

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770092

研究課題名(和文)オートファジーにおけるAtg12-Atg5結合体の作用機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mode of action of Atg12-Atg5 conjugate in autophagy

研究代表者

中戸川 万智子(Nakatogawa, Machiko)

東京工業大学・フロンティア研究機構・先進研究員

研究者番号：90402461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、被分解物を包み込む脂質二重膜胞「オートファゴソーム」の形成を必要とする。オートファゴソームの形成に必須である二つのユビキチン様タンパク質Atg8とAtg12は、それぞれホスファチジルエタノールアミン(PE)とAtg5に結合する。我々は、Atg12-Atg5結合体がAtg8-PE結合反応のE3酵素として機能する際の作用機序の一端を解明した。構造情報を基にした生化学的解析を行い、Atg12-Atg5結合体がAtg8-PE結合反応のE2酵素Atg3に構造変化を引き起こし、活性化することを明らかにした。また、Atg12-Atg5結合体とAtg3の複合体の結晶構造解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a bulk degradation system, which involves the formation of a double-membrane vesicle called autophagosome. Autophagosome formation requires two ubiquitin-like proteins, Atg8 and Atg12. They are conjugated to the phosphatidylethanolamine (PE) and Atg5, respectively, via a series of enzymatic reactions with E1 and E2 enzyme. In this study, we elucidated the mode of action of Atg12-Atg5 as an E3 enzyme in the Atg8-PE conjugation reaction. We established a biochemical assay based on the structural information to determine the configuration of the catalytic center of Atg3, which is an E2 enzyme in Atg8-PE conjugation reaction. This approach revealed that Atg12-Atg5 conjugate induces a conformational change in the catalytic center of Atg3 to enhance its E2 activity. Moreover, mutational analyses indicated how the activity of Atg3 is suppressed in the absence of Atg12-Atg5 conjugate. We are attempting to analyze the crystal structure of Atg12-Atg5 conjugate/Atg3 complex.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ユビキチン様タンパク質 E3酵素 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内構成成分のバルクな分解系であり、被分解物を包み込む脂質二重膜胞「オートファゴソーム」の形成というダイナミックな過程を必要とする。オートファゴソームの形成には、18種類のオートファジー関連タンパク質 (Atg; autophagy-related proteins) が必須である。その多くが酵母からヒトまで保存されており、オートファジーの基本的なメカニズムは進化上保存されていると考えられる。興味深いことに、Atg タンパク質にはユビキチン様タンパク質が2つも含まれており、これらの結合反応に関わる因子がAtgタンパク質の約半数を占めている。

2つのユビキチン様タンパク質 Atg8 と Atg12 は、タンパク質のユビキチン化と同様の過程を経て、標的分子と結合する。Atg8 は、まず、システインプロテアーゼ Atg4 によって C 末端部分が切断され、特定のグリシン残基が露出する。Atg8 の C 末端グリシン残基は、E1 酵素である Atg7 によって活性化され、次に E2 酵素である Atg3 への転移を経て、最終的に脂質分子ホスファチジルエタノールアミン (PE) の親水性頭部にあるアミノ基に結合する。一方、Atg12 の C 末端グリシン残基も同様に、共通の E1 酵素である Atg7 によって活性化された後、E2 酵素 Atg10 との結合を経て、Atg5 のリジン残基に結合する。興味深いことに、Atg12-Atg5 結合体は、Atg8-PE 結合反応の E2 酵素 Atg3 と相互作用し、Atg8 の Atg3 から PE への転移を促進する E3 酵素として機能することが明らかとなった [Hanada *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2007]。

しかしながら、Atg12 や Atg5 の一次配列は典型的な E3 酵素とは類似しない。さらに、Atg5 の構造解析の結果、Atg5 には2つのユビキチン様ドメイン (Ubl) が存在することが判明した [Matsushita *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007]。即ち、ユビキチン様タンパク質である Atg12 と Atg5 の結合体には3つの Ubl が含まれることが明らかとなった。この構造的特徴から、Atg12-Atg5 結合体の触媒機構はユニークなものであると考えられ、既知の E3 酵素の触媒機構から予想することは不可能であった。

2. 研究の目的

Atg12-Atg5 結合体の E3 酵素触媒機構の全容解明。

3. 研究の方法

我々は、Atg12-Atg5 結合体が相互作用する Atg3 (図1) の活性中心の立体構造が他の E2 酵素と異なることに着目した [Yamada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007]。ユビキチンの E2 酵素から標的タンパク質への転移反応に必須であり、すべての E2 酵素に保存されているアスパラギン残基 (Asn*) の位置に、Atg3

