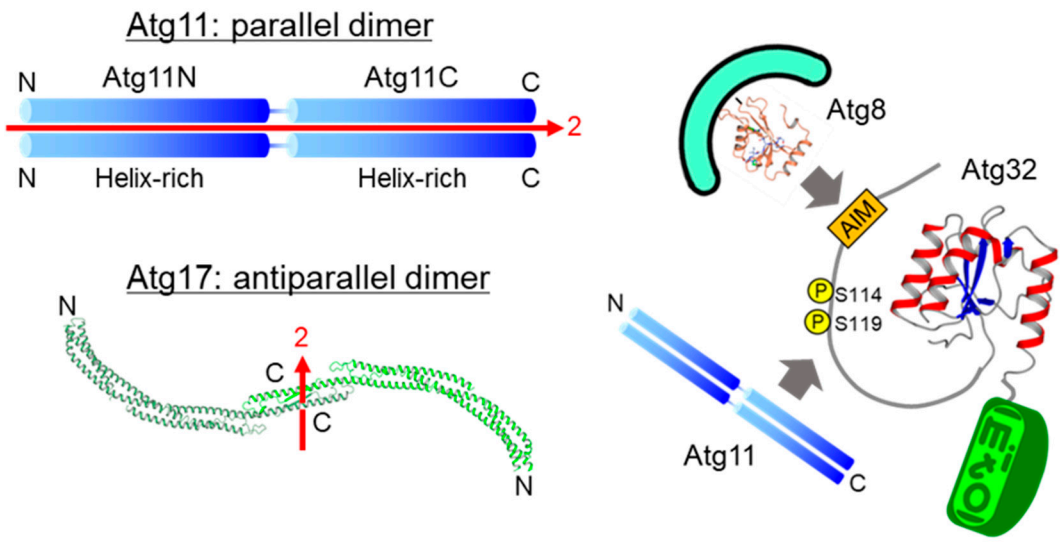
156　オートファジーによるミトコンドリア分解の構造基盤	鈴木　浩典

【目的】オートファジーは真核生物に保存された細胞内分解システムであり、飢餓などに応じて細胞質成分を非選択的に分解して、細胞内成分の再構成に関与している。一方で、細胞の恒常性維持のために、ミトコンドリアなどの損傷したオルガネラや細胞に侵入してきた細菌などを選択的に認識して分解することにもオートファジーは関与している。後者は特に選択的オートファジーと呼ばれ、がんや神経変性疾患、感染症などの疾患に関与しているものの、その基本的なメカニズムに関する知見は乏しい。本研究では、すべての選択的オートファジー経路に関わるAtg11と、ミトコンドリア外膜上に発現しオートファジーによる選択的ミトコンドリア分解（マイトファジー）に関わるAtg32に着目した。これらの分子構造や相互作用様式を明らかにすることで、選択的オートファジーの分子機構をタンパク質レベルで明らかにすることを目指した。

【方法】Atg11およびAtg32、両者に結合するとされるAtg8を昆虫細胞発現系または大腸菌発現系を用いて調製した。動的光散乱法、CDスペクトル、超遠心分析などにより各種試料の物理化学的性質を確認した。Atg32の細胞質領域C末端側については、X線結晶構造解析により構造を決定した。生化学的な手法と併せて、巨大脂質膜リポソームを用いた脂質膜上でのタンパク質間相互作用の解析を行った。

【結果】種々の方法による性状解析から、巨大タンパク質Atg11は細長い分子であり、かつ平行な二量体を形成していることが示唆された。結晶構造解析により、Atg32の細胞質領域C末端側は低分子量GTPaseに類似した立体構造を有することが明らかとなった。タンパク質間相互作用解析により、Atg32はAtg11とAtg8両者に結合するが、Atg11とAtg8の間に直接的な相互作用はないことが明らかとなった。

マイトファジーに関わるタンパク質間の相互作用



156. オートファジーによるミトコンドリア分解の構造基盤

鈴木　浩典

*微生物化学研究会 微生物化学研究所 構造生物学研究部

Key words：オートファジー，ミトコンドリア，タンパク質ータンパク質相互作用

緒　言

オートファジーは真核生物において広く保存された基本的な細胞内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張し、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またはリソソームと融合し、内膜ごと液胞または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またはリソソームへと輸送し分解することで、細胞内成分の再構成に関与する。他方、オートファジーは細胞の恒常性維持のため、損傷したミトコンドリアや過剰なペルオキシソームなどのオルガネラ、タンパク質凝集体、細胞内に侵入した細菌などを選択的に認識し、それらの分解・除去にも関与することが明らかとなっている。このような選択的オートファジーは、ガンや神経変性疾患、感染症など様々な疾患に関与しているが、どのようにオートファジーが選択的な分解を行っているのか、その基本的な分子機構に関する知見は乏しい。

