

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15045

研究課題名（和文）Atg15によるオートファゴソーム選択的な膜分解機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of autophagosome-selective membrane degradation by Atg15

研究代表者

丸山 達朗（Maruyama, Tatsuro）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：60795855

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：オートファジーは細胞内分解系の一つであり、二重膜小胞であるオートファゴソームの液胞での分解が重要である。液胞と融合して放出されたオートファゴソームの内膜小胞は、液胞内リパーゼであるAtg15により分解されると考えられている。しかしながら、Atg15がどのようにして液胞膜を分解せずにオートファゴソーム内膜に選択的に分解するのか明らかでない。本研究では、高精度立体構造予測を参考にしてAtg15の発現および精製を検討し、膜脂質分解機構を考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液胞（リソソーム）における選択的な脂質膜分解は、ヒトを含む真核生物に普遍的な現象であるが、そのメカニズムの詳細は解明されていない。Atg15は、520アミノ酸残基から成るリパーゼと推定されているが、リパーゼ活性を担う通常の構造ドメインよりも約200アミノ酸残基以上も長いことから、Atg15に固有な機能に関連した構造領域を有することが強く示唆される。高精度立体構造予測が得られたことで、Atg15の酵素活性の制御の仕組みを理解する足掛かりになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is an intracellular degradation system, and the degradation of autophagosomes, which are double membrane vesicles, in the vacuole is important. The inner membrane vesicles of autophagosomes released by fusion with the vacuole are thought to be degraded by Atg15, an intravacuolar lipase. However, it is not clear how Atg15 selectively acts on the autophagosome inner membrane without acting on the vacuolar membrane. In this study, we examined the expression and purification of Atg15 with reference to highly accurate structure prediction and discussed the mechanism of membrane lipid degradation.

研究分野：構造生物学

キーワード：オートファジー リパーゼ

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、真核生物に広く保存された細胞内分解システムであり、多様な生命現象に関与している。オートファジーの異常は老化や、がん、神経変性疾患などの疾病に関連していることから、オートファジーの仕組みを理解することは健康維持や疾病の予防・治療に役立つことが期待される。オートファジーの概要を図1に示す。栄養飢餓などのストレス条件下でオートファジーが誘導されると、多数のオートファジー関連タンパク質が協同的に働いて、隔離膜と呼ばれる小さな膜構造が細胞内に形成される。隔離膜は伸長して二重膜小胞のオートファゴソームへと変形するが、この過程で細胞質成分のタンパク質や核酸、オルガネラなどの分解対象物がオートファゴソーム内に取り込まれる。そして、オートファゴソームはその外膜が液胞(リソソーム)と融合し、分解対象を内包した内膜小胞は液胞内に放出され、加水分解酵素によって分解される。オートファジーはこのような複雑な膜動態を介して進行していくが、最終的に内容物を分解するためには内膜小胞の膜脂質がまず分解される必要がある。このような膜脂質の分解は、他の加水分解酵素が内容物を分解し、分解物を細胞の様々な生命プロセスへと再利用するために重要な過程であるが、そのメカニズムは未だ十分には理解されていない。

出芽酵母において、オートファゴソーム内膜の分解を担う液胞内タンパク質として脂質加水分解酵素(リパーゼ)である Atg15 が同定されている。Atg15 の遺伝子を欠損した酵母株では、オートファゴソーム内膜小胞が液胞内に蓄積した様子が光学顕微鏡下において観察される。また、液胞内タンパク質分解酵素(プロテアーゼ) Pep4/Prb1 を欠損した酵母株においてもオートファゴソーム内膜小胞の蓄積が観察されることから、Atg15 の活性化には Pep4/Prb1 が必要であること、また Atg15 の酵素活性は恒常的には活性化しておらず、何らかの制御を受けていることが示唆される。しかし、Atg15 が同定されてから約 20 年が経過しているにもかかわらず、その機能解析は遅れており、Atg15 によるオートファゴソーム内膜の分解メカニズムは未解明のままである。特に、Atg15 は液胞膜を分解せずにオートファゴソーム内膜を選択的に分解することから、Atg15 がどのようにして酵素活性を制御し、特定の脂質膜を識別して分解するのかを解明することが求められている。