ではスレオニン残基 (Thr213) が配置されている。さらに、典型的な E2 酵素である Ubc9 の活性中心のシステイン残基の側鎖は、Asn* に近接しているのに対し、Atg3 の活性中心のシステイン残基 (Cys234) の側鎖は、Thr213 とは異なる方を向いていた (図2)。つまり、この構造のままでは、Atg3 は活性を持たないと考えられた。我々は、Atg12-Atg5 結合体が Atg3 に、Cys234 が Thr213 の方に配向するような構造変化を引き起こすことで Atg3 を活性化すると仮定し (図2)、その可能性を生化学的に検討した。さらに、Atg12-Atg5 結合体による Atg3 の活性化機構の全体像を明らかにするために、Atg12-Atg5 結合体と Atg3 の複合体の結晶構造解析を行った。

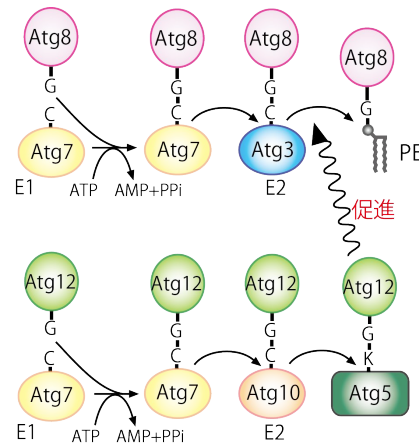


図1

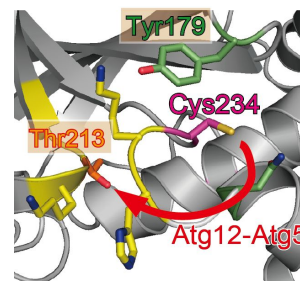


図2

4. 研究成果

(1) Atg3 の酵素活性における Thr213 の重要性

我々は、まず、Atg3 の Thr213 を他のアミノ酸残基に置換した変異体を発現させる酵母株を作製した。この酵母株では、オートファジー活性が著しく低下しており、Thr213 は Atg3 の活性に必須であることが示された。さらに、Atg8-PE 結合反応の *in vitro* 再構成系を用いて、Thr213 の点変異体の不活性化を詳細に調べた。その結果、Thr213 の点変異体では Atg8-Atg3 チオエステル中間体の形成は正常であるものの、次のステップである Atg8 の Atg3 から PE への転移に異常が生じることが明らかとなった。従って、Atg3 の Thr213 は他の E2 酵素における Asn* に相当する役割を果たしていると考えられた。

(2) 分子内ジスルフィド結合形成の検出法の確立

次に、我々は、Atg12-Atg5 結合体が Atg3 の活性中心の Cys234 を Thr213 に再配向させる可能性を検討するため、Atg3 の活性中心の構造を生化学的に解析する方法を確立した。具体的には、Atg3 の Thr213 あるいは立体構造上 Thr213 と近接しているアミノ酸残基のいくつかをシステインに置換し、構造変化によって活性中心の Cys213 の側鎖が Thr213 に向けて配向すれば、導入したシステイン残基と Cys213 の間に分子内ジスルフィド結合が形成されると考えた。フリーのシステイン残基を修飾する試薬 maleimide-PEG (MP) を用いて、その修飾数の変化を指標にして、分子内でのジスルフィド結合形成を検出することに成功した(図3)。

