

学 位 論 文 題 名

オートファジーに必須なAtg8結合系の分子機構に関する研究

学位論文内容の要旨

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、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現象である。ユビキチン・プロテアソーム系は、細胞質中でユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解するのに対して、オートファジーは大規模かつ非選択的に細胞質成分を液胞/リソソームへと輸送し分解する系である。オートファジーが誘導されると細胞質中に隔離膜と呼ばれる膜構造が出現し、それが細胞質成分を取り囲みながら伸長し、閉じてオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体となる。オートファゴソーム外膜は液胞/リソソームと融合し、内膜ごと内容物が分解される。分解によって生じたアミノ酸などの分解産物は新たに生合成の材料やエネルギー源としてリサイクルされる。

出芽酵母を用いた形態学的・遺伝学的解析によって、オートファジーの分子機構の研究は急速に発展し、現在少なくとも 18 種類の Atg タンパク質がオートファゴソーム形成に関わっていることが明らかとなっている。これらの Atg タンパク質のうち 8 種類のタンパク質が Atg8 結合系・Atg12 結合系と呼ばれる 2 つのユビキチン結合系と類似した結合系を形成しており、この結合系がオートファゴソーム形成に必須であることが報告されている。

Atg8 系では、ユビキチン様タンパク質(Ubl)である Atg8 は翻訳後、システインプロテアーゼである Atg4 によってプロセシングを受け、C 末端のグリシン残基を露出する。さらに ATP 依存的に E1 様酵素 Atg7 によって活性化され、E2 様酵素 Atg3 へと受け渡され、phosphatidylethanolamine(PE)と結合体(Atg8-PE)となる。Atg8-PE は Atg4 によって切断を受け(脱 PE 化)、再利用される。Atg8 の PE 化だけでなく、脱 PE 化もオートファゴソーム形成において重要な役割を担っていることが報告されている。さらに Atg8-PE は、膜を連結・融合させる働きをもつことが報告され、隔離膜の伸長・オートファゴソームの形成過程において、中心的役割を担っていることが示唆されている。

Atg12 系では、Ubl である Atg12 が Atg8 系と共通の E1 様酵素 Atg7 によって ATP 依存的に活性化され、E2 様酵素 Atg10 によってターゲットである Atg5 の Lys 残基に結合し、Atg12~5 結合体が形成される。Atg12-Atg5 結合体はさらに Atg16 と相互作用し、Atg12~Atg5-Atg16 複合体を形成する。また最近の研究によって、Atg12~Atg5 結合体が Atg8 の PE 化を促進するという報告や Atg12~Atg5-Atg16 複合体が Atg8 の PE 化が起こる場所を決めているという報告がなされ、Atg12~Atg5-Atg16 複合体は Atg8 系の E3 様酵素である可能性が指摘されている。

Atg12~Atg5-Atg16複合体およびAtg8-PEは隔離膜の伸長段階において膜への局在が確認されることから、隔離膜の伸長からオートファゴソーム形成の段階において、重要な役割を担っていることが示唆されている。しかし、現在までにその具体的な役割や隔離膜伸長の分子機構についてはほとんど明らかとなっていない。本論文では、この中でもAtg8結合系の分子機構に注目し、第1章でヒトAtg4BとLC3の複合体結晶構造解析について、第2章でAtg7によるAtg8の活性化とAtg3への受け渡しの分子機構について議論する。

第1章では、Atg8の哺乳類ホモログであるLC3とそのプロセッシングおよび脱PE化を担うAtg4Bの複合体の構造解析を行なった。その結果、LC3との複合体の形成によって、Atg4BはN末端領域とregulatory loop近傍に大きな構造変化を起こすことが明らかとなった。また、regulatory loopはAtg4B単体構造においては活性中心を塞いでおり、自己阻害の働きを担うが、LC3との複合体形成時にはLC3C末端領域の認識に働いており、活性および基質特異性を高めるうえで重要な役割を担っていることが判明した。Atg4BのN末端領域は単体構造において、基質のC末端領域がとおるトンネルの出口付近に位置することで活性を抑えていることが構造情報と*in vitro* cleavage assayによって明らかとなった。また、LC3と複合体を形成することで起こる構造変化によって、Atg4Bにはフラットな面が形成され、膜上に存在するLC3-PEの脱PE化を行なううえで有利になるであろうことが予想された。さらにこのAtg4BN末端領域の構造変化は、基質とは別分子のLC3との相互作用によって引き起こされていることが判明し、Atg4Bは周囲のLC3濃度によってN末端領域の構造変化が制御されており、それによって切断活性が制御されている可能性が示唆された。

第2章では、Atg7の構造解析と変異体解析によって、他のcanonical E1にはみられないAtg7に特有の分子機構の多くが明らかとなった。Atg7は大きくN末端ドメイン(N-terminal domain; NTD)とC末端ドメイン(C-terminal domain; CTD)の2つのドメインによって構成されており、CTDはAtg8の活性化、NTDはAtg3と相互作用し、Atg3へのAtg8の受け渡しの段階で働くことが明らかにした。Atg7によるAtg8の認識は、これまで研究が行われてきたcanonical E1によるUblの認識機構とは異なり、まずAtg7のC末端tailによってAtg8を捕まえ、その後Atg8をアデニル化活性部位であるAtg7のadenylation domainへと受け渡してAtg8のアデニル化が起こるという二段階の認識機構によって反応が進行していることを明らかにした。また、canonical E1がUblをE2へと受け渡す際には、Ublが結合している分子と相互作用するE2へと受け渡される(*cis*機構)のに対して、Atg7がAtg8をAtg3へと受け渡す際には、ホモダイマー形成相手のAtg7と相互作用するAtg3へと受け渡されている(*trans*機構)ことを明らかにした。