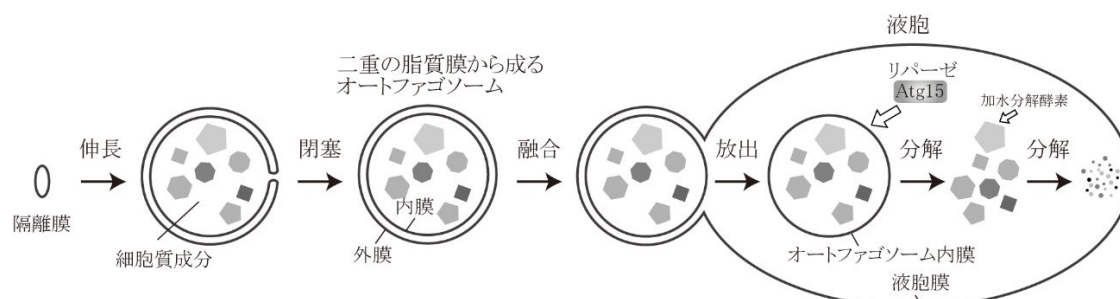


図1 オートファゴソームの形成と分解

オートファジーが誘導されると、オートファジー関連タンパク質の働きで隔離膜が形成される。そして隔離膜が伸長して閉塞し、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームは液胞と融合し、その内膜を含む内包物が液胞内加水分解酵素により分解される。

2. 研究の目的

液胞(リソソーム)における選択的な脂質膜分解は、ヒトを含む真核生物に普遍的な現象であるが、そのメカニズムの詳細は解明されていない。Atg15 は、520 アミノ酸残基から成るリパーゼと推定されているが、リパーゼ活性を担う通常の構造ドメインよりも約 200 アミノ酸残基以上も長いことから、Atg15 に固有な機能に関連した構造領域を有することが強く示唆される。一般に、タンパク質の立体構造と機能は強く相関することから、Atg15 の構造情報を高分解能にて取得することで、その酵素活性の制御メカニズムをより深く理解できることが期待される。そこで本研究は、Atg15 の立体構造を高分解能にて明らかにし、得られた構造情報に基づいて Atg15 の機能を生化学的および細胞生物学的手法にて調べることによって、Atg15 によるオートファゴソーム内膜の分解機構を解明することを目的とする。この研究により、真核生物における脂質膜分解の基本的な理解が進むだけでなく、リソソーム関連疾患の治療法開発にも寄与することが期待される。

3. 研究の方法

Atg15 の立体構造情報を取得するため、リコンビナント Atg15 の発現および精製の方法を確立する。精製した Atg15 を用いて、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析、NMR 解析を駆使して Atg15 の構造情報を獲得することで、その活性制御に関わる構造領域の手がかりを得る。これらのうち、NMR 解析は、立体構造の決定は困難であるが、脂質膜との相互作用部位をアミノ酸残基レベルで特定する上で有用である。これら構造解析に加えて、精製した Atg15 とリポソームを用いた試験管内再構成系にて Atg15 による脂質膜分解を検出することで、Atg15 の酵素活性に

必須な構造領域および補因子を同定する。特に、巨大単層リポソームを用いることで、オートファゴソーム内膜と液胞膜への Atg15 の作用を模倣した実験系を構築し、各作用を共焦点顕微鏡下にてライブイメージングすることで、Atg15 による脂質膜分解の諸過程を明らかにする。また、深層学習を組み入れた計算科学の急速な進展によりタンパク質の立体構造を高精度に予測することが可能になったため、AlphaFold などの予測構造を参考にして Atg15 の解析コンストラクトを考案し、Atg15 の酵素活性と立体構造の相関を実験的に検証する。そして構造情報と再構成実験の結果に基づいて Atg15 の変異体解析を *in vivo* においても行うことで、オートファゴソーム内膜の分解機構を明らかにする。

