

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」
平成25年度採択研究代表者

H28 年度
実績報告書

野田 展生

(公財) 微生物化学研究会微生物化学研究所
主席研究員

オートファジーの膜動態解明を志向した構造生命科学

§ 1. 研究実施体制

(1) 野田グループ

- ① 研究代表者: 野田 展生 ((公財)微生物化学研究会微生物化学研究所、主席研究員)
- ② 研究項目
 - ・X線解析と機能解析による最上流 Atg 因子群の集積機構の解析
 - ・X線解析と機能解析によるタンパク質凝集体の Atg19 による選択的認識機構の解析

(2) 中戸川グループ

- ① 主たる共同研究者: 中戸川 仁 (東京工業大学大学院生命理工学研究科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ヌクレオファジーレセプターAtg39 および ER ファジーレセプターAtg40 の分子機能と細胞内動態の解析
 - ・Atg8 に結合する新規タンパク質の同定と解析

§ 2. 研究実施の概要

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システムである。オートファジーの最大の特徴は、オートファゴソームの新生を伴う点であり、基本的にオートファゴソームで包み込んだものすべてを分解の場であるリソソームへと輸送し、分解する。オートファジーはこの特徴を利用し、蛋白質からオルガネラ、そして病原性細菌まで、種類もサイズも多様な対象を時には選択的に分解することで、生体を病気から守っている。オートファゴソーム形成は18種類の主要 Atg 因子群が担っており、それらが多様な相互作用を形成することで、オートファゴソーム形成を担うと考えられる。本研究課題では、構造生物学的手法、生化学的手法および細胞生物学的手法を組み合わせ用い、依然謎に包まれたオートファゴソームの形成機構を分子レベルで解明することを研究目標としている。平成28年度は主に以下の研究を実施した。

1) X線解析と機能解析による最上流 Atg 因子群の集積機構の解析

飢餓によりオートファジーが誘導されると、オートファジーを司る Atg タンパク質群が細胞内の一ヶ所に集積し、そこでオートファゴソームの形成が開始される。Atg1 複合体はすべての Atg 因子の中で最初にオートファゴソーム形成の場を集まる因子であり、数十コピーが集まることが知られていたが、そのメカニズムおよび意義はわかっていなかった。Atg1 複合体の因子の1つ Atg13 に関する構造機能解析を行い、Atg13 が天然変性領域に富んだひも状の構造を持つこと、そしてそのひも状構造内の二ヶ所で異なる2分子の Atg17 に結合することを見出した。更なる解析の結果、Atg13 は Atg1 複合体同士をひも状構造でつなぎ合わせ、Atg1 複合体の高次会合を引き起こすこと、それが細胞内でのオートファゴソーム形成の場の構築に極めて重要であることを明らかにした。さらに高次会合した Atg1 複合体は Atg1 のリン酸化活性を亢進させること、オートファゴソームの最初の膜材料である Atg9 小胞の集積を進めることを明らかにし、オートファジーの始動機構の詳細が分子レベルで明らかとなった(文献1)。

2) X線解析と機能解析によるタンパク質凝集体の Atg19 による選択的認識機構の解析

オートファジーはタンパク質凝集体やダメージを受けたオルガネラなどを選択的に分解することで、細胞の恒常性維持に働いている。酵母においてはアミノペプチダーゼ I(Ape1)という酵素が自身で凝集体を形成し、それをオートファジーが選択的に液胞へと運んでいることが知られている。Ape1 の構造機能解析を進めた結果、Ape1 は酵素本体で12量体を形成すること、アミノ末端に付加されたプロペプチド部分を使って3量体を形成すること、その結果12量体同士がつながれることで凝集体を形成することを明らかにした。さらに受容体 Atg19 との複合体の構造機能解析の結果、Atg19 は Ape1 凝集体の表面選択的に結合し凝集体表面を覆いつくすこと、そのことで Ape1 凝集体が過度に大きくなることを抑制し、オートファゴソームの中に取り込まれやすくしていることが明らかとなり、選択的オートファジーのメカニズムに関する新たな概念の確立に貢献した(文献2)。

3) ヌクレオファジーレセプター Atg39 および ER ファジーレセプター Atg40 の分子機能と細胞内動態の解析

これまでに、核および小胞体の一部がオートファジーで選択的に分解されることを明らかにし、それぞれのオートファジーによる分解の目印となるタンパク質として **Atg39** および **Atg40** を同定した。本年度、分子機構の問題については、まず、**Atg40** に小胞体膜上で膜曲率を発生させる機能があることなどを明らかにした。また、オートファジーによる核の分解においては、**Atg39** と協調して機能すると予想される分子を見いだすに至った。現在オートファジーによる各オルガネラの分解の生理的意義を明らかにするための解析を進めている。また、**Atg39**, **Atg40** の遺伝子の発現は転写レベルで調節されていることを示し、各遺伝子上流領域に、富栄養条件で転写を抑制するための配列が存在することを突き止めた。また、本研究により、**Atg39**, **Atg40** 以外にも複数、**Atg8** 結合タンパク質の候補を取得しており、昨年度より引き続き、それらの機能解析を、オートファゴソームの形成あるいは新規選択的オートファジー経路に関与する可能性を考慮して解析を進めている。

文献1 Yamamoto et al., *Dev. Cell* 38, 86-99 (2016)

文献2 Yamasaki et al., *Cell Rep.* 16, 19-27 (2016)