

16. オートファジーの始動機構の解明と特異的制御剤の開発

野田 展生

*微生物化学研究会 微生物化学研究所 分子構造解析部

Key words : オートファジー, Atg1 複合体, 構造生物学

緒 言

オートファジーは真核細胞に普遍的に保存された細胞内分解系であり、蛋白質やオルガネラ等の分解を通して細胞の恒常性維持に働いており、その異常は神経変性疾患などの重篤な疾病を引き起こす。オートファジーはオートファゴソームと呼ばれる二重膜オルガネラの新生を伴い、オートファゴソームが分解対象を隔離してリソソームへと輸送することで分解を行う。オートファゴソームの形成には多くの Atg 蛋白質が関与するが、そのうち最上流で機能するのが Atg1 複合体である。これまでの研究から、栄養飢餓になると Atg13 の脱リン酸化を通して Atg1 複合体が形成され、オートファジーが始動することがわかっていたが¹⁾、オートファゴソーム形成の場がどのように作られ、そしてそれがどのような構造を持っているのかわかっていなかった。本研究ではオートファジー始動の分子機構解明のため、Atg1 複合体に関する構造機能解析を行った。

方 法

Atg13 は二次構造予測から特定の立体構造を持たない天然変性領域 (IDR) を多く含むと予想された。そこで C 末端にマルトース結合蛋白質 (MBP) を付加した全長 Atg13 について高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて観察した。Atg13 の IDR 内の Atg17 結合領域の探索は精製リコンビナント蛋白質を用いたプルダウンアッセイにて行った。解離定数の決定は等温滴定カロリメータ iTTC200 を用いて 25°C で行った。Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶化は蒸気拡散法により 20°C で行った。PEGMME5000 を沈殿剤として pH 8.0 で結晶を得た。X 線回折データは大型放射光施設 Spring-8 のビームライン BL41XU にて収集し、HKL2000 を用いてデータ処理を行った。MOLREP を用いた分子置換法により初期構造を決定し、CNS および REFMAC5 を用いて構造の精密化を、COOT を用いてモデルの修正を行った。Atg1 複合体の各因子はすべて大腸菌にてリコンビナント蛋白質として発現させ、各種クロマトグラフィーにより精製を行った。Atg1 複合体のゲルろ過分析は Superose 6 カラムを用いた。分析超遠心は沈降速度法にて行い、装置として Optima XL-I および An50Ti ローターを用い、回転数は 40,000 rpm、温度は 20°C で行った。蛍光顕微鏡観察は CCD カメラ ImagEM および 150 倍の対物レンズ UAPON 150XOTIRF を備えた倒立型蛍光顕微鏡 IX81 を用い、GFP と mCherry の励起には 488 nm および 561 nm レーザーを用いた。

結 果

高速 AFM 観察の結果、Atg13 は N 末端にある HORMA ドメイン以外は特定の立体構造を持たない IDR であることが明らかとなった (図 1) ²⁾。

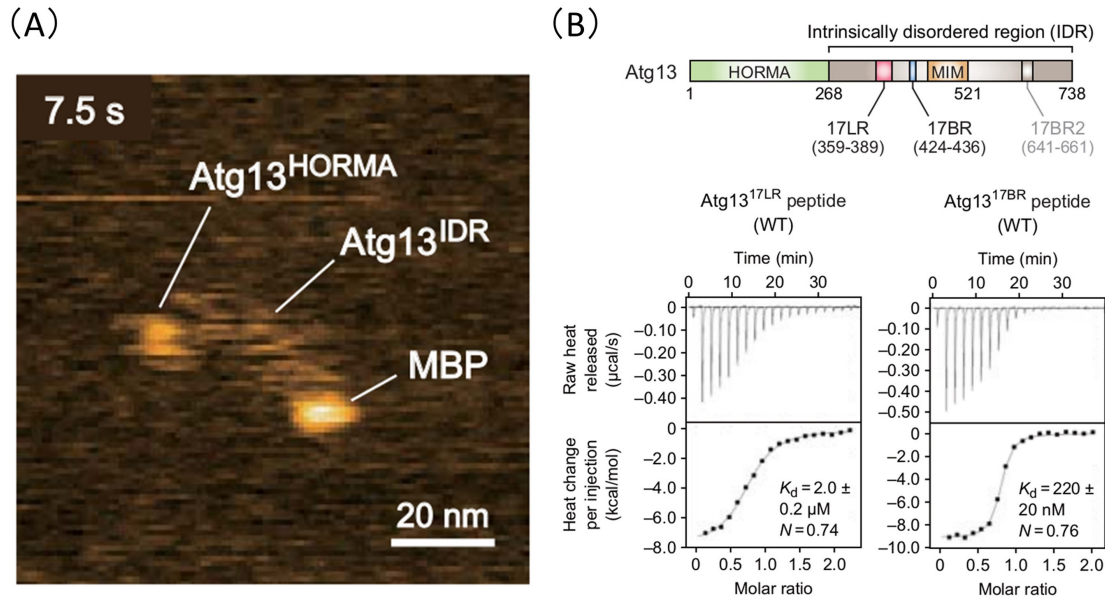


図1. Atg13のひも状領域には2つのAtg17結合部位が存在する

- (A) Atg13全長の高速AFM像。Atg13のC末端にはMBPタグが付加されている。
 (B) Atg13の天然変性領域に含まれる2つのAtg17結合部位。

