

野田 展生

公益財団法人微生物化学研究会 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 (研究機関別)

① 研究代表者: 野田 展生 (公益財団法人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 *in vitro* 解析による Atg8-PE 結合体形成反応の分子機構の解明
- ・X線解析と *in vitro* 解析による Atg8-PE 結合体の脱結合反応の制御機構の解明
- ・X線解析と *in vitro* 解析による膜上での Atg 因子群の相互作用解析
- ・X線解析と *in vitro* 解析による Atg 結合系を制御する新規因子群と Atg 因子との相互作用解析

(2) 稲垣グループ (研究機関別)

① 主たる共同研究者: 稲垣 冬彦 (北海道大学大学院先端生命科学研究院、特任教授)

② 研究項目

- ・NMR 法による Atg8-PE 結合体形成反応の分子機構の解明
- ・NMR 法による Atg8-PE 結合体の脱結合反応の制御機構の解明
- ・NMR 法による膜上での Atg 因子群の相互作用解析
- ・NMR 法による Atg 結合系を制御する新規因子群と Atg 因子との相互作用解析

(3) 中戸川グループ (研究機関別)

① 主たる共同研究者: 中戸川 仁 (東京工業大学フロンティア研究機構、特任准教授)

② 研究項目

- ・*In vivo* 解析による Atg8-PE 結合体形成反応の分子機構の解明

- *In vivo*解析によるAtg8-PE結合体の脱結合反応の制御機構の解明
- *In vivo*解析によるAtg8-PE結合体によるオートファゴソーム形成反応機構の解明
- Atg 結合系を制御する新規因子群の同定

§ 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、そのうち8種類がユビキチン様タンパク質Atg8とリン脂質ホスファチジルエタノールアミン(PE)との可逆的結合反応を制御している。Atg8-PE結合体は他のAtg因子と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。その過程ではAtg8とPEの結合のみならず、脱結合も適切に行われる必要がある。

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、以下の4課題を中心に研究を進めることで、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25年度は以下の研究を実施した。

課題 1) Atg8-PE 結合体形成反応の分子機構の解明

Atg8-PE結合反応は、E2酵素Atg3およびE3酵素Atg12-Atg5-Atg16複合体が協力して担っている。E2-E3間の相互作用の基盤を明らかにするため、Atg3のAtg12結合領域とAtg12との複合体の結晶構造を決定した。その結果、Atg3は保存されたMet残基側鎖をAtg12の疎水性ポケットに突き刺すことで結合することを見出した。またE3の結合によるAtg3の活性部位の構造変化をNMRを用いて観察するため、¹³C-メチルMetで同位体ラベルを行ったAtg3を調製した。観測されたシグナルについて、常磁性ランタニドタグを利用して帰属を進めるとともに、E3との相互作用による活性システインの配向の変化を観察する。

課題 2) Atg8-PE 結合体の脱結合反応の制御機構の解明

Atg4は働き終わったAtg8-PE結合体や誤った細胞内膜で形成されたAtg8-PE結合体を脱結合することでAtg8のリサイクルを担っている。これまでの研究で、Atg4は動的な構造を取り、それが脱結合活性に重要であることが示唆されている。そこでNMR法を用いてAtg4の動的な過程を明らかにするため、安定同位体ラベルしたAtg4およびAtg8の調製を行った。Atg8、Atg4共にシグナル分離はよく、今後詳細な解析を行う。

課題 3) Atg 因子群によるオートファゴソーム形成反応機構の解明

膜上でAtg8-PE結合体と他のAtg因子との相互作用を明らかにするため、人工脂質二重層であるナノディスクを調製し、そこにAtg8を効率的に結合させる条件検討を現在行っている。またオートファゴソーム形成にはAtg1複合体も重要な役割を担う。Atg1複合体内の詳細な相互作用解析を行い、複合体形成基盤およびその制御機構を明らかにした。今後膜上でAtg8-PE結合体と

Atg1 複合体との間の相互作用解析を進める。

課題 4) Atg 結合系を制御する新規因子群の同定と構造機能解析

出芽酵母から Atg8 結合反応関連因子と相互作用する因子を単離するため、関連遺伝子にエピトープタグの付加を行い、免疫沈降の条件を最適化した。Atg8 と共単離された因子を LC-MS/MS 解析により網羅的に決定し、現在それら因子の機能解析を進めている。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国内)

該当なし

論文詳細情報(国際)

該当なし