

野田 展生

微生物化学研究会微生物化学研究所  
部長

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 (微生物化学研究会微生物化学研究所 部長)

② 研究項目

- ・X線解析と機能解析による Atg8 の脂質化機構および脂質化 Atg8 の膜動態制御機構の解析
- ・最上流 Atg 因子群の集積機構および集積体の性質の解析

### (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

- ・選択的オートファジーにおける核および小胞体の断片化機構の解析
- ・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 29 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 Atg8 の脂質化機構および脂質化 Atg8 の膜動態制御機構の解析  
Atg8 は E1 酵素 Atg7 による活性化を受けたのち、E2, E3 酵素の働きでリン脂質ホスファチジルエタノールアミン (PE) と結合し、オートファジーにおける膜動態制御に働く。Atg7 と Atg8 は少なくとも2つの相互作用状態があることがこれまでわかっていたが、今回2つの状態を繋ぐ中間状態の複合体の結晶化に成功し、その構造を X 線結晶解析により決定した。構造情報およびそれに基づいた機能解析の結果、Atg8 はまず Atg7 の C 末端にある天然変性領域に結合したのち、Atg7 の活性ループと相互作用することでループ内にヘリックス構造を誘起し、その結果 Atg7 の自己阻害構造を解除することで活性システイン残基へとアクセスし、活性化を受けるといった一連のメカニズムを明らかにした(文献1)。形成した Atg8-PE はオートファジーにおける膜動態に重要な役割を担うが、具体的な分子機能はこれまで不明である。人工脂質二重層ナノディスクに組み込んだ Atg8-PE の NMR 解析の結果、PE 化により Atg8 の N 末端領域に構造変化が誘起され、外に伸びることで隣接した膜と相互作用することを見出した。実際に Atg8-PE ナノディスクは Atg8-PE の数に比例して高次会合体を形成した。すなわち Atg8-PE は膜同士を繋ぎとめる活性があり、それは N 末端領域が担うことを明らかにした(論文準備中)。さらに巨大リポソームに Atg8-PE を組込む *in vitro* 解析系を構築し、Atg8-PE が組込まれることで巨大リポソームの形状が変化し、膜の貫入が生じることを見出した。

### 2) 最上流 Atg 因子群の集積機構および集積体の性質の解析

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。Atg1,13,17,29,31 からなる 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る。昨年度までに、天然変性蛋白質 Atg13 が Atg1 複合体同士をつなぎ合わせ、Atg1 複合体の高次会合を引き起こすことを明らかにした。本年度は *in vitro* において Atg1 複合体の高次会合形成を詳細に解析した。その結果、Atg1 複合体は Atg13 依存的に液-液相分離を起こし、液体の性質を持った球状の会合体(液滴)を形成することを見出した。酵母における Atg1 複合体の集積体について FRAP 実験を行った結果、数十秒というオーダーでの早い蛍光回復が見られたことから、酵母

内での Atg1 複合体の集積体もまた液滴の性質を持つことが示唆された。一方選択的オートファジーにおいては、Atg17 の代わりに Atg11 が初期過程に機能する。Atg11 の生物物理学的解析を行った結果、Atg11 は逆平行である Atg17 とは対照的に、平行のコイルドコイル二量体を形成することが明らかとなった(文献 2)。

### 3) 選択的オートファジーにおける核および小胞体の断片化機構の解析

昨年度までの研究により、出芽酵母において、Atg8 と結合するタンパク質として Atg39 および Atg40 を同定し、これらが窒素源(アミノ酸など)の枯渇に応じて、核および小胞体の選択的オートファジー(それぞれ、ヌクレオファジー、ER ファジーと呼ぶ)を誘導することを明らかにした。これら経路においては、核および小胞体の一部がちぎり取られるようにして、オートファゴソームに取り込まれる。平成 29 年度も、引き続き、これら細胞小器官の断片化を引き起こすメカニズムの研究を進めた。ER ファジーに関しては、得られた結果にもとづいて、Atg40 は形成途中のオートファゴソーム膜に局在化する Atg8 との結合を介して、オートファゴソームに取り込まれようとする小胞体領域に濃縮され、その小胞体領域を折り畳み、切断して、オートファゴソームに積み込むというモデルを提唱するに至った。ヌクレオファジーについては、Atg40 が Atg39 と相互作用し、核の断片化にも関与することが明らかとなった。昨年度見いだした ESCRT-III の関与と合わせ、これら3つのタンパク質が協調して核を断片化するメカニズムの解明を進めている。また、本研究では他にも、Atg8 および Atg8-PE 結合系因子と相互作用する因子を複数同定した。これらの解析から、新たな選択的オートファジーの標的とその認識機構や、オートファゴソームの形成機構に関する重要な知見が得られており、本年度中に学術誌に投稿、発表することを目指して研究を進めている。

#### 代表的原著論文

文献 1 Yamaguchi et al., J. Mol. Biol. 430, 249-257 (2018)

文献 2 Suzuki & Noda, FEBS Open Bio 8, 110-116 (2017)