

学位論文題名

Structural and functional analyses of receptor proteins,
Atg19 and Atg34, and the membrane-forming factor,
Atg18, in selective autophagy(選択的オートファジーにおける受容体Atg19, Atg34及び膜形成因子Atg18の
構造機能解析)

学位論文内容の要旨

【序論】

オートファジーは出芽酵母から高等動植物まで真核生物において広く保存された大規模な分解システムである。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脂質膜構造が出現し、分解対象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を形成する。その後オートファゴソームの外膜は液胞/リソソームと融合し、内膜ごと内容物は液胞/リソソーム内の加水分解酵素によって分解される。オートファジーは飢餓等に応じて細胞質の一部を無作為に液胞/リソソームに輸送し分解することで、細胞内成分の再構成に関わっている。しかし近年、オートファジーは状況に応じてミトコンドリアやペルオキシソームなどのオルガネラ、タンパク質凝集体、細胞内に侵入したバクテリアなどを特異的に認識し、それらの分解、除去にも関与していることが明らかになった。このような選択的オートファジーは癌、神経変性疾患、感染症など様々な疾病に関与しているが、基本的なメカニズムである「分解対象の認識機構」及び「オートファゴソームの形成機構」に関する知見は乏しい。出芽酵母において現在 30 種類以上のオートファジー関連 (Atg) タンパク質が同定されている。本研究では選択的オートファジーの基本的メカニズムを明らかにするため、これら Atg タンパク質のうち、認識に関与する Atg19, Atg34 及びオートファゴソームの形成に関与する Atg18 に焦点を当て、構造機能解析を行なった。

選択的オートファジーにおいて積荷が液胞/リソソームへ輸送されるには積荷を認識する受容体タンパク質が重要な役割を担っている。出芽酵母では、液胞酵素である α -mannosidase (Ams1), aminopeptidase I (Ape1) は選択的オートファジーによって液胞へ輸送されることが知られており、これら二つの積荷の液胞への輸送には受容体タンパク質 Atg19, Atg34 が関与している。細胞質中で Atg19 は Ams1, Ape1 を、Atg34 は Ams1 を直接認識し、その後、Atg19, Atg34 は隔離膜上に局在している Atg8 と結合することで Ams1, Ape1 の選択的囲い込みを実現している。本研究では Atg19 及び Atg34 の Ams1 結合ドメイン (ABD) を同定し、両者の立体構造を NMR 法により決定した。また、Ams1 の遊離型及び Atg34 ABD 結合型の結晶構造解析を行ない、Ams1 の詳細な認識機構を明らかにした。

出芽酵母においてオートファゴソームの形成には少なくとも 18 種類の Atg タンパク質が必須であると知られている。このうち Atg18 は Atg2 及びホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) と複合体を形成することでオートファゴソーム形成に重要な役割を担っている。また、Atg18 はホスファチジルイノシトール 3, 5 ニリン酸 (PI(3,5)P₂) と結合することで液胞膜に局在し、液胞形態の制御にも関与している。しかし、Atg18 の立体構造は明らかになっておらず、Atg18 による Atg2 及びイノシトールリン脂質の認識機構は解明されていない。本研究では、Atg18 の構造的知見を得るため Atg18 パラログである Hsv2 の結晶構造を決定し、得られた構造に基づいて Atg18 の機能解析を行なった。

【結果と考察】

1. Atg19, Atg34 による Ams1 の認識機構の解明

In vitro, *in vivo* の解析により Atg19, Atg34 の C 末端に存在する Ams1 結合ドメイン (ABD) を同定し、両者の立体構造を NMR 法により決定した。両者はよく似た immunoglobulin-fold を形成しており、保存されたループ領域上の His 残基 (Atg19 H310, Atg34 H296) が Ams1 の認識に必須であることを明らかにした。

積荷側の構造情報を得るため、Ams1 の結晶構造解析を行なった。Pt 誘導体結晶を作製し、多波長異常散乱 (MAD) 法により位相を決定した。構造の精密化は 2.3 Å 分解能の回折データを用いて行なった。Ams1 は一次配列上、糖質加水分解酵素ファミリー 38 (GH38) に属してお

り、Ams1 の一分子の構造は既知の GH38 の構造とよく似ていたが、N 末端領域に他の GH38 には保存されていないドメインが存在していた。Ams1 の全体構造は他の GH38 には見られない対称的な四量体を形成しており、Ams1 の四量体の形成にはこの N 末端ドメインが主に寄与していた。