これまで我々はAtg13内にAtg1結合領域であるMIMとAtg17結合領域である17BRを同定、報告してきたが、今回第二のAtg17結合領域である17LRを見出した(図1)。17LRは17BRに比べて一桁Atg17への結合が弱かったが、17LRのみを欠損させたAtg13はAtg13欠損酵母のオートファジー不全を回復できなかったことから、17LRはオートファジーに必須であることがわかった。結晶構造解析の結果、17BRはAtg17二量体のS字構造の両端に結合するのに対し、17LRは二量体形成部位、すなわちS字構造の中心付近に結合することがわかった²⁾。17BRと17LRの結合部位は互いに13nm離れており、さらに両者の間にはAtg29およびAtg31の結合部位が存在した。一方Atg13の17BRと17LRの間には40残基ほどしか存在せず、Atg13が2つの結合領域を用いて同時に同じ分子のAtg17に結合するのは物理的に難しいことが予想された。精製蛋白質を用いてAtg1複合体を再構成し、ゲルろ過分析を行った結果、Atg1複合体は数百万Daに及ぶ巨大複合体として振舞った。一方、17BRのAtg17結合能をなくすF430A変異体や、17LRのAtg17結合能をなくすF375A変異体を用いた場合はそのような巨大複合体は形成されなくなった。分析超遠心でも野生型Atg1複合体は沈降係数15~20Sの巨大複合体を形成するのに対し、F375AやF430A変異体ではそのような巨大複合体が見られなくなった(図2)。

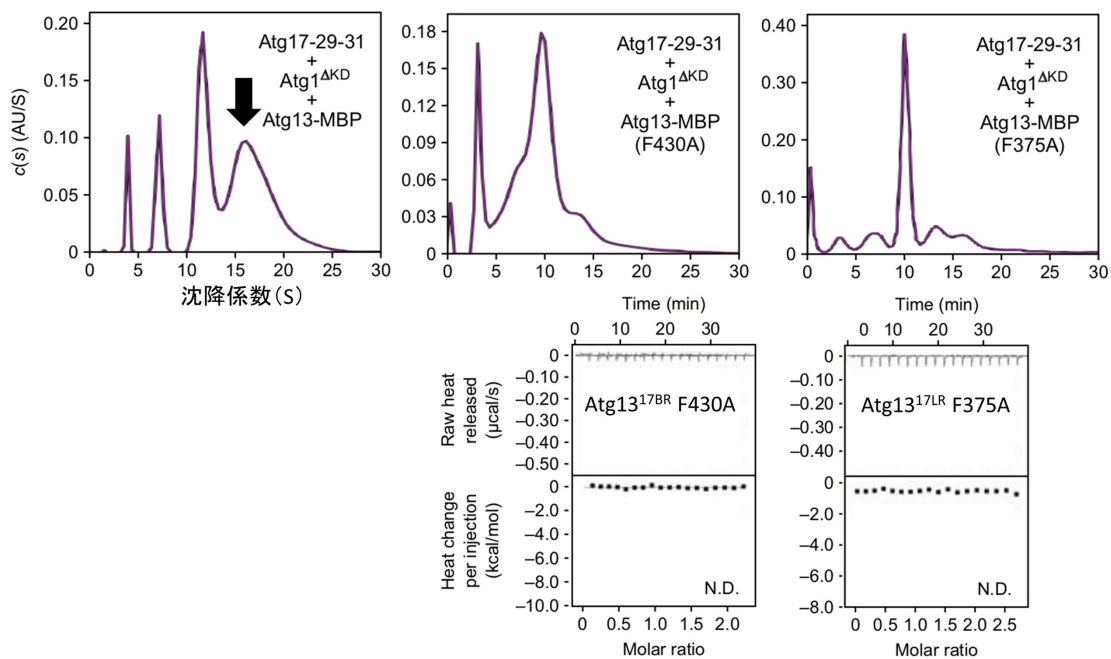


図 2. Atg1 複合体の超遠心分析

野生型の Atg13 を用いた際に出現した沈降係数 20S 前後のピークが、Atg17 との結合を減弱する F375A (17LR) や F430A (17BR) 変異体を用いた場合はほとんど見られない。これら変異が Atg17 との結合を減弱することは ITC にて確認した (図下)。