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	准教授	尾 瀬 農 之
副査	特任教授	稲 垣 冬 彦(先端生命科学研究院)

学位論文題名

オートファジーに必須なAtg8結合系の分子機構に関する研究

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、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現象である。現在までに多数のオートファジーに必須のタンパク質が同定されており、これらのタンパク質がユビキチン結合系に類似した2種類の系、Atg8系とAtg12系を形成していることが報告されている。申請者はこのなかでもAtg8系の分子機構に注目し、Atg8の哺乳類ホモログであるLC3とLC3を基質とするプロテアーゼであるAtg4Bの複合体結晶構造解析を行ない、Atg4によるAtg8の脱PE化機構に関して重要な知見を得た。さらにAtg7の構造解析研究を通して、Atg7によるAtg8の活性化とAtg3への受け渡しの分子機構について明らかにした。以下に各対象に対して詳述する。

Atg4Bの単体での結晶構造とホモログ間のアライメントおよびin vitro cleavage assayによって、Atg4Bのcatalytic triadは同定されており、興味深いことにAtg4Bは単体構造においては、catalytic triadの活性中心であるCys74が、自身の259-262残基目に存在するループ(regulatory loop)と142残基目のTrp残基によって塞がれており、自己阻害していることが判明した。LC3のC末端ペプチドのみではAtg4Bによる切断が起こらないことから、LC3本体の接近によってAtg4Bはregulatory loopおよびTrp142に大きな構造変化を起こし、活性中心を露出することが予想された。そこで、著者はAtg4BによるLC3の切断制御機構を明らかにするために、その基質であるLC3との複合体の構造解析を行なった。その結果、複合体の構造情報から、Atg4BによるLC3の認識およびAtg4ホモログ間の基質特異性に重要なアミノ酸残基を同定することに成功した。また、LC3との複合体の形成によって、Atg4BはN末端領域とregulatory loop近傍に大きな構造変化を起こすことが明らかにした。上述のようにregulatory loopはAtg4B単体構造においては活性中心を塞いでおり、自己阻害の働きを担うが、LC3との複合体形成時にはAtg4BのTrp142とともに狭いトンネルを形成することで、LC3C末端領域の認識に働いており、活性および基質特異性を高めるうえで重要な役割を担っていることがわかった。また、Atg4BのN末端領域は、基質LC3のC末端領域が認識されるトンネルの出口付近に位置することでAtg4Bの活性を抑えていることが明らかとなった。さらに、LC3と複合体を形成することで起こる構造変化によって、Atg4Bには新たにフラットな面が形成され、膜上に存在するLC3-PEの脱ポリエチレンイミン(PE)化を行なううえで有利になるであろうことが予想された。これは基質とは別分子のLC3との相互作用によって引き起こされていることが判明し、Atg4Bは周囲のLC3濃度によってN末端領域の構造変化が制御され、結果として切断活性が調節されていることが示唆された。これらの成果は、EMBO J. 誌にて発表された。

次に、Atg7 の構造解析と変異体解析によって、他のユビキチン系等の canonical E1 にはみられない Atg7 に特有の分子機構の多くが明らかとなった。Atg7 は大きく N 末端ドメイン (N-terminal domain; NTD) と C 末端ドメイン (C-terminal domain; CTD) の 2 つのドメインによって構成されており、CTD には構造既知の E1 に共通して存在する adenylation domain が存在していた。これまで構造研究の多くがなされてきた canonical E1 は共通のドメイン構造を有しているが、Atg7 には adenylation domain 以外に他の E1 と共通のドメインは観察されなかった。In vitro でのアッセイにより、CTD は Atg8 の活性化、NTD は Atg3 と相互作用することで、Atg3 への Atg8 の受け渡しの段階で働くことを明らかにした。canonical E1 によるユビキチン様蛋白質 (Ubl) の認識は E1 の adenylation domain が直接 Ubl を認識し、Ubl の C 末端 tail を活性部位へと接近させると考えられているが、Atg7 による Atg8 の認識機構はそれとは異なっていた。まず Atg7 の C 末端 tail によって Atg8 を捕まえ、その後 Atg8 をアデニル化活性部位である Atg7 の adenylation domain へと受け渡して Atg8 のアデニル化が起こるという二段階の認識機構によって反応が進行していることを複合体の結晶構造解析および NMR 解析によって明らかにした。また、canonical E1 による E2 の認識は C 末端に存在している Ubiquitin fold domain によってなされるが、Atg7 は NTD によって E2 である Atg3 を認識していた。その相互作用様式も他の E1-E2 間とは異なり、Atg7NTD はその塩基性面によって、他の E2 にはない Atg3 に特有の flexible region と相互作用していることが示唆された。canonical E1 との違いは E2 への Ubl の受け渡しの段階にもみられた。canonical E1 が Ubl を E2 へと受け渡す際には、Ubl が結合している分子と相互作用する E2 へと受け渡される (cis 機構) のに対して、Atg7 が Atg8 を Atg3 へと受け渡す際には、ホモダイマー形成相手の Atg7 と相互作用する Atg3 へと受け渡されている (trans 機構) ことを明らかにした。これらの結果をまとめ、Mol. Cell 誌にて発表された。

以上のように、著者は、これまで不明であったオートファジーの分子機構の重要なステップを立体構造解析と生化学解析により明らかにし、生命科学分野に対して多大なる貢献があった。

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。