4. 研究成果

まず、出芽酵母由来 Atg15 の発現および精製を検討した。出芽酵母由来 Atg15 の遺伝子を PCR 法によりゲノム DNA を鋳型として増幅し、Gibson assembly 法により発現ベクターを構築した。Atg15 は N 末端にシグナル配列を有しておりそれは膜貫通領域と予測されたが、リパーゼとして働く際にはこの領域は切除されていると考えられる。このため、シグナル配列を切除し、精製のためのアフィニティタグ (His \times 6 タグ) を付加したコンストラクトを作製した。Atg15 はその一次配列中にシステイン残基を多く含み、他のリパーゼと同様にジスルフィド結合を複数形成してリパーゼ活性を担う構造ドメインを形成することが想定されたため、大腸菌内でのジスルフィド結合形成が期待される大腸菌株 Shuffle に発現ベクターを形質転換した。その大腸菌を LB 培地や 2 \times YT 培地にて培養し、目的タンパク質の発現誘導時の IPTG 濃度と温度を検討した。遠心操作により集菌した後、菌体をバッファーにて懸濁して超音波にて破碎した。高速遠心後に得られた上清を TALON レジンに供し、アフィニティ精製を行った。精製後の Atg15 をゲルろ過クロマトグラフィに供した結果、いくつかのピークが観測されたことから、精製した Atg15 は単量体だけでなく多量体を形成していることが示唆された。

次に、精製した Atg15 を巨大単層リポソームへと添加し、共焦点レーザー顕微鏡下で経時的変化を観察した。リポソームの脂質組成は、出芽酵母を用いたリポドミクスで報告されている脂質組成を参考にして、脂肪酸鎖はパルミチン酸、オレイン酸の混合鎖を、ヘッドグループはホスファチジルコリン、ホスファチジエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールなどを含むものを用いた。また、液胞内は pH が酸性寄りであるため、pH も変更した。様々な条件下にて観察を行った結果、Atg15 の添加後に膜形態などが変化するリポソームはほとんどなく、検討した条件下において Atg15 は脂質膜に作用していないことが示唆された。そこで Atg15 の局在を観察するため、蛍光タンパク質または蛍光色素にて標識した Atg15 のサンプル調製を検討した。蛍光タンパク質を融合させた Atg15 は検討した条件下では発現量が大きく低下し、精製過程において非特異的分解を受けたため、調製が困難であった。一方、一級アミンや内在または変異導入したシステイン残基を介した蛍光色素での標識を検討し、調製した蛍光標識 Atg15 をリポソームに添加して共焦点レーザー顕微鏡にて Atg15 の局在とリポソームの形態変化を観察した。その結果、脂質組成を様々に変更したが、Atg15 の膜局在は明瞭には観察することができなかった。

このようなリパーゼ活性の検出系の検討と並行して、Atg15 の立体構造解析に取り組んだ。その過程で、X 線結晶構造と同程度にタンパク質の立体構造を高精度で予測できる AlphaFold2 が公開されたため、Atg15 の予測構造を精査した (図 2)。Atg15 の立体構造は全体的に pLDDT 値が高く、高精度で予測されていた。Atg15 のリパーゼドメインは通常のリパーゼ活性を担うドメインに加えて、その周囲を覆うように構造領域が配置されていることが分かった。興味深いことに、リパーゼ活性に重要な Ser332 は分子内部に埋もれており、この構造では基質である膜脂質が活性部位へアクセスできないことが分かった。したがって、Atg15 が膜脂質に作用するためには活性部位を覆う構造領域が何らかの仕組みによって配置を変化し、活性部位が膜脂質を収容できるように構造変化する必要があることが示唆された。

