5 に結合し、Atg12-Atg5/Atg16 複合体が形成される。Atg12-Atg5/Atg16 複合体は PAS や隔離膜上に局在することからオートファゴソームの形成に関与していると考えられている。オートファゴソームの形成には Atg12 が必須だが、Atg12 欠損株においても Atg5/Atg16 複合体は PAS に局在できる。Atg タンパク質の個々の機能は未解明な点が多く、オートファゴソームの形成機構は最大の疑問点である。本研究では、立体構造に基づいてオートファゴソーム形成機構を理解することを目指し、Atg5/Atg16N 末端領域複合体の X 線結晶構造解析を行った。また Atg5 と Atg16 が PAS に存在するであろう脂質と結合する可能性について検証した。

【結果と考察】

1. Atg5/Atg16N 末端領域複合体の結晶構造解析

Atg5/Atg16(1-57)複合体の結晶を得て X 線結晶構造解析を行った。

1-1. Atg5 の構造

構造解析の結果、Atg5 は二つのユビキチンフォールドを含んでいることがわかった。それらを一次配列上の上流から UblA, UblB、それ以外のヘリックスに富んだ領域を helical region と名付けた。Atg12 とイソペプチド結合を形成する Lys149 は helical region 中の α 4 ヘリックスに存在していた。三領域はそれぞれ立体構造的に独立したドメインではなく、集まって一つの球状タンパク質を形成している。

UblA と UblB はユビキチンフォールドをとる他のタンパク質とほとんど配列相同性を示さないが、UblB と Atg8 ホモログには一部高度に共通した残基が見られた。Atg8 ホモログはユビキチンフォールドと機能に重要な二本の N 末端側ヘリックスから成っている。UblB, Atg8 ホモログ共に、それらの残基は β -シート上に集まっており、前者は Lys149 を含む α 4 と、後者は N 末端ヘリックスと疎水性相互作用を形成していた。この相互作用はおそらくユビキチンフォールド上に α ヘリックスを提示するために共通して使われているものなのであろう。Lys149 はこの相互作用により分子表面に提示されている。UblB は α 4 を含む helical region および UblA と、保存された残基を用いて広範な相互作用を形成し、Atg5 の三領域をつなぐ骨格的役割を担っている。

一方、UblA には UblB との接触面以外にも保存領域が存在し、それは分子表面に露出していた。UblA は Atg10 などの外部分子との相互作用を担っているのかもしれない。

1-2. Atg16(1-57)の構造と Atg5 との結合様式

Atg16(1-57)は 1 から 20 残基目までの電子密度が見られず、22 から 40 残基目までの長いヘリックスとそれに続く二次構造に乏しい領域により構成されていた。Atg16(1-57)と Atg5 は広い接触面で結合しており、長いヘリックスは Atg5 の三領域全てと、二次構造に乏しい領域は UblA と接触していた。Atg5 と相互作用が見られた Atg16 の残基についてアラニン置換体を作製し、*in vitro pull down assay* を行った結果、Arg35 が Atg5 との結合に必須であることが示された。結晶構造において Arg35 は Atg5 の三領域の境に形成された溝に深く入り込み、UblB 中の Gln253 と水素結合を形成している。Atg16-Atg5 間相互作用を整理すると、Atg16 の N 末端側から Leu28, Leu32 を中心とした広い疎水性コアの形成、Arg35 や Glu39 による親水性相互作用、Phe46 を中心とした疎水性相互作用の三つに分けることができる。結合の駆動力となりうる親水性相互作用を中心とし、固い結合様式と考えられる疎水性相互作用を前後に配置しているこの結合は、強固で安定であると考えられる。

2. Atg5/Atg16 複合体は脂質に結合する

Lipid overlay assay により、Atg5 と Atg16 が脂質に結合する可能性について検証した。その結果、Atg5 単体と Atg16 単体については脂質との結合が認められなかった。しかし、Atg5/Atg16 複合体において phosphatidyl inositol 3-phosphate (PI3P) や PI4P 等、酸性脂質に対する結合が検出された。また、Atg16C 末端側領域を除いても結合に影響はなく、構造解析を行った Atg5/Atg16(1-57)複合体は Atg5/Atg16 複合体と同様に酸性脂質に結合した。Atg タンパク質には PI3K 複合体の構成タンパク質が含まれ、それが PAS に局在すること、そしてその欠損株では Atg12-Atg5/Atg16 複合体が PAS に局在しないことが報告されている。以上から、Atg12-Atg5/Atg16 複合体の PAS や隔離膜への局在化は、PI3K によって産生された PI3P と Atg5/Atg16(1-57)との結合による可能性が示唆される。一般に酸性脂質との結合には塩基性残基が関わることと、Atg5 と Atg16 がそれぞれ単体では PI3P に結合せず、複合体としてのみ PI3P に結合できることから、結合には Atg5 と Atg16(1-57)との界面近傍に存在する塩基性残基が関わると考えられる。また、Atg5 における Atg16 結合部位と Atg12 結合部位は丁度反対側に位置しており、PAS や隔離膜中に存在する PI3P に Atg5 と Atg16 の界面付近が結合すると考えると、立体構造上も無理がない。