出芽酵母においては、これまで約 40 種類のオートファジー関連（Atg）タンパク質が同定されている。このうち 18 種類がコア Atg タンパク質と呼ばれ、オートファゴソーム形成に必須のタンパク質群である。コア Atg タンパク質群のうち、最上流で機能するのが、Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31 の 5 つの因子で構成される Atg1 複合体である。また、ユビキチン様タンパク質である Atg8 が複数のステップで重要な役割を担う。選択的オートファジーにおいてもコア Atg タンパク質は必須であるが、それらに加えて、分解対象となるオルガネラの外膜上には、目印となるレセプタータンパク質が発現しており、ミトコンドリアでは Atg32（マイトファジー）、ペルオキシソームでは Atg36（ペキソファジー）、核では Atg39（ヌクレオファジー）、小胞体では Atg40（ER ファジー）が該当する。各選択的オートファジー経路においては、Atg11 がレセプタータンパク質を認識し、分解対象の上に Atg1 複合体との相互作用を介してコア Atg タンパク質群をリクルートする。すなわち、Atg11 は分解対象とオートファゴソーム形成とをつなぐ極めて重要な分子である。しかし、Atg11 に関するタンパク質レベルでの研究は皆無である。

ミトコンドリア外膜上に発現している Atg32 は一回膜貫通型のタンパク質である。前述のように Atg11 に認識され、隔離膜形成の開始点である Atg1 複合体との相互作用を介して、ミトコンドリアごとオートファゴソームに包まれることでマイトファジーが進行する。しかし、Atg32 についても生化学的な研究はほとんど進められておらず、Yeast two-hybrid system を用いた Atg11 との相互作用部位の探索や、リン酸化部位の同定といった細胞生物学的な研究のみである。

本研究では、すべての選択的オートファジーレセプターの認識に関わる Atg11 とマイトファジーの目印となる Atg32 に焦点をあて、生化学・構造生物学的な観点から研究を進め、選択的オートファジーの基本的な分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

*現在の所属：東邦大学 薬学部 薬剤学教室

方　法

1.　Atg11 の発現・精製と性状解析

出芽酵母由来 Atg11 は 1,178 残基のアミノ酸からなる巨大なタンパク質である。バキュロウイルス－昆虫細胞発現系を用いて全長体の調製を行った。また、Atg11 を N 末端側 646 アミノ酸残基（Atg11N）と C 末端側 479 アミノ酸残基（Atg11C）に分けたコンストラクトを作製し、それぞれ大腸菌で発現させ、SDS-PAGE で単一バンドとなる試料を調製した。調製した各試料は、動的光散乱法（DLS）、円偏光二色性（CD）スペクトル、および超遠心分析により、その物理化学的特性を評価した。また、巨大脂質膜リポソーム（Giant Unilamellar Vesicle : GUV）を用いた解析に用いるために、これらの発現コンストラクトに SNAP-tag を付加した試料も同様に調製した。蛍光試薬として、SNAP-Surface® Alexa Fluor 647（AF647）を用いた。

2.　Atg32 の発現・精製、性状解析と結晶構造解析

出芽酵母由来 Atg32 は Atg11 との相互作用に関わる細胞質領域と、それを N 末端側（Atg32N）および C 末端側（Atg32C）に分けたコンストラクトを作製し、各タンパク質を大腸菌で発現させ、単一バンドとして精製した。精製した試料は CD スペクトルを測定し、二次構造の評価を行った。また、GUV を用いた解析のため、Atg32 の C 末端に GFP-Cys を付加した試料も同様に調製した。Atg32C の結晶を蒸気拡散法により得た。X 線回折強度データは大型放射光施設 Photon Factory のビームライン BL-1A にて収集し、HKL2000 を用いてデータ処理を行った。SeMet を用いた単波長異常分散法により初期構造を決定し、プログラム PHENIX 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。

3.　Atg11 と Atg32、Atg8 の相互作用解析

Atg11 と Atg32、Atg8 各タンパク質間の相互作用解析は精製タンパク質を用いたプルダウンアッセイにより行うとともに、GUV を用いて脂質膜上での相互作用も確認した。GUV での実験に用いた Atg8 は、N 末端側に mCherry を融合した mCherry-Atg8、または Atg8 の C 末端に Cys を付加し、Atto425 で標識した Atg8-Cys（Atto425）を用いた。

