

学 位 論 文 題 名

# Structural and functional analyses of autophagy-related E2-like proteins, Atg10 and Atg3

(Autophagy における 2 つの E 2 様タンパク質 Atg10, Atg3の構造機能解析)

## 学位論文内容の要旨

Autophagy is an intracellular degradation system conserved among eukaryotes from yeasts to mammals. In higher eukaryotes, autophagy plays a crucial role in fundamental biological processes such as intracellular clearance, differentiation, development, programmed cell death, and antigen representation, and autophagy dysfunction is associated with severe diseases such as neurodegenerative disorders and cancers. Although autophagy is in principle a non-selective degradation process, it also mediates selective degradation of various targets that include aggregated proteins, surplus or damaged organelles, and even invasive bacterial cells. In yeast, aminopeptidase 1 (Ape1) is selectively transported into the vacuole *via* an autophagy-like process called the cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway under vegetative conditions, and *via* autophagy under starvation conditions that strongly induce autophagy. Because of its mechanistic similarity to autophagy, the biosynthetic Cvt pathway has been regarded as a model of selective autophagy. During autophagy and the Cvt pathway, double-membrane structures called autophagosomes and Cvt vesicles sequester a portion of the cytoplasm and the Ape1 complex, respectively, and fuse with the vacuole (lysosome in the case of mammalian autophagy) to deliver their inner contents into the organelle lumen. The formation step of autophagosomes and Cvt vesicles requires two ubiquitin-like conjugation systems called the Atg8 and the Atg12 systems. In the Atg12 system, Atg12 is activated by Atg7 (an E1-like enzyme) to form a Atg12~Atg7 thioester intermediate in an ATP-dependent manner, and is then transferred to Atg10 (an E2-like enzyme) to form a Atg12~Atg10 thioester intermediate. Finally, Atg12 is conjugated to its sole target protein, Atg5. In the Atg8 system, nascent Atg8 is processed by Atg4 (a cysteine protease) to expose Gly at its C terminus. The exposed Gly of Atg8 is activated by Atg7 to form a Atg8~Atg7 thioester intermediate, and is then transferred to Atg3 (an E2-like enzyme) to form a Atg8~Atg3 thioester intermediate. Atg8 is finally conjugated to the amino group of a phosphatidylethanolamine (PE). Although these factors are sufficient for the formation of Atg8-PE conjugates *in vitro*, the Atg12-Atg5 conjugate is required *in vivo*. Recently, *in vitro* studies have shown that the Atg12-Atg5 conjugate promotes the conjugation reaction between Atg8 and PE by directly interacting with Atg3. Thus, it is suggested that there is a hierarchy between the Atg12 system and the Atg8 system.

In the Atg8 system, Atg3 receives Atg8 from Atg7 and transfers it to PE. We previously reported the crystal structure of Atg3 and its interaction mode with Atg8 and Atg7. Atg3 is composed of three characteristic regions: the E2 core region, the flexible region, and the handle region (HR). The latter two regions are necessary for the interaction with Atg7 and Atg8, but the detailed interaction mode is unknown. Recently, we have shown that Atg8 and its mammalian ortholog LC3 recognize the WXXL sequence conserved in Atg19 and p62, autophagic receptors for Ape1 and ubiquitinated protein aggregates, respectively, in a similar manner. Therefore, the WXXL sequence is considered to be an Atg8-family interacting motif (AIM). Atg8-Atg19<sup>AIM</sup> and LC3-p62<sup>AIM</sup> interactions are crucial for the selective transport of Ape1 and protein aggregates to the vacuole/lysosome through the Cvt pathway and autophagy, respectively. Since Atg3 HR, which is responsible for the interaction with Atg8, also has a WXXL sequence (Trp<sup>270</sup>-Glu<sup>271</sup>-Asp<sup>272</sup>-Leu<sup>273</sup>), we postulated that Atg3 also interacts with Atg8 through the sequence. In the chapter 1, we show by NMR spectroscopy that Atg3 directly interacts with Atg8 through the WEDL sequence in HR, and that the interaction is quite similar to Atg8-Atg19<sup>AIM</sup> and LC3-p62<sup>AIM</sup> interactions. Thus, the WEDL sequence of Atg3 is a canonical AIM. *In vitro* analyses showed that Atg3<sup>AIM</sup> contributes to the efficient formation of Atg8-PE conjugates particularly under the existence of Atg19, and *in vivo* analyses showed that Atg3<sup>AIM</sup> is necessary for the Cvt pathway. These results suggest that AIM identified in autophagic receptors is also utilized in a non-receptor protein, Atg3, and plays a crucial role in autophagic processes.

Atg10 exhibited no sequence similarity to ubiquitin conjugation-enzymes or ubiquitin ligases. The *atg10* mutation severely reduced the viability of the cell under the starvation condition, suggested that Atg10 is essential for autophagy. In the Atg12 system, Atg10 receives Atg12 from Atg7 and then transfers it to Atg5; the C-terminal Gly of Atg12 is covalently bound to the Lys-149 side chain of Atg5 via an isopeptide linkage. Although most E2 proteins require E3 proteins, Atg10 by self is catalytically competent for the formation of Atg12-Atg5 conjugates. So far, as E3-like proteins in the Atg12 system is not reported, we assume that Atg10 also act as E3-like protein; Atg10 recognize Atg5 and conjugates Atg12 to Atg5. The Atg10-Atg5 interaction could not be detected by yeast two hybrid experiments in the case of *Saccharomyces cerevisiae* Atg proteins, while mAtg10 interacts with mAtg5 in the case of *Mus musculus* Atg proteins. These findings suggest that the Atg10-Atg5 interaction may be very weak or transient. In the chapter 2, we determined the solution structure of Atg10 and showed that the structure of Atg10 and Atg3 are classified into same structural family. Furthermore, we revealed that Atg10 interacts with Atg5 mainly through the conserved cleft by NMR experiments and *in vitro* conjugation assays. These results showed Atg10 act as both an E2 enzyme and an E3 protein; Atg10 receives Atg12 from Atg7, and directly recognizes Atg5 and conjugates Atg12 to Atg5 without E3 protein.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 前 仲 勝 実  
副 査 教 授 木 原 章 雄  
副 査 講 師 野 田 展 生