すなわち Atg13 は 2 つの結合領域を用いて異なる Atg17 分子に結合することで Atg17 同士を架橋し、Atg1 複合体の巨大化を引き起こすというモデルが考えられた (図 3)。

Atg13による2つのAtg17分子への結合モデル

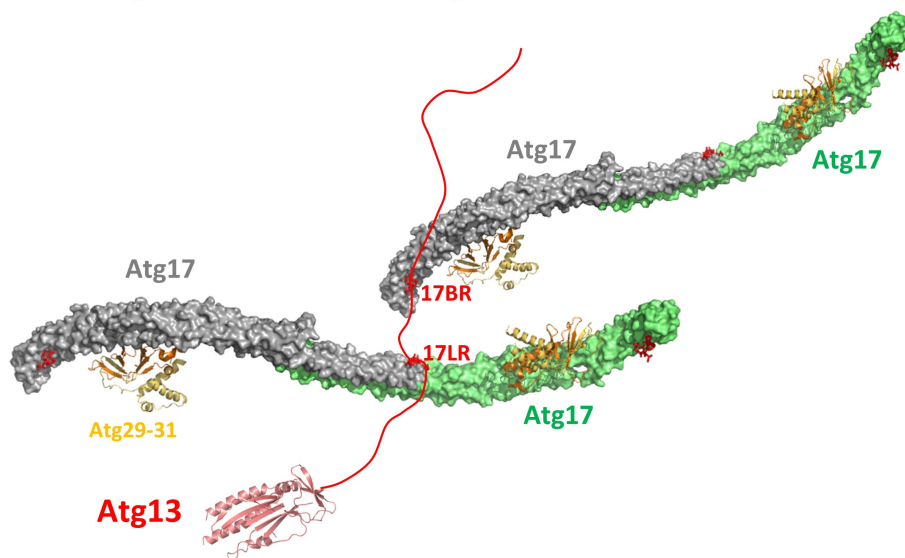


図 3. Atg13 による Atg17 の架橋モデル

Atg13 はひも状領域にある 17LR および 17BR を用いてそれぞれ異なる Atg17 分子に結合することで Atg17 分子同士を架橋し、高次 Atg1 複合体の形成を促す。

出芽酵母を用いた解析の結果、F375A や F430A 変異を導入するとオートファゴソーム形成の場である PAS が形成されなくなり、オートファジーも進行しなくなった。さらにオートファジーの初期の重要なイベントである Atg1 の自己リン酸化や Atg9 小胞への PAS へのリクルート、Atg9 のリン酸化も起きなくなった²⁾。

考 察

栄養飢餓などによりオートファジーが誘導されると、Atg 蛋白質群が集まってオートファゴソーム形成の場を作り、そこからオートファゴソームの形成が進むと考えられる。オートファゴソーム形成の場がどのような構造的実体であるのか、そしてそれがどのように構築されるのかはこれまでよくわかっていなかった。今回の解析の結果、飢餓により形成された Atg1 複合体は天然変性蛋白質 Atg13 の働きにより互いに架橋され、巨大 Atg1 複合体が形成されることが明らかとなった。巨大 Atg1 複合体が形成される意義についてはいまだ未解明の部分も多いが、少なくとも以下の2つの役割があることが酵母を用いた解析で示唆された：①Atg1 が濃縮されることで Atg1 同士の自己リン酸化が進行し、Atg1 のキナーゼ活性が上昇する。②Atg13 が濃縮されることで Atg13 と Atg9 の間の弱い相互作用が増強され、オートファゴソームの最初の膜の材料と考えられている Atg9 小胞のリクルートが進む。Atg9 小胞が集まったのち、Atg9 小胞同士が融合することで初期隔離膜となり、さらに別の膜の材料が小胞体や他のオルガネラから供給されることで隔離膜の伸長が進むと考えられるが、それらのメカニズムの解明は更なる解析が必要である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、微生物化学研究会微生物化学研究所の藤岡優子、鈴木浩典、東京工業大学科学技術創成研究院の大隅良典、山本林、鈴木翔、角田千香、金沢大学理工研究域の安藤敏夫、能代大輔、横浜市立大学先端医科学研究センターの平野久および木村弥生である。

文 献

- 1) Suzuki H, Osawa T, Fujioka Y, Noda NN. Structural biology of the core autophagy machinery. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;43:10-17. doi: 10.1016/j.sbi.2016.09.010. PubMed PMID: 27723509.
- 2) Yamamoto H, Fujioka Y, Suzuki SW, Noshiro D, Suzuki H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Ando T, Noda NN, Ohsumi Y. The Intrinsically Disordered Protein Atg13 Mediates Supramolecular Assembly of Autophagy Initiation Complexes. *Dev Cell.* 2016;38(1):86-99. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.015. PubMed PMID: 27404361