ABD による Ams1 の詳細な認識機構を明らかにするため、Ams1 と Atg34 ABD との共結晶化を行なった。Ams1 の立体構造をモデル分子とした分子置換法により位相を決定し、構造の精密化は 3.0 Å 分解能の回折データを用いて行なった。Ams1 四量体に対して Atg34 ABD 四分子の比率で結合しており、その結合は Atg34 ABD の immunoglobulin-fold の側面を介した結合様式であった。Atg34 の Ams1 との結合に直接関与しているアミノ酸残基 (E257, D258, H296, W307, F309) を Ala に置換し、Ams1 との *in vitro* pull-down assay を行なった。その結果、これらのアミノ酸残基は Ams1 との結合に関与しており、溶液中でも結晶構造で見られる結合様式で結合していることを示した。Atg19 においても同様の実験を行なったところ、概ね Atg34 の場合と似た結果が得られた。以上の結果から、Atg19 ABD, Atg34 ABD は自身の immunoglobulin-fold の側面を介して Ams1 を認識することを示した。また、Ams1 との結合能を欠いた変異体である Atg19^{F323A} または Atg34^{F309A} を発現させた株では Ams1-GFP は液胞へ輸送されなかった。以上の結果から、Ams1 の認識に必要な Atg19, Atg34 の Phe 残基は実際に Ams1 のオートファジーによる液胞輸送に関与していることを示した。

2. 膜形成因子 Atg18 の構造機能解析

Atg18 の立体構造情報を得るため、出芽酵母の他にも様々な生物種由来の Atg18 及びそのホモログについて結晶化を試みた。*K. marxianus* 由来の Atg18 パラログである Hsv2 を用いることで結晶を得ることに成功した。Se-Met 誘導体結晶を作製し、MAD 法により位相を決定した。構造の精密化は 2.6 Å 分解能の回折データを用いて行った。Hsv2 の立体構造は 7 枚のブレードから構成する β プロペラ構造を形成していた。PI3P, PI(3,5)P₂ との結合に関与する FRRG 配列付近のブレード 5, 6 には二つの塩基性ポケットが存在しており (site 1, site 2), それぞれには結晶化母液由来の硫酸イオンと酸性残基が配位していた。このことから、site 1, site 2 の二つのポケットにイノシトールリン脂質のリン酸基が結合する可能性が示唆された。Atg18 上で Hsv2 の site 1, site 2 を形成するアミノ酸残基に相当する残基を変異させると Atg18 の液胞膜への局在は見られなくなった。以上の結果から、site 1, site 2 は実際にイノシトールリン脂質との結合に関与していることを示した。

Hsv2 の構造上に Atg18 ホモログ間で保存されたアミノ酸残基をマッピングすると、site1, site 2 が存在するブレード 5, 6 の他にブレード 2 の領域も高度に保存されていることがわかる。ブレード 2 の保存されたアミノ酸残基を変異し、オートファジー活性を測定した結果、F54A/S55A 変異体及び P72A/R73A 変異体発現株において有意にオートファジー活性の減少が見られた。これらの変異体は正常に液胞膜に局在するため、イノシトールリン脂質の結合には影響は無かった。よって Atg18 のもう一つの結合相手である Atg2 との結合に影響がある可能性がある。それを確かめるため、F54A/S55A 変異体及び P72A/R73A 変異体において Atg2 との免疫沈降実験を行った。その結果、F54A/S55A 変異体では Atg2 との結合は弱くなり、P72A/R73A 変異体では、Atg2 と全く結合しなかった。site 1, site 2 の変異である H244A/H315A 変異による Atg2 との結合への影響は見られなかった。以上の結果から、Atg18 はブレード 2 を介して Atg2 と結合し、ブレード 5, 6 は Atg2 との結合には関与しないことを示した。

Atg18 のブレード 2 に存在する F54/S55 及び P72/R73 は互いに β プロペラ構造上の反対に位置している。このことから、Atg2 はリング状の構造をした Atg18 のブレード 2 の領域を掴むように相互作用していることが示唆される。また、ブレード 2 は site 1, site 2 が存在するブレード 5, 6 から離れて位置している。そのため、Atg18 がブレード 5, 6 の領域を介して PI3P を含む膜に結合しても Atg2 との結合には影響が無いと考えられる。

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	主席研究員	野 田 展 生 (微生物化学研究所)

学 位 論 文 題 名

Structural and functional analyses of receptor proteins, Atg19 and Atg34, and the membrane-forming factor, Atg18, in selective autophagy

(選択的オートファジーにおける受容体Atg19, Atg34及び膜形成因子Atg18の
構造機能解析)

博士學位論文審査等の結果について (報告)

オートファジーは飢餓等に応じてオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体により細胞質の一部を無作為に取り囲み、液胞/リソソームに輸送し分解することで、細胞内成分の再構成に関わっている。しかし近年、オートファジーは状況に応じてオルガネラ、タンパク質凝集体、細胞内に侵入した細菌などを特異的に認識し、それらの分解、除去にも関与していることが明らかになった。このような選択的オートファジーは癌、神経変性疾患、感染症など様々な疾病に関与しているが、基本メカニズムである「分解対象の認識機構」及び「オートファゴソームの形成機構」に関する知見は乏しい。

