

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871076

研究課題名(和文)オートファジーに必須なユビキチン様結合反応系制御機構の構造生物学的解析

研究課題名(英文)Structure basis for E2-E3 interaction in plant Atg conjugation system

## 研究代表者

的場 一晃(MATOBA, Kazuaki)

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：60613792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オートファゴソーム形成に重要なAtg8のPE(Phosphatidylethanolamine)化は広く真核生物に保存されている。これまでの研究でAtg12-Atg5-Atg16複合体はAtg3と直接結合することで、Atg8のPE化を促進することが明らかになっている。

今回植物の系を用いて、AtAtg12bとの結合に必要なAtAtg3側の最少領域を同定し、AtAtg12b-AtAtg3複合体構造を決定した。Atg3のAsp-Met配列がAtg12との結合を担っていた。この配列はヒトAtg3でも保存されておりAsp-Metを含む配列は進化上保存されたAtg12相互作用モチーフであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified the minimum binding region of Atg3 for Atg12 by in vitro pull-down assay using Arabidopsis thaliana (At) homologs and crystallized the AtAtg12b-AtAtg3 peptide complex. The side-chain of AtAtg3 Asp-Met is bound deeply to the pocket of AtAtg12b. The importance of AtAtg3 Met157 for AtAtg12b binding was confirmed by mutational analysis. These data establish the basis for E2-E3 interaction in the plant Atg system.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

マクロオートファジー(以後、オートファジー)は飢餓時に誘導され、細胞内成分やオルガネラを分解する現象として見出された。酵母を用いた遺伝学的な解析から autophagy-related gene (ATG)が同定され、これまでに 30 以上の因子がオートファジーに関与することが明らかになっている。オートファジーは細胞内浄化のほか、抗原提示や細菌の駆除など多彩な生理的機能を担っている。オートファジーの進行過程は、まず液胞近傍に多種類の Atg タンパク質が集まった Pre-autophagosomal structure (PAS)と呼ばれる構造体から扁平な膜構造体である隔離膜が形成し、続いて隔離膜が湾曲しながら伸張し、分解物を取り囲み、二重膜のオートファゴソームを形成する。その後、オートファゴソームは液胞(哺乳類の場合はリソソーム)と融合し、内膜ごと液胞内酵素により分解される(図1)。

オートファゴソーム形成に重要な Atg8 の PE(Phosphatidylethanolamine)化は、真核生物(酵母、ヒト、植物など)に広く保存された反応である。Atg8 は E1 酵素 Atg7 による活性化ののち、E2 酵素 Atg3 とチオエステル中間体を形成し、さらに E3 様酵素 Atg12-Atg5-Atg16 複合体の助けを借りることで PE とアミド結合体を形成する。これまでの研究で、Atg12-Atg5-Atg16 複合体は Atg3 と直接結合することで Atg3 の活性部位の再構築を引き起こし、その結果 Atg8 の PE への転移反応を促進することが出芽酵母の系を用いて明らかとなっている。

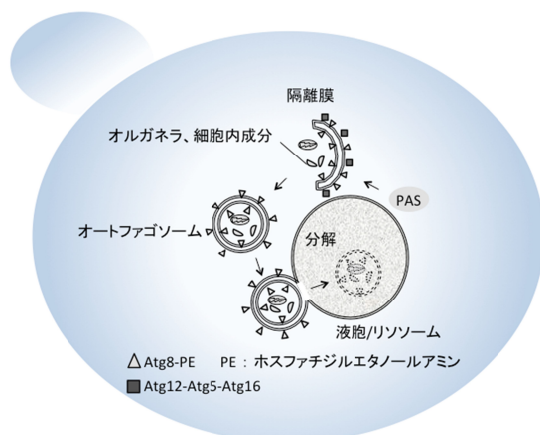


図1 オートファジー進行の模式図

### 2. 研究の目的

本研究ではオートファジーに必要なユビキチン様結合反応系に関わるタンパク質に焦点を絞り、これら結合反応の分子機構、生理的意義を明らかにする。まず Atg7-Atg12 複合体の結晶構造を明らかにする。Atg7 は Atg12 および Atg8 結合反応系に共通した E1 酵素として機能し、*in vivo* では適切な E2 酵素に Atg12 もしくは Atg8 を渡す。このような基質特異性がどのように達成されるの

か、詳細は分かっていない。そこで既に分かっている Atg7-Atg8 複合体構造、E1-E2 複合体構造 (Atg7-10、Atg7-3) の結合様式と Atg7-Atg12 を比較し、構造を基に詳細な相互作用解析 (*in vitro* conjugation assay) を行い、Atg7 がどのように Atg12、Atg8 を正しい E2 酵素 (Atg10、Atg3) に渡しているのかを明らかにする。

