

博士(薬学) 藤岡優子

学位論文題名

オートファジーに必須な Atg 結合系の構造機能解析

学位論文内容の要旨

オートファジーとは、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り、出芽酵母から高等動植物まで真核生物に広く保存されている。オートファジーの最もよく知られている役割は飢餓応答であるが、細胞内の品質管理や、感染防御、抗原提示など、多彩な役割を担っていることが徐々に明らかとなっている。オートファジーが誘導されると、細胞質に隔離膜と呼ばれるカップ状の脂質膜構造が出現し、これが細胞質成分やオルガネラなどを取り込みながら伸展し、最終的に二重膜で囲まれたオートファゴソームが形成される。続いて、オートファゴソームの外側の膜が、リソソーム/液胞の膜と融合し、オートファゴソームの中身が内側の膜ごとリソソーム/液胞内の加水分解酵素群の作用で消化される。

出芽酵母では18のオートファジー関連(ATG)遺伝子がオートファゴソーム形成段階に必要と考えられている。これら18のATG遺伝子の多くは高等真核生物にも保存されており、この分子機構が広く保存されていることを示唆している。そのうち8つのAtgタンパク質は、ユビキチン結合系様のシステムであるAtg12結合系とAtg8結合系を形成している。Atg12はE1様酵素であるAtg7とE2様酵素であるAtg10の働きにより、C末端のグリシン残基を介してAtg5のリジン残基とイソペプチド結合を形成する。Atg12-Atg5結合体はAtg16のN末端領域と相互作用し、さらにAtg16のcoiled-coil domain(CCD)が自己会合することによって、多量体型Atg12-Atg5-Atg16複合体が形成される。Atg8はAtg4によるプロセシングののち、E1様酵素であるAtg7とE2様酵素であるAtg3の働きにより、脂質であるホスファチジルエタノールアミン(PE)のアミノ基に転移され、Atg8-PE結合体が形成される。

哺乳類や出芽酵母を用いた *in vivo* のこれまでの実験から、二つの結合系のクロストークの存在が示唆されてきたが、その詳細な分子機構や生物学的重要性はわかつていなかった。そこで本研究の前半では、*Arabidopsis thaliana* (At) ATG12結合系とAtATG8結合系の二つの結合系を *in vitro* で再構成し、二つの結合系間のクロストークの詳細解明を試みた。

AtATG5, AtATG7, AtATG10, AtATG12のリコンビナントタンパク質をATPと混合して30℃で一時間インキュベートした。全ての構成成分が混合液中に存在する時にのみ、AtATG12-AtATG5結合体が生成したことから、その結合反応にはAtATG5, AtATG7, AtATG10, AtATG12, ATPが必要十分条件であると結論づけた。また変異体タンパク質を用いた再構成実験から、AtATG7とAtATG10はそれぞれシステイン558番および178番を触媒残基とした酵素として機能し、AtATG12をAtATG5のリジン128番に結合することが示唆された。

AtATG8 結合系についても同様の実験を行った。AtATG3, AtATG7, AtATG8a-form I (C 末端のグリシンが露出している AtATG8a), リポソーム, ATP が全て反応液に存在する時にのみ AtATG8a-PE が形成されたことから、この結合反応には AtATG3, AtATG7, AtATG8a-form I, ATP, リポソームが必要十分であると結論づけた。また変異タンパク質を用いた再構成実験から、AtATG7 と AtATG3 はそれぞれシステイン 558 番, 258 番を触媒残基とした酵素として機能することが示唆された。

構築した *in vitro* 再構成系を用いて、2つの結合系間のクロストークを調べた。まず *in vitro* 再構成で調製した AtATG12-AtATG5 結合体を AtATG8 結合系に導入した。AtATG8a-PE の生成は AtATG12-AtATG5 結合体の用量依存的に著しく増加した。一方、AtATG12 や AtATG5 を単独や同時に導入しても、AtATG8-PE の生成量は増加しなかった。同様に、酵母 Atg12-Atg5 結合体についても、ATG8-PE の生成反応を促進する活性があることが、酵母 Atg8 結合系の *in vitro* 再構成系を用いた実験で示された。以上の結果から、Atg12-Atg5 結合体は Atg8 結合系の E3 様酵素であることが明らかとなった。次に AtATG3 を AtATG12 結合系に導入した。AtATG12-AtATG5 結合体の形成量は、AtATG3 を加えることによって減少し、それは AtATG10 もしくは AtATG7 の用量依存的に回復した。これらの結果は、*in vitro* において AtATG3 が AtATG7-AtATG10 間の相互作用を競合的に阻害することで、AtATG12-AtATG5 結合体の形成を阻害していることを示している。

本研究の後半では、Atg12-Atg5-Atg16 複合体の多量体状態についての構造的知見を得るために、Atg16 の CCD (残基 50 番～123 番) の X 線結晶構造解析を行った。Atg16 CCD の一分子の構造は 90 Å に及ぶ長い一本のヘリックスからなり、二分子が平行に向かい合って二量体 coiled-coil 構造を取っていた。Atg12-Atg5-Atg16 複合体および Atg16 単体は、ゲルろ過クロマトグラフィーでは四量体に相当する位置に溶出することが報告されている。Atg16 の溶液中の正確な会合状態を調べるために、超遠心分析を行ったところ、Atg16 は Atg5 との結合の有無に関わらず二量体であることが明らかとなった。