電気泳動で MP の数に応じて異なる移動度を示す

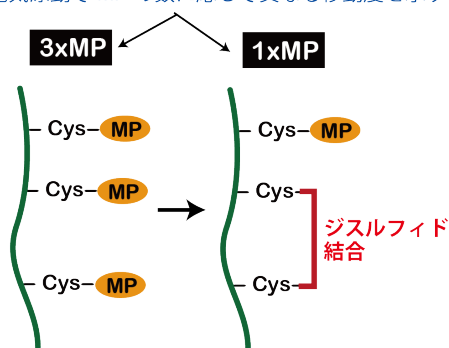


図3

(3) Atg12-Atg5 結合体は Atg3 の活性中心に構造変化を引き起こす

Atg3 の Thr213 やその付近にあるアミノ酸残基(図2)をシステイン残基に置換した変異体を精製し、Atg12-Atg5 結合体存在下または非存在下でインキュベートした後、Atg3 の分子内ジスルフィド結合の形成を調べた。その結果、Thr213 をシステインに置換した変異体において、Atg12-Atg5 結合体依存的に活性中心の Cys234 との分子内ジスルフィド結合が形成された。一方、不活性型を示すと考えられる結晶構造において Cys234 と近接する Tyr179(図2)をシステインに置換すると、Atg12-Atg5 結合体が存在しない場合に Cys234 とにジスルフィド結合が効率良く形成された。これらの結果から、Atg12-Atg5 結合体は Atg3 に、活性中心の Cys234 が Tyr179 から Thr213 に再配向するような構造変化を引き起こすことが示された。さらに、我々は、Atg3 の活性が上昇する高 pH 条件下では、Atg12-Atg5 結合体無くても、Cys234 が Thr213 の方に配向することを示し、Atg3 の活性中心の Cys234 の配向とその E2 酵素活性に相関があることを示した。つまり、これらの結果は、Atg12-Atg5 結合体により引き起こされる構造変化は Atg3 の E2 酵素活性の上昇をもたらすことを示唆している。

(4) Atg3 の活性抑制に関する構造基盤

Atg3 の不活性型を示すと考えられる結晶構造において、活性中心の Cys234 を含むループは E2 コアドメインの一部であるヘリックス G とフェニルアラニン(Phe293)を介して相互作用している(図4)。我々は、Phe293 をセリンに置換した変異体(F293S)を作製し in vitro における活性を調べた。その結果、F293S 変異体では、Atg8-Atg3 チオエステル中間体の形成は多少減少していたが、Atg8-PE 形成においては、野生型 Atg3 に比べ高い活性を持つことが明らかとなった。また、F293S 変異体の活性中心の構造を調べた結果、Atg12-Atg5 結合体の非存在下においても活性中心の Cys234 は Thr213 の方に配向していた。これらの結果は、Phe293 をセリンに置換した変異によって、Cys234 が Thr213 の方に配向し、Atg3 の E2 酵素活性を上昇させることを示唆している。

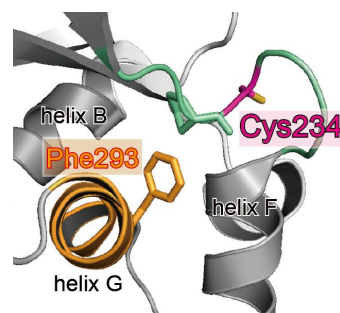


図4

(5) Atg3 の活性化に関する構造基盤

我々と共同研究を行うグループは、シロイヌナズナ Atg3 の結晶構造を明らかにした[Yamaguchi et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2012]。興味深いことに、シロイヌナズナ Atg3 の全体構造は出芽酵母 Atg3 の構造とよく似ていたにも関わらず、活性中心 Cys258 の側鎖は、Thr213 に相当する Thr239 と非常に近接していた。この構造は、出芽酵母 Atg3 の構造解析に用いられた結晶が pH5.8 で得られたものに対し、シロイヌナズナ Atg3 の結晶は高い pH(pH8.0)で得られたことに起因すると考えられる。つまり、シロイヌナズナ Atg3 の活性中心の構造は、Atg3 が Atg12-Atg5 結合体により活性化された状態に相当すると考えられた。

シロイヌナズナ Atg3 の活性中心では、ヒスチジン残基(His260)が構造の内部に向けて配向し、ヘリックス G の Phe293 に相当する Phe290 を含むいくつかの残基により形成される疎水的な環境におさまっている。一方、His260 に相当する出芽酵母 Atg3 の His236 は、結晶構造においてヘリックス G とは反対側を向いていた。His236 を置換した点変異体では、Atg8 の PE への転移のステップが進行せず、さらに、Atg12-Atg5 結合体による構造変化も起こらなくなった。これらの結果から、His236 は Atg12-Atg5 結合体による構造変化、あるいは、活性型の構造維持に重要

であることが示された。

(6) Atg12-Atg5 結合体による Atg3 の活性化機構

以上の結果より、我々は Atg12-Atg5 結合体による Atg3 の活性化機構のモデルを提唱した(図5)。Atg12-Atg5 結合体の非存在下では、Atg3 の活性中心 Cys234 を含むループがヘリックス G と相互作用し、Cys234 は Thr213 とは逆に配向する。その結果、Atg3 の活性は抑制される。Atg12-Atg5 結合体が Atg3 に相互作用すると Atg3 の活性中心に構造変化が引き起こされ、Cys234 が Thr213 に近接することにより、Atg8 の PE への転移が促進される。