結果および考察

1.　Atg11 の物理化学的性質

Atg11 は二次構造予測から coiled-coil タンパク質であると予測された。調製した全長体、Atg11N、Atg11C を CD スペクトルによって二次構造を確認したところ、いずれもα-helix に富んだ二次構造を有していた（図 1a）。各試料をゲル濾過クロマトグラフィーおよび動的光散乱によって分子量を見積もると、計算分子量よりもはるかに大きな分子量を示しており、細長い構造を有することが示唆された。超遠心分析により会合状態を検討したところ、いずれも二量体で存在していることが明らかとなった（図 1b～d）。このことから、Atg11 は細長い形状の分子で、平行な二量体を形成していると考えられた。Atg11 の機能ホモログとされる Atg17 は、同様に coiled-coil タンパク質であり、二量体として存在するが、C 末端同士の会合により逆平行の二量体を形成しているため、両者は構造的に大きく異なると考えられた［1］。

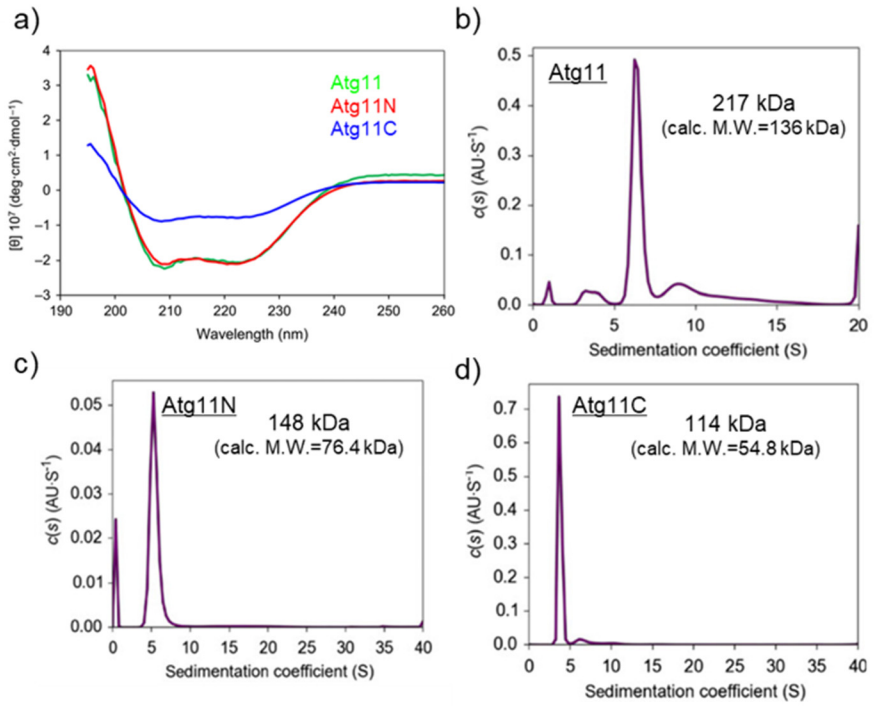


図 1. Atg11 の二次構造と会合状態

a) Atg11 全長および Atg11N、Atg11C の CD スペクトル。

b) Atg11 全長の超遠心分析。

c) Atg11N の超遠心分析。

d) Atg11C の超遠心分析。

2. Atg32 の構造

調製した Atg32 細胞質領域の二次構造を CD スペクトルによって確認したところ、全体としてはα-helix に富んだ二次構造を有していた（図 2a）。N 末端側と C 末端側に分けた Atg32N と Atg32C では、Atg32N がランダムコイル状の構造を、Atg32C がα-helix に富んだ二次構造を有することが明らかとなった。Atg32C の結晶構造解析を行ったところ、Atg32C の全体構造は球状の安定なドメイン構造を示した（図 2b）。相同性の高い立体構造を検索した結果、低分子量 GTPase に類似した構造であることが明らかとなった（図 2c）。ただし、Atg32C は GTP 結合部位を持たないことから、GTPase 活性は持たないと考えられる。