著者はこれら基本メカニズムの解明を目的として、選択的オートファジーの積荷である Ams1, Ape1 の認識に関与する受容体 Atg19, Atg34 及びオートファゴソームの形成に関与する Atg18 の構造機能解析を行なった。本論文ではその研究の成果が述べられている。

第一章において、一般的な研究背景、概要を述べた後、第二章では、Atg19, Atg34 の Ams1 結合ドメイン(ABD)の同定及び ABD の構造機能解析について述べられている。限定分解法及び *in vitro* pulldown assay により ABD を同定している。また、出芽酵母において ABD を欠損させると、Ams1 は液胞へ輸送されないが、もう一つの積荷である Ape1 の液胞輸送は正常であることから、ABD は Ams1 の液胞輸送に特化して関わることを示している。さらに Atg19 ABD, Atg34 ABD の立体構造を NMR 法により決定している。両者の構造はよく似た immunoglobulin-fold を形成しており、保存されたループ領域の変異実験により、ABD の DE ループ上の His 残基が Ams1 のオートファジーによる液胞輸送に重要であることを示している。

第三章では第二章の研究を進展させ、ABD による Ams1 認識の詳細な分子機構を明らかにするため、Ams1 の遊離型及び Atg34 ABD 結合型の結晶構造解析について述べられている。Ams1 全長を *Pichia pastoris* の系を用いて発現、精製、結晶化した後、Pt を用いた多波長異常散乱法によりその構造を 2.3 Å 分解能で決定することに成功している。Ams1 は配列上、糖質加水分解酵素ファミリー-38 (GH38) に属しているが、他の GH38 とは異なり Ams1 は自身のユニークな N 末端ドメインを介して対称的な四量体を形成している。また、Ams1 と Atg34 ABD の共結晶化を行ない、Ams1 をモデルとした分子置換法により Ams1-Atg34 ABD 複合体の結晶構造を 3.0 Å 分解能で決定している。Atg34 ABD は Ams1 四量体に対し四分子結合しており、DE ループだけではなく、その反対側に位置した AB ループ、EF ループも Ams1 との結合に関与することを見出している。ABD の点変異体を用いた *in vitro* pulldown assay により、結晶構造で見られた Ams1 との結合様式は妥当であることを示している。さらに、Ams1-Atg34 ABD 複合体形成に関与しているアミノ酸

残基を変異すると、Ams1 のオートファジーによる液胞輸送は抑制されることから、結晶構造で見られた結合様式で ABD は Ams1 を認識していることを示唆している。抗体などに見られる一般的な immunoglobulin-fold は片側に集合したループ領域を介してターゲットを認識するが、ABD は通常の immunoglobulin-fold の認識様式とは異なり、両側のループを用いた非常にユニークな様式で Ams1 を認識している。Ams1-Atg34 ABD 複合体の立体構造は選択的オートファジーの受容体により認識されている積荷として初めての構造であり、このようなユニークな結合様式を見出したことは、選択的オートファジーの積荷認識機構の解明に大きく貢献すると考えられる。

第四章では、Atg18 に着目し、そのパラログである Hsv2 の構造解析を行ない、得られた構造に基づいた Atg18 の機能解析について述べられている。Atg18 は Atg2 及び PtdIns3P と複合体を形成することでオートファゴソーム形成に重要な役割を担っている。また、Atg18 は PtdIns(3,5)P₂ と結合することで液胞形態の制御にも関与している。耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来の Hsv2 を用いることで Hsv2 の結晶を得ることに成功し、Se を用いた多波長異常散乱法によりその結晶構造を 2.6 Å 分解能で決定している。Hsv2 は 7 枚のブレード（羽根）から成る β プロペラ構造を形成している。Hsv2 の立体構造に基づいた Atg18 の変異実験により、Atg18 にはブレード 5, 6 の領域にイノシトールリン脂質結合領域が二つ存在すること、及びブレード 2 の領域が Atg2 との結合に重要であることを明らかにしている。ブレード 5, 6 及びブレード 2 は互いに離れて位置していることから、Atg18 は Atg2 及び PtdIns3P と同時に結合しうることが示唆されている。さらに、ブレード 2 の変異により、Atg18 の液胞形態制御機能には影響を与えることなく、オートファジーが特異的に抑制されることを明らかにしている。これらの結果から、Atg18 は脂質膜上で Atg2 及び PtdIns3P とそれぞれ異なる領域を介して同時に結合することで、オートファゴソーム形成に関与することを示唆している。

以上のように、本論文は、選択的オートファジーの積荷認識機構及びオートファゴソーム形成に関連する因子の機能についての新知見を得たものであり、オートファジーの基本メカニズムの解明に貢献するところ大なるものがある。

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