

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840017

研究課題名(和文)オートファゴソーム形成を駆動するユビキチン様タンパク質脂質化反応機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of lipidation of a ubiquitin-like protein that drives autophagosome formation

研究代表者

中戸川 万智子(Nakatogawa, Machiko)

東京工業大学・生命理工学院・JSPS特別研究員

研究者番号：90402461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞質構成成分のバルクな分解系であり、神経変性疾患や肝疾患、がん、糖尿病などと深く関連する。オートファジーが進行する過程には、被分解物を包み込む二重膜小胞「オートファゴソーム」の形成が必須である。本研究では、オートファジー関連因子の一つAtg3がオートファゴソーム形成中間体に局在することを明らかにし、局在を変化させた際のオートファゴソーム形成への影響を調べることによって、Atg3のオートファゴソーム形成における機能について検討した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a lysosome/vacuole-mediated degradation system in eukaryotic cells, involved in various diseases such as neurodegenerative diseases, hepatic diseases, cancer, and diabetes. Formation of double-membrane vesicles “autophagosomes” that enwrap degradation targets is essential for autophagy. In this study, we revealed the localization of the autophagy-related protein Atg3 to autophagosome intermediates under autophagy-inducing conditions, and that the impairment of its localization results in inefficient autophagosome formation. Based on our results, we proposed the mechanism by which Atg3 participate in autophagosome formation.

研究分野：生物学

キーワード：オートファジー ユビキチン様タンパク質 E2酵素 蛍光顕微鏡

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バルクな分解システムであり、被分解物を「オートファゴソーム」と呼ばれる脂質二重膜胞で包み込むダイナミックな過程を含む。出芽酵母において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 (Atg: autophagy-related proteins) が液胞近傍に集まり pre-autophagosomal structure (PAS) を形成する。PAS を起点に膜が伸長し、カップ型の隔離膜 (isolation membrane) を経て、その先端が閉じることでオートファゴソームとなる (図1)。オートファゴソーム

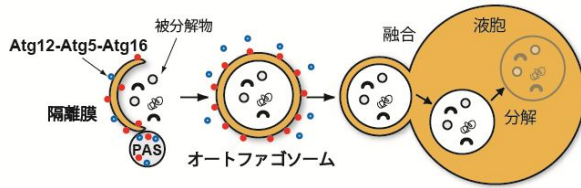


図1

の形成に關与する Atg タンパク質にはユビキチン様タンパク質が2つも含まれる。その一つである 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、露出したグリシン残基が E1 酵素である Atg7 によって活性化される。次に Atg8 は 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。もう一つのユビキチン様タンパク質 Atg12 も同様に、C 末端のグリシン残基が共通の E1 酵素である Atg7 により活性化された後、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、形成された 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 (図2) [Hanada *et al.*, *J. Biol Chem*, 2007]。Atg8-PE は、膜小胞の繋ぎ合わせや半融合を引き起こす活性を有し、オートファゴソーム膜の伸張に重要な役割を果たす [Nakatogawa *et al.*, *Cell*, 2007]。

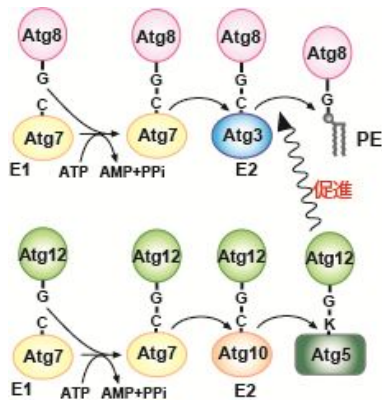


図2

2. 研究の目的

Atg8-PE と Atg12-Atg5-Atg16 複合体はともに PAS や隔離膜に局在が観察される。しかしながら、Atg8-PE は他の膜上で形成し、PAS や隔離膜に移動する可能性が考えられる。Atg8-PE の生産の場を明らかにすることを目的とし、オートファゴソーム形成における Atg8-PE の役割を検討したいと考えた。

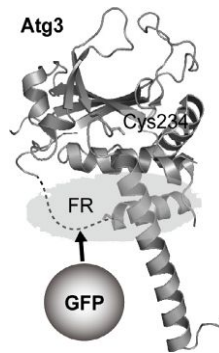
3. 研究の方法

Atg8-PE の生産の場を明らかにするには、Atg8-PE 形成反応の E2 酵素 Atg3 の局在を明らかにする必要がある。私は、Atg3 の flexible region (FR) に GFP を挿入することで、Atg3 の細胞内局在の可視化を行った。

4. 研究成果

(1) 活性を保持した GFP 融合 Atg3 の構築

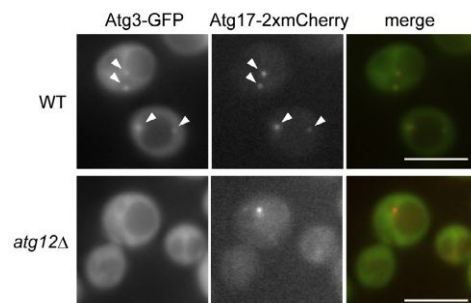
Atg3 はその N 末端や C 末端に蛍光タンパク質などを融合すると活性を失うため、細胞内局在を調べることが出来なかった。私は、Atg3 の立体構造情報に基づいて、いくつかの GFP 融合 Atg3 を作成し、活性を調べた。その結果、Atg3 の FR 領域に GFP を挿入した Atg3-GFP 融合タンパク質を発現させた酵母株において、その発現量およびオートファジー活性ともに野生株と変わらないことが分かった。つまり、作成した Atg3-GFP は野生型と同等の活性を保持していることが示唆された。