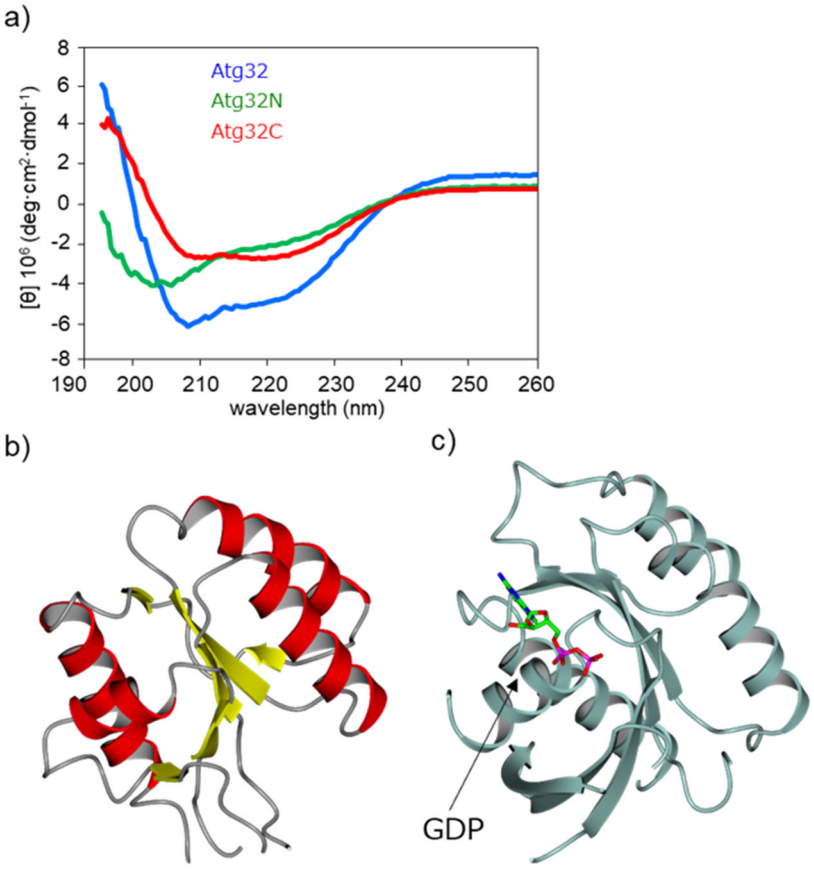


図 2. Atg32 の構造

a) Atg32 細胞質領域および Atg32N、Atg32C の CD スペクトル。

b) Atg32C の結晶構造のリボンモデル。

c) 低分子量 GTPase である Rab8 の結晶構造のリボンモデル。
結合した GDP をスティックモデルで示した。

3. Atg11 と Atg32、Atg8 三者の相互作用関係

酵母を用いた実験から、Atg11 と Atg32、Atg8 の三者はマイトファジーの過程で共局在することが報告されていた［2〜4］。プルダウンアッセイにより、タンパク質レベルでこれらの相互作用を確認したところ、Atg32 は Atg11 と Atg8 の両者と結合することができるが（図 3a、b）、Atg11 と Atg8 の間に直接的な相互作用はないことがわかった（図 3c）。さらに GUV を用いて三者の相互作用関係の確認を行った。Atg32-GFP の C 末端に Cys を付加した試料と、マレイミド基を有する脂質 PEMCC を含む GUV とを混合し、GUV 上にマレイミド反応により Atg32-GFP を共有結合させた。これに mCherry-Atg8 または Atg11-SNAP（AF647）を添加すると、プルダウンアッセイの結果と同様に、Atg32 は Atg8 または Atg11 と共局在することが明らかとなった。また、同様に Atg8-Cys（Atto425）を結合した GUV に Atg11-SNAP（AF647）を添加した場合は、両者は共局在することはなかった。以上のことから、酵母のマイトファジーの過程で見られた Atg11 と Atg32、Atg8 の共局在は、Atg32 を介した三者の相互作用であることが明らかとなった。現在、三者の相互作用について、構造生物学的に明らかにするとともに、酵母を用いた細胞生物学的な解析にも取り組んでいる。