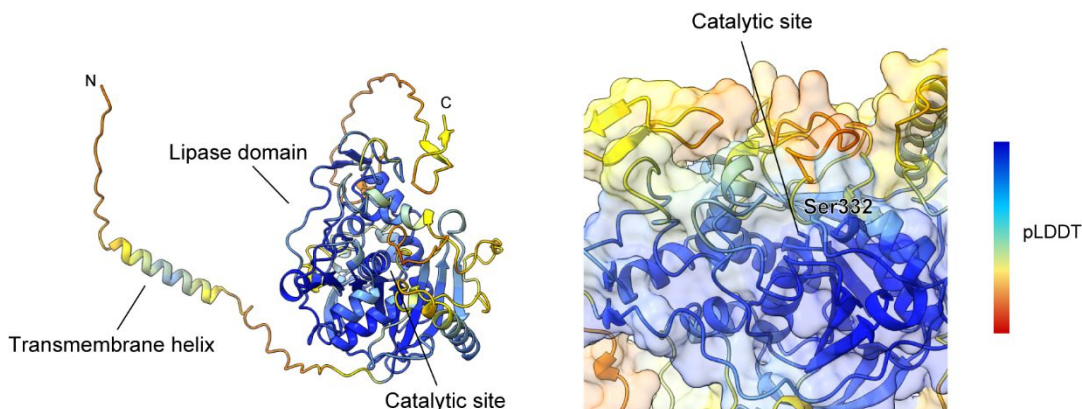


図 2 AlphaFold2 による Atg15 の予測構造

Atg15 の立体構造をリボン図にて表示し、pLDDT 値に応じて色付けた。予測精度が高いほど青く、低いほど赤くなる。右のパネルでは、リパーゼ活性を担う活性部位の拡大図を示し、タンパク質の表面表示を加えた。

最近の報告において、Pep4/Prb1による部分的な分解がAtg15の活性化に重要であることが示唆されている。このため、AlphaFold2の予測構造を考慮すると、活性部位を覆う構造領域が分解されることでAtg15はリパーゼ活性を発揮する可能性がある。今後、このような部分分解したAtg15のリパーゼ活性を実験的に調査するとともに、リパーゼ活性を有したAtg15がどのようにしてオートファゴソーム内膜を選択的に分解するのかを実験的に明らかにする必要がある。このような膜分解の仕組みを明らかにしオートファジーの理解を深めることで、さまざまな疾病の予防や治療法の開発に向けた新しいアプローチが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Alam Jahangir Md., Maruyama Tatsuro, Noshiro Daisuke, Kakuta Chika, Kotani Tetsuya, Nakatogawa Hitoshi, Noda Nobuo N.	4. 巻 31
2. 論文標題 Complete set of the Atg8-E1-E2-E3 conjugation machinery forms an interaction web that mediates membrane shaping	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 170 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-023-01132-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Tatsuro, Hama Yutaro, Noda Nobuo N	4. 巻 175
2. 論文標題 Mechanisms of mitochondrial reorganization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 167 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Tatsuro, Noda Nobuo N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocol for real-time imaging of membrane fission by mitofissin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102590 ~ 102590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102590	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Tomoyuki, Furukawa Kentaro, Maruyama Tatsuro, ..., Klionsky J. Daniel, Noda N. Nobuo, Kanki Tomotake.	4. 巻 83
2. 論文標題 The mitochondrial intermembrane space protein mitofissin drives mitochondrial fission required for mitophagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 2045 ~ 2058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2023.04.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Tatsuro, Alam Jahangir Md., Fukuda Tomoyuki, Kageyama Shun, Kirisako Hiromi, Ishii Yuki, Shimada Ichio, Ohsumi Yoshinori, Komatsu Masaaki, Kanki Tomotake, Nakatogawa Hitoshi, Noda Nobuo N.	4. 巻 28
2. 論文標題 Membrane perturbation by lipidated Atg8 underlies autophagosome biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 583 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-021-00614-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Tatsuro, Noda Nobuo N.	4. 巻 17
2. 論文標題 Delineating the lipidated Atg8 structure for unveiling its hidden activity in autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 3271 ~ 3272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2021.1961075	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山達朗、中山結稀、劉洋、岡本浩二、野田展生
2. 発表標題 リン酸化を契機とした多価相互作用によりミトファジーは始動する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所HP
<https://www.bikaken.or.jp/laboratories/structuralbiology/summary.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------