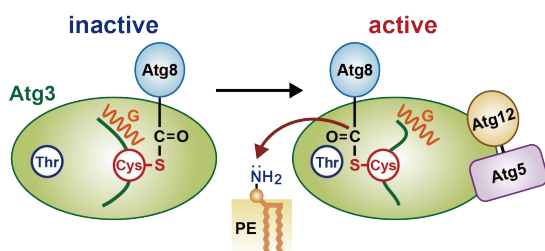


図5

これまで、E3 酵素は E2 酵素に大きな構造変化を引き起こさないと考えられてきた。本研究により、E3 酵素の新たな作用機序モデルが提案された。

(7) Atg12-Atg5・Atg3 複合体の結晶構造解析

Atg12-Atg5 結合体による Atg3 の活性化機構の全体像を明らかにするため、Atg12-Atg5 結合体と Atg3 の複合体の結晶構造解析を試みた。Atg12-Atg5 結合体および Atg3 を高い精製度で精製することに成功し、結晶化条件のスクリーニングを行ったが、結晶は得られなかった。さらに、Atg3 の保存性が低い領域を欠失した変異体を作製した。欠失領域を変えた数種類の Atg3 変異体を用いて同様にスクリーニングを行ったが、微結晶を得るに留まった。Atg12-Atg5 結合体と Atg3 の相互作用は非常に弱いか一時的であると予想されたため、Atg12-Atg5 結合体と Atg3 を化学架橋で固定化する方法を試みた。ヒトの Atg12 と Atg3 のペプチドの共結晶構造をもとに [Metlagel et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2013]、出芽酵母 Atg12 と Atg3 の相互作用に関わるアミノ酸残基を予想し、それらの残基をシステインに置換した。システイン置換体を化学架橋剤で処理した結果、Atg12-Atg5 結合体と Atg3 の架橋産物を得ることに成功した。今後、高効率で架橋産物を得る条件検討を行う。一方、出芽酵母 Atg12 と Atg8 が相互作用することが報告された [Kaufmann et al., Cell, 2014]。Atg3 単体よりも Atg8-Atg3 結合体の方が Atg12-Atg5 結合体と強く相互作用することが期待されたため、Atg8-Atg3 結合体と Atg12-Atg5 結合体の共結晶化を進めた。現在 Atg8-Atg3 結合体の精

製条件を整えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Sakoh-Nakatogawa M., Matoba K., Asai E., Kirisako H., Ishii J., Noda N. N., Inagaki F., Nakatogawa H., Ohsumi Y. Atg12-Atg5 conjugate enhance E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20:433-439 (2013), 査読有り

Nakatogawa H., Ohbayashi S., Sakoh-Nakatogawa M., Kakuta S., Suzuki S. W., Kirisako H., Kondo-Kakuta C., Noda N. N., Yamamoto H., Ohsumi Y. The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation. *J. Biol. Chem.*, 287:28503-28507 (2012), 査読有り

[学会発表](計 4件)

Sakoh-Nakatogawa M., Matoba K., Noda N. N., Nakatogawa H., Ohsumi Y. "A novel type of E3 enzyme: the autophagy-related ubiquitin-like protein conjugate Atg12-Atg5 induces a conformational change in the E2 enzyme Atg3 to enhance its conjugase activity" The 35th Naito Conference, Sapporo, Japan, July 11, 2013

中戸川万智子、中戸川仁、大隅良典「オートファジーに関わる2つのユビキチン様タンパク質結合系のクロストーク」日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11日

Sakoh-Nakatogawa M., Nakatogawa H., Ohsumi Y. "The E3 enzyme Atg12-Atg5 rearranges the catalytic center of Atg3 to enhance its E2 activity" The 6th International Symposium on Autophagy 2012, Okinawa, Japan, Oct 29 & 30, 2012

中戸川万智子、中戸川仁、大隅良典「オートファジーに必須のE3酵素 Atg12-Atg5 による E2 酵素 Atg3 の活性化機構」日本蛋白質科学会若手奨励賞シンポジウム、名古屋、2012年6月21日

[その他]

ホームページ等

東工大プレスリリース「オートファジーに必須な因子の作用機構を分子レベルで解明 - 神経変性疾患や肝疾患の創薬につ

ながる成果 - 」

<http://www.titech.ac.jp/pressrelease/>

ライフサイエンス新着論文レビュー
(First Author's)「ユビキチン様タンパク質 Atg12-Atg5 結合体は Atg3 の活性中心の再編成をひき起こしその酵素活性を上昇させる」

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/680>

7

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中戸川 万智子 (NAKATOGAWA,
Machiko)

東京工業大学・フロンティア研究機構・先進研究員

研究者番号：90402461