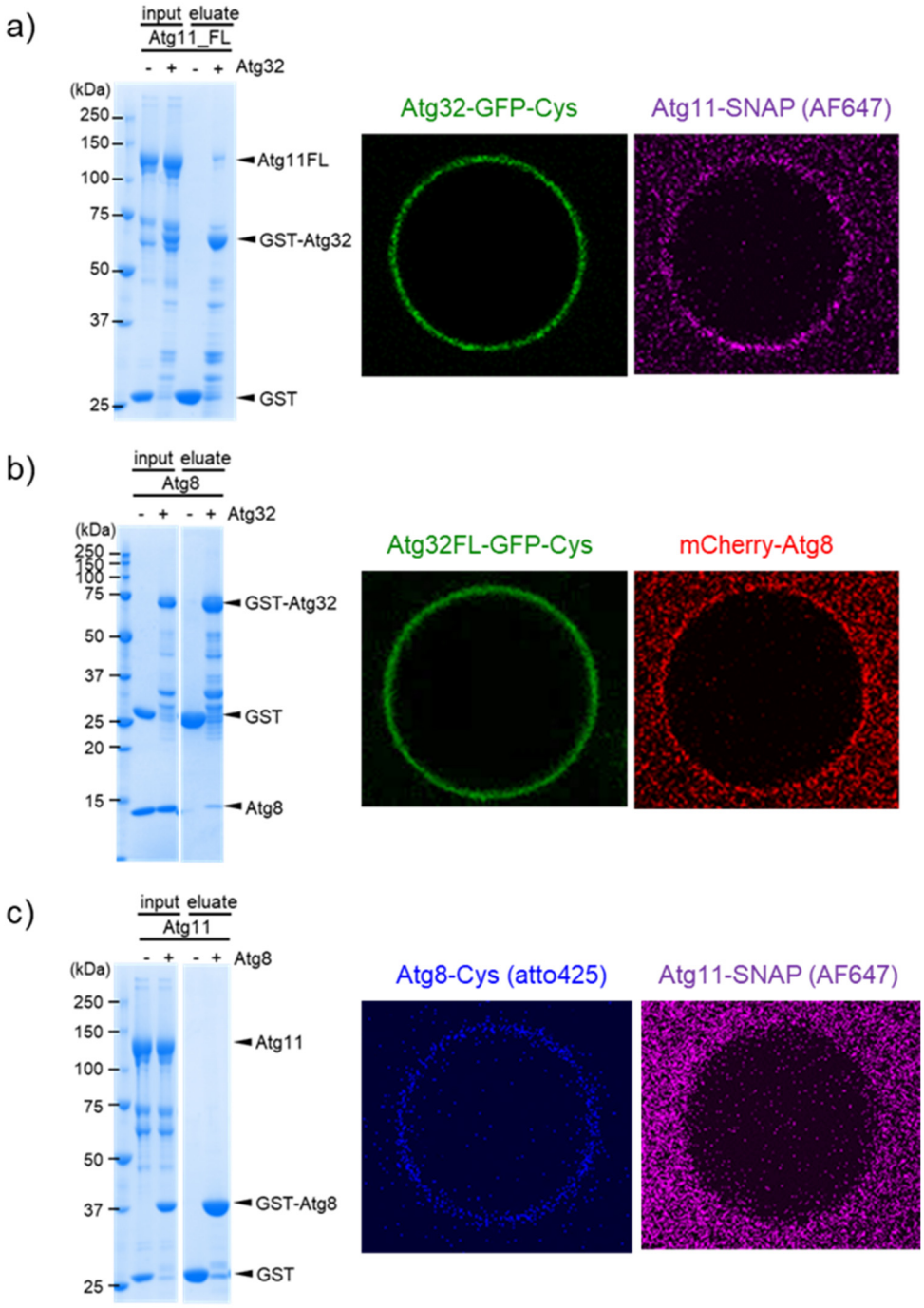


図 3. Atg11、Atg32 および Atg8 の相互作用

a）Atg11 と Atg32 の相互作用。

b）Atg32 と Atg8 の相互作用。

c）Atg8 と Atg11 の相互作用。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、（公財）微生物化学研究会微生物化学研究所構造生物学研究部の野田展生部長、丸山達郎博士、Jahangir Md. Alam 博士である。

文　献

1） Suzuki H., Noda, N. N. Biophysical characterization of Atg11, a scaffold protein essential for selective autophagy in yeast. FEBS Open Bio., 2017 Dec 4;8(1):110-116. PMID: 29321961 DOI: 10.1002/2211-5463.12355.

2） Li F, Chung T, Vierstra R.D. AUTOPHAGY-RELATED11 Plays a Critical Role in General Autophagy- and Senescence-Induced Mitophagy in Arabidopsis. Plant Cell, 2014 Feb;26(2):788-807. PMID: 24563201 DOI: 10.1105/tpc.113.120014.

3） Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky D.J. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectively during mitophagy. Dev Cell. 2009 Jul;17(1):98-109. PMID: 19619495 DOI: 10.1016/j.devcel.2009.06.014.

4） Mao K, Wang K, Liu X, Klionsky D.J. The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. Dev Cell. 2013 Jul 15;26(1):9-18. PMID 23810512 DOI: 10.1016/j.devcel.2013.05.024.