これら二つの結合反応系は協調して働いており、Atg12-Atg5/Atg16 複合体が Atg8 の PE 化を促進する(図2)。しかしその分子機構は不明である。そこで Atg8-Atg3 チオエステル中間体 Atg12-Atg5/Atg16 複合体の結合によってどのような構造変化が引き起こされるか明らかにする。具体的には、Atg3-Atg12 複合体の結晶構造を明らかにし、この構造を基に生化学的解析を行ない、どのように PE 化を促進しているのか、活性制御機構の詳細を明らかにする。これらの結果は Atg8、Atg12 結合反応系がどのように協調し、オートファゴソーム形成にどのように関わっているか理解することに必須である。

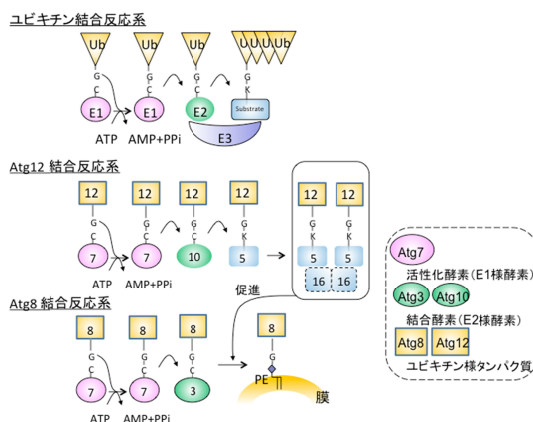


図2 結合反応系の模式図

### 3. 研究の方法

ユビキチン様結合反応系の分子機構を明らかにするために以下の方法で研究を進めた。

- (1) AtAtg7、AtAtg12b、AtAtg3、AtAtg8a、AtAtg12b-AtAtg5 タンパク質の精製; 発現タンパク質は全長として発現するほかそれぞれ Atg7-Atg12、Atg3-Atg12 複合体として結晶化しやすい配列を考慮して発現、精製した。
- (2) 最少結合領域の同定; AtAtg12b と AtAtg3 はプルダウンアッセイを行い、最少結合領域を決定した。
- (3) 精製タンパク質の結晶化、X 線結晶構造解析; 複合体結晶化スクリーニングを行い、結晶化条件の探索を行った。
- (4) 立体構造に基づく変異体機能解析; 構造解析終了後、立体構造に基づいて変異体リコンビナントタンパク質を調整し等温滴定カロリーメトリーや *in vitro* conjugation アッセイで相互作用解析を行った。

#### 4. 研究成果

植物(*Arabidopsis thaliana*: At)の系を用いて、AtAtg12b との結合に必要な AtAtg3 側の最小結合領域を AtAtg3(152-162)と同一し(図3)、AtAtg12b との複合体結晶構造を決定した(図4)。AtAtg3 は主に Asp-Met 配列を用いて AtAtg12 と相互作用し(図5)、Met 側鎖は AtAtg12 の疎水的な空隙 (Phe30, Val41, Phe44) に深く結合していた。さらに AtAtg12 との結合が弱くなる変異体 (AtAtg3 D156R, M157A, D156R M157A) を用い *in vitro* conjugation アッセイを行ったところ、AtAtg8a-AtAtg3 中間体が蓄積した(図6)。これらの結果は AtAtg12b、AtAtg3 間の相互作用に Asp-Met 配列が重要であり、Atg8 の PE 化効率を上げていることを示している。この相互作用は、最近報告されたヒト Atg3-Atg12 間相互作用と極めて類似しており、ヒト Atg3 でも Asp-Met 配列が Atg12 との結合を担っていた。すなわち Asp-Met を含む配列は進化上保存された Atg12 相互作用モチーフであると考えられる。一方、出芽酵母ではそのようなモチーフが保存されていないことが等温滴定カロリメトリーの結果から明らかとなった。今回 Atg3-Atg12 間の詳細な相互作用を示し、Atg8 結合反応系および Atg12 結合反応系が協調して働く一端を明らかにした。今後生体膜上でのように Atg8-PE 化を促進するのか明らかにする必要がある。