Atg16CCD の構造と、すでに報告されている Atg16 の N 末端領域と Atg5 との複合体構造とをつなぎ合わせたモデルを構築すると、Atg16CCD の細長いホモダイマー構造の片端に、可動性の Atg5-Atg16N 末端が 2 セットつくような構造となる。Atg12-Atg5-Atg16 複合体は隔離膜の外側の膜に存在し、完成したオートファゴソームから遊離することから、オートファゴソームの曲率を決定するようなコートタンパク質ではないかと想像してきた。しかし Atg16 CCD の平行ホモダイマーという構造の特徴から、Atg5-Atg16 複合体は 2 回対称性の面を持たず、構造が既知のコートタンパク質や膜の曲率を決定する BAR ドメイン等との構造類似性はない。Atg12-Atg5-Atg16 複合体は、Atg8 結合系の E3 酵素として機能することが本研究前半部および他の研究で明らかになっている。Atg12-Atg5-Atg16 複合体は膜上で足場タンパク質として機能し、オートファゴソーム膜の形成因子として重要な Atg8-PE を膜にリクルートする機能を担うと考えられる。Atg12-Atg5-Atg16 複合体は構造既知の他の E3 酵素群や膜結合タンパク質群と構造相同性を示さない、非常にユニークな立体構造を保持している。その E3 酵素活性および膜局在機能の分子機構を明らかにするためには、今後の更なる解析が必要である。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　稻　垣　冬　彦
副　査　教　授　有　賀　寛　芳
副　査　教　授　木　原　章　雄
副　査　講　師　野　田　展　生

学　位　論　文　題　名

オートファジーに必須な Atg 結合系の構造機能解析

オートファジーとは、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。出芽酵母では 18 のオートファジー関連 (ATG) 遺伝子がオートファゴソーム形成段階に必要と考えられており、そのうち 8 つの Atg タンパク質は、ユビキチン結合系様のシステムである Atg12 結合系と Atg8 結合系を形成している。Atg12 は E1 様酵素である Atg7 と E2 様酵素である Atg10 の働きにより、C 末端のグリシン残基を介して Atg5 のリジン残基とイソペプチド結合を形成する。Atg12-Atg5 結合体は Atg16 の N 末端領域と相互作用し、さらに Atg16 の coiled-coil domain (CCD) が自己会合することによって、多量体型 Atg12-Atg5-Atg16 複合体が形成される。Atg8 は Atg4 によるプロセシングののち、E1 様酵素である Atg7 と E2 様酵素である Atg3 の働きにより、脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) のアミノ基に転移され、Atg8-PE 結合体が形成される。

哺乳類や出芽酵母を用いた *in vivo* のこれまでの実験から、二つの結合系のクロストークの存在が示唆されてきたが、その詳細な分子機構や生物学的重要性はわかつていなかった。申請者はまず、*Arabidopsis thaliana* (At) ATG12 結合系と AtATG8 結合系の二つの結合系を *in vitro* で再構成し、二つの結合系間のクロストークの詳細解明を試みた。

まず大腸菌を用いて各タンパク質を発現、精製し、AtATG12 結合系と AtATG8 結合系を *in vitro* で再構成した。次に *in vitro* 再構成で調製した AtATG12-AtATG5 結合体を AtATG8 結合系に導入した。AtATG8a-PE の生成は AtATG12-AtATG5 結合体の用量依存的に著しく増加した。一方、AtATG12 や AtATG5 を単独や同時に導入しても、AtATG8-PE の生成量は増加しなかった。同様に、酵母 Atg12-Atg5 結合体についても、ATG8-PE の生成反応を促進する活性があることが、酵母 Atg8 結合系の *in vitro* 再構成系を用いた実験で示された。以上の結果から、Atg12-Atg5 結合体は Atg8 結合系の E3 様酵素であることが明らかとなった。次に AtATG3 を AtATG12 結合系に導入した。AtATG12-AtATG5 結合体の形成量は、AtATG3 を加えることによって減少し、それは AtATG10 もしくは AtATG7 の用量依存的に回復した。これらの結果は、*in vitro* において AtATG3 が AtATG7-AtATG10 間の相互作用を競合的に阻害することで、AtATG12-AtATG5 結

合体の形成を阻害していることを示している。

次に申請者は、Atg12-Atg5-Atg16 複合体の多量体状態についての構造的知見を得るために、Atg16 の CCD (残基 50 番～123 番) の X 線結晶構造解析を行った。Atg16 CCD の一分子の構造は 90 Å に及ぶ長い一本のヘリックスからなり、二分子が平行に向かい合って二量体 coiled-coil 構造を取っていた。Atg12-Atg5-Atg16 複合体および Atg16 単体は、ゲルろ過クロマトグラフィーでは四量体に相当する位置に溶出することが報告されている。Atg16 の溶液中の正確な会合状態を調べるために、超遠心分析を行ったところ、Atg16 は Atg5 との結合の有無に関わらず二量体であることが明らかとなった。

Atg16CCD の構造と、すでに報告されている Atg16 の N 末端領域と Atg5 との複合体構造とをつなぎ合わせたモデルを構築すると、Atg16CCD の細長いホモダイマー構造の片端に、可動性の Atg5-Atg16N 末端が 2 セットつく構造となる。Atg12-Atg5-Atg16 複合体は隔離膜の外側の膜に存在し、完成したオートファゴソームから遊離することから、オートファゴソームの曲率を決定するコートタンパク質ではないかと想像されてきた。しかし構築した Atg5-Atg16 複合体モデルは 2 回対称性の面を持たず、構造が既知のコートタンパク質や膜の曲率を決定する BAR ドメイン等との構造類似性はない。Atg12-Atg5-Atg16 複合体は膜上で足場タンパク質として機能し、その E3 活性で Atg8-PE を膜にリクルートする機能を担うと考えられる。

以上述べてきたように、著者はオートファジーの分子機構に関し新規かつ重要な多くの知見を見出し、オートファジーの研究分野において、多大な貢献をした。よって著者は、北海道大学博士(薬学)の学位を授与される資格あるものと認める。