Atg5/Atg16(1-57)の PI3P 結合様式とその意義については更なる検証が必要であり、現在、結合部位の特定に取り組んでいる。本解析を足がかりに Atg12-Atg5/Atg16 複合体の局在機構の解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 稲垣 冬彦

副査 教授 五十嵐 靖之

副査 助教授 井ノ口 仁一

副査 助教授 森岡 弘志

学位論文題名

Structural and Functional Analyses of Atg5/Atg16 Complex Essential for Autophagy

(オートファジーに必須な Atg5/Atg16複合体の立体構造と機能の解析)

オートファジーとはユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ細胞内の主要な分解機構であり、全ての真核生物に保存されている。大隅教授(基生研)のグループにより見出され、我国発のオリジナル研究として国際的に高い評価を受けている。オートファジーではまず、タンパク質やオルガネラといった細胞内成分がオートファゴソームと呼ばれる膜構造により、酵母や植物では液胞へその他の真核細胞ではリソソームへ運ばれて分解され、分解産物であるアミノ酸はタンパク質合成、糖新生、エネルギー産生などに再利用される。オートファジーは細胞内アミノ酸プールの維持や細胞内浄化等、複数の目的を持っており、栄養飢餓応答において、また細胞内成分の日常的な代謝回転において重要な役割を担っている。

出芽酵母において、オートファゴソームの形成拠点と考えられている PAS (pre-autophagosomal structure) は液胞近傍の小さな構造体であり、その微細構造は不明だがここにほとんどのオートファジー関連タンパク質 (Atg タンパク質) が集まっている。この PAS 付近から出現した膜構造(隔壁膜)がカップ状に伸びてタンパク質やオルガネラといった細胞内成分を取り囲み、閉じて球状の二重膜構造体であるオートファゴソームとなる。続いてオートファゴソームが液胞に融合し内膜ごと内容物を液胞内に放出することで、細胞内成分が液胞内分解酵素により分解される。オートファゴソームの形成には少なくとも 16 種類の Atg タンパク質が必要であり、それらの Atg タンパク質は phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) 複合体や二つのユビキチン様結合系 (Atg12 結合系, Atg8 結合系) などに分類される。ユビキチン結合系と類似した結合システムである Atg12 結合系では、Atg12 が二つの酵素 (活性化酵素 Atg7 と結合酵素 Atg10) の働きにより Atg5 にイソペプチド結合を介して結合する。更に Atg16 の N 末端側領域が Atg5 に結合し、Atg16 の C 末端側にある coiled-coil 領域が自己会合を引き起こして4量体程度の大きな Atg12-Atg5/Atg16 複合体が形成される。

これまでに形態学的、遺伝学的手法によりオートファジーの膜動態や多くの Atg タンパク質の存在が明らかになっている。しかし、Atg タンパク質の個々の機能は未解明な点が多く、特にオートファゴソーム形成の機構については最大の問題点となっている。申請者は、PAS と隔離膜上に局在する Atg12-Atg5/Atg16 複合体に注目し、立体構造に基づいてオートファゴソーム形成機構を理解することを目指して、Atg5/Atg16 複合体のX線結晶構造解析と脂質結合について解析を行ない、以下の点について明らかにした。

1. Atg5/Atg16N 末端領域複合体の結晶構造を明らかにした。
2. Atg5 は二つのユビキチンフォールド(UblA, UblB)とヘリックスに富む領域(helical region)から構成されていた。Helical region には Atg12 の結合を受ける Lys149 が存在し、UblB は骨格的役割を担っていた。
3. Atg16N 末端領域は長いヘリックスとそれに続く二次構造に乏しい領域から成り、広い接触面で Atg5 に結合して安定な複合体を形成していた。
4. Atg5 単体、Atg16 単体は脂質に結合しないが、Atg5/Atg16 複合体は脂質(PI3P)に結合することを明らかにした。構造解析を行った Atg5/Atg16N 末端領域複合体も Atg5/Atg16 複合体と同程度の PI3P 結合能を示し、Atg5 と Atg16N 末端領域とが協調して PI3P に結合することが示唆された。

以上の結果より、オートファジーの進行は①PAS に存在する PI3K により PI(3)P がつくられる。②PI(3)P に Atg12-Atg5/Atg16 がリクルートされる。③Atg12-Atg5/Atg16 複合体により効率的に Atg8 の PE 化が行われる。④Atg8-PE が膜上に集積し、隔離膜が伸張し最終的に閉じたオートファゴソームを形成する。というスキームを考えることができる。オートファゴソームの形成は Atg タンパク質群の協調的な働きにより実現されているものであり、申請者の研究は、構造生物学的アプローチによりオートファゴソーム形成過程の解明を目指した研究として評価できる。申請者の研究は博士論文としてふさわしいものと評価する。