## 学 位 論 文 題 名

### Structural and functional analyses of autophagy-related E2-like proteins, Atg10 and Atg3

(Autophagy における 2 つの E 2 様タンパク質 Atg10, Atg3 の構造機能解析)

酵母におけるオートファジーは富栄養条件下ではほとんど活性がないが、アミノ酸飢餓のようなシグナルが伝わると、細胞質中に隔離膜と呼ばれる扁平な小胞が出現する。隔離膜は非選択的に細胞質成分を切り取るように伸張し、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体を形成する。オートファゴソームは液胞膜とオートファゴソーム外膜で膜融合し、オートファゴソーム内膜ごと内容物を液胞内へと放出し、全て液胞中酵素群によって分解される。酵母において液胞内酵素である amino-peptidase 1 (Ape1) は富栄養条件下では cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway により、飢餓条件下ではオートファジーにより液胞へと選択的に輸送される。Cvt pathway は生合成の特徴を有しているが、オートファジーとの膜動態の類似性から選択的オートファジーのモデルとして考えられている。オートファジー及び Cvt pathway において隔離膜が伸張していく段階には、ubiquitin 様結合系である Atg8 結合系と Atg12 結合系が関与している。Atg8 結合系では、Atg4 の働きにより ubiquitin 様タンパク質である Atg8 の C 末端の Gly が露呈され、これが ATP 依存的に E1 様タンパク質 Atg7 の Cys と結合して活性化される。さらに、E2 様タンパク質 Atg3 の働きによって、Atg8 はリン脂質である phosphatidylethanolamine に結合される。Atg12 結合系も Atg8 結合系と同様に、ubiquitin 様タンパク質 Atg12 が ATP 依存的に E1 様タンパク質 Atg7 により活性化される。さらに、E2 様タンパク質 Atg10 の働きによって、Atg12 は Atg5 の Lys 残基の側鎖に結合される。Atg8 結合系及び Atg12 結合系によって形成される 2 つの結合体はオートファジーに必須な結合体であり、Atg3, Atg10 は 2 つの結合体を直接形成するという重要な役割を担っているが、詳細な分子機構は明らかとされていなかった。そこで本研究ではオートファジーにおける 2 つの E2 様タンパク質 Atg3, Atg10 に焦点をあて、構造生物学的なアプローチと生化学的なアプローチから Atg3 と Atg10 の機能に関する知見を得ることを目指した。

Atg3 単体での結晶構造解析の結果から、Atg3 の特徴的な領域の 1 つである handle region (HR) が Atg8 とチオエステル結合非依存的な相互作用することが示唆されてきたが、詳細な相互作用様式及びその意義については明らかとされていなかった。また、選択的オートファジーの分子基盤として、Atg8 が標的分子に含まれる WXXL 配列という Atg8-family interacting motif (AIM) を特異的に認識することが明らかとなっている。興味深いことに Atg3 HR 中には W<sup>270</sup>E<sup>271</sup>D<sup>272</sup>L<sup>273</sup> 配列という AIM 候補配列があったことから、この配列が Atg8 とのチオエステル結合非依存的な相互作用に重要であると考え、NMR 法を用いた詳細な相互作用解析を行った。その結果、予想通り Atg8 は Atg3 の AIM

を介して相互作用していることをわかった。さらに Atg3<sup>AIM</sup>-Atg8 相互作用の意義について変異体解析等から検討を行った結果、Cvt pathway にとって重要であることが明らかとなった。

Atg10 は Atg12 系において、特定の E3 様タンパク質を介さずに Atg12 を唯一の標的である Atg5 に結合させることができるため、Atg10 が E3 様タンパク質としても機能していると考えられてきた。しかしながら、Atg10 の構造は未知であり、Atg10 による Atg12-Atg5 形成機構に関する知見は得られていなかった。そこで NMR 法を用いて好熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来 Atg10 (KmAtg10) の構造を決定した。KmAtg10 の構造は Atg3 の結晶構造と最も類似性が高く、共通の構造ファミリーに分類されることが示唆された。さらにどのように Atg10 が Atg5 を直接認識しているのか明らかにするために、NMR 法を用いた相互作用解析を行った。その結果、KmAtg10 は Atg10 の活性 Cys 近傍に保存された溝を中心に Atg5 を認識し、Atg12-Atg5 結合体を形成していることを明らかとなった。すなわち、Atg3 は特徴ある構造領域 (HR) 中の AIM を用いて Atg8 を認識するが、Atg10 は保存された溝を中心に用いて Atg5 を認識していることが明らかとなった。

著者は、これまで不明であったオートファジーに必須である 2 つの E2 様タンパク質 Atg3, Atg10 の相互作用分子との結合様式を明らかにし、重要な生命現象であるオートファジーの分子機構解明に多大なる貢献があったと言える。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。