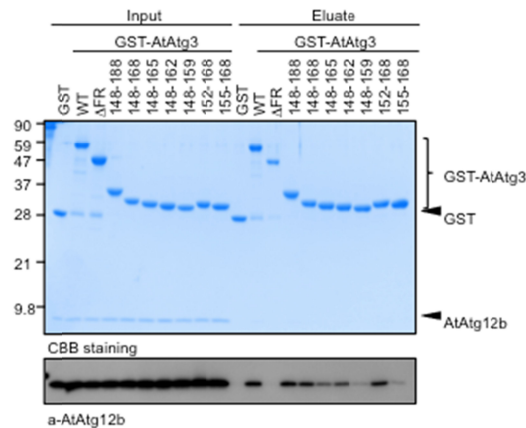
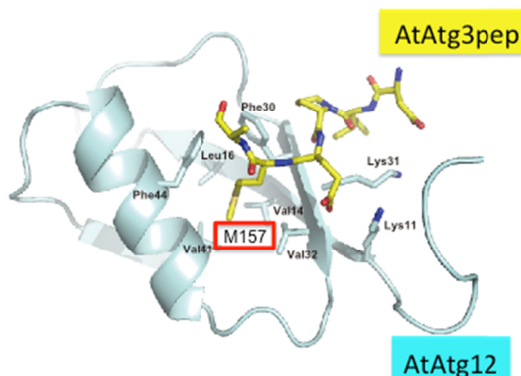


図3 プルダウンアッセイ

様々な配列の GST-AtAtg3 に対して AtAtg12b の結合能を測定するためプルダウンアッセイを行った。



#### 図4 AtAtg12b-AtAtg3 複合体構造

AtAtg12b モデル (シアン), AtAtg3 スティックモデル (黄色)を表す。

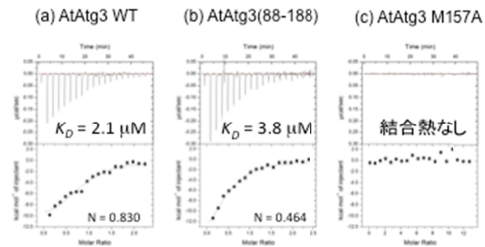


図5 等温滴定カロリメトリーの結果

(a) セル: AtAtg12b 11.6 μM, シリンジ: AtAtg3 WT 133 μM, (b) セル: AtAtg12b 13.8 μM, AtAtg3 (88-188) 168 μM, (c) セル: AtAtg12b 13.2 μM, シリンジ: AtAtg3 M157A 123 μM (測定緩衝液 PBS)

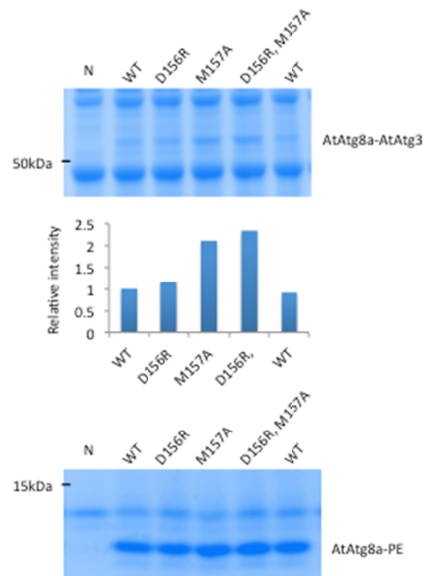


図6 *in vitro* conjugation アッセイ

酵素反応は 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM DTT, 0.1 mM ATP, 0.1 mM リポソーム (DOPE:POPC:DOPA =7:1:2), 1 μM AtAtg12b-AtAtg5, 10 μM AtAtg8a, 1 μM AtAtg7-His 存在下で 1 μM AtAtg3 野生型(WT)もしくは変異体(D156R, M157A, D156R M157A)を加え 37、45 分間反応させた。上図: 12% SDS-PAGE、中図: AtAtg8a-AtAtg3 相対強度、下図: 尿素-SDSPAGE 酵素反応後、遠心沈殿を電気泳動に用いた。

#### <引用文献>

- (1) N. Noda et al., Mol. Cell. 44, 1-14 (2011)
- (2) M. Yamaguchi et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 19, 1250-6 (2012)
- (3) Z. Metlagel et al., PNAS. 110, 18844-9 (2013)

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) Sakoh-Nakatogawa M, Matoba K, Asai E, Kirisako H, Ishii J, Noda NN, Inagaki F, Nakatogawa H, Ohsumi Y.  
Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. Nature Structural & Molecular Biology 査読有、20 巻、2013、433-439 DOI:10.1038/nsmb.2527.

〔学会発表〕(計2件)

- (1) K. Matoba, Y. Fujioka, M. Sakoh-Nakatogawa, H. Nakatogawa, Y. Ohsumi, N. Noda. Structure basis for E2-E3 interaction in the plant Atg conjugation system. 23<sup>rd</sup> Congress and general assembly of the International Union of Crystallography. Aug 7, 2014. Montreal (Canada)
- (2) 出口翔平、的場一晃、志波智生、浅井隆志、原田繁春 トキソプラズマ原虫由来ピルビン酸キナーゼ II の結晶学的研究 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 1 3 日 パシフィコ横浜 (横浜)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

的場 一晃 (MATOBA, Kazuaki)

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：60613792