

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

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

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

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

- ・*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、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26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。両者の相互作用を NMR で明らかにするため、Atg3 の NMR 測定条件を確立し、その NMR シグナルの帰属に着手した。また Atg12-Atg5-Atg16N 複合体の調製法を確立し、NMR 測定において Atg3 と Atg12-Atg5-Atg16N 複合体が安定に共存できる溶液条件を見出した。

課題 2) Atg8-PE 結合体の脱結合反応の制御機構の解明

Atg4 は 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。哺乳類 Atg8 である LC3 を用いて、LC3-PE 含有ナノディスクの調製を化学反応で行ない、ゲルろ過により LC3-PE 含有ナノディスクが調製できたことを確認した。LC3 とヒト Atg4B の相互作用解析を行ない、Atg4B が複数の領域を用いて多段階的に LC3 を認識し、脱結合反応を行うことを明らかにした。

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

Atg8-PE 結合体とともにオートファゴソーム形成において重要な役割を担う Atg1 複合体について、その結晶構造を決定した。さらに Atg1 複合体の構成因子 Atg13 が飢餓により脱リン酸化し、その結果 Atg1 複合体が構築されオートファジーが始動する一連のメカニズムを明らかにした(文献 1)。また Atg1 複合体は膜上でさらに高次の多量体を形成することが報告されているが、生化学的解析により Atg13 が Atg1 複合体を凝集させる現象を見出した。今後高次 Atg1 複合体の形成機構を明らかにしていくとともに、膜と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

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、各関連因子の免疫沈降に含まれる因子を質量分析により網羅的に決定した。Atg8 に結合する因子として同定した機能未知タンパ

ク質の解析を進めた結果、これらは小胞体および核の一部をオートファゴソームに選択的に取り込ませ、分解するための受容体分子であることが判明した。今後さらに、これら新規選択的オートファジー経路の生理機能とメカニズムを明らかにしていくと共に、質量分析で同定された他の結合タンパク質の解析も進める。

文献1 Fujioka Y et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 513-521 (2014)