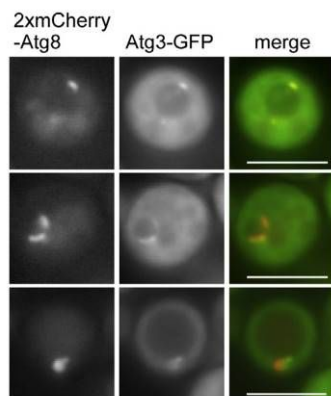
その結果、Atg3 の FR 領域に GFP を挿入した Atg3-GFP 融合タンパク質を発現させた酵母株において、その発現量およびオートファジー活性ともに野生株と変わらないことが分かった。つまり、作成した Atg3-GFP は野生型と同等の活性を保持していることが示唆された。

(2) Atg3-GFP の細胞内局在

オートファジー誘導条件下、蛍光顕微鏡による観察において、Atg3-GFP は細胞質全体に拡散していたが、一部が液胞近傍に輝点を形成していた。この輝点は、PAS マーカーである Atg17 の輝点と共局在したため、Atg3 は PAS に局在することが明らかとなった。さらに、Atg12-Atg5-Atg16 は Atg3 と相互作用することが報告されており、PAS において Atg3 を活性化することで Atg8-PE 形成を促進するモデルが提唱されている。それと一致して、Atg3-GFP の輝点形成は ATG12 遺伝子を欠失させた酵母株において観察されなかった。



Ape1 は自己会合し巨大な複合体を形成する。その複合体はオートファゴソーム膜に包まれ、液胞に運ばれ分解される。Ape1 を過剰発現した株をオートファジー誘導条件下、蛍光顕微鏡で観察すると、過剰発現により、より巨大化した Ape1 複合体を隔離膜が覆う様子が隔離膜マーカータンパク質を用いて観察できる[Suzuki *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2013]。このシステムを利用して、Atg3-GFP が隔離膜に局在するのか調べた。蛍光顕微鏡観察の結果、Atg3-GFP は mCherry-Atg8 でラベルした隔離膜に局在することが分かった。



(3) Atg3-GFP の PAS および隔離膜局在は AIM を介した Atg8 への結合によって促進する

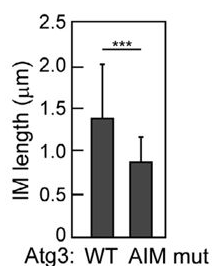
Atg3 は Atg8 family interacting motif (AIM) を持ち、このモチーフは Atg8-PE 形成には必須でないが、Atg8 との効率的な相互作用に寄与することが、*in vitro* の実験により示されていた[Yamaguchi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010]。私は、Atg3 の AIM が Atg3 の PAS および隔離膜局在に関与するかを蛍光顕微鏡観察により調べた。Ape1 過剰発現株において AIM に変異を導入した Atg3-GFP の局在を観察すると、mCherry-Atg8 でラベルした隔離膜への局在がほぼ失われていた。この結果は、Atg3 の隔離膜への局在には Atg8 との AIM を介した相互作用が必要であることを示唆している。

また、Atg17 をマーカーとして Atg3-GFP の PAS 局在を調べると、atg8 欠失株では PAS 局在が失われることが分かった。一方、Atg8-PE 形成反応では Atg8-Atg3 反応中間体が形成される。Atg3 の PAS 局在が Atg8-Atg3 形成に依存するものなのかを検討するため、Atg8-Atg3 形成不全となる Atg3 変異体 (234 番目のシステイン残基をアラニン残基に置換した変異体) を作製した。蛍光顕微鏡観察により Atg3^{C234A}-GFP の局在を調べると、その PAS 局在は失われていたが、野生型 Atg3 を共発現した場合には Atg3^{C234A} 変異体は PAS に蓄積した。つまり、Atg3 の PAS 局在は Atg8-Atg3 反応中間体形成によるものではなく、PAS に局在する Atg8 との AIM を介した結合によることが明らかとなった。これらの結果から、Atg3 あるいは

Atg8-Atg3 反応中間体が Atg8 との結合を介して PAS や隔離膜に効率良くリクルートされることで、PAS や隔離膜における Atg8-PE 形成が促進されると考えられる。

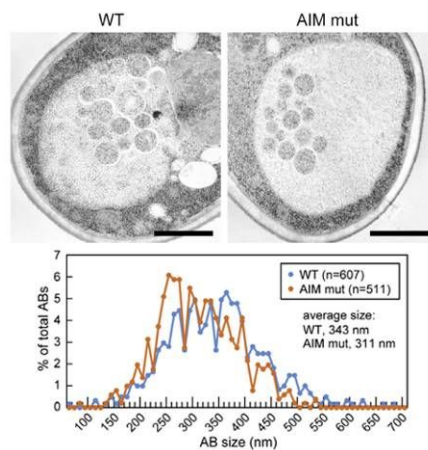
(4) Atg3 の PAS や隔離膜局在は膜伸張を促進する

最後に、私は、Atg3 の PAS や隔離膜局在がオートファゴソーム形成にどのような影響を与えるのか検討した。Atg5-GFP を隔離膜のマーカーとして、Atg3 の AIM 変異体発現株における隔離膜の



長さ野生型発現株と比較した。その結果、AIM 変異体を発現する株における隔離膜の長さは野生型発現株のものに比べおよそ 6 割程度に減少していた。

また、液胞内プロテアーゼである Pep4 を欠失した酵母株を用いて液胞内に蓄積したオートファジックボディ (オートファゴソームの外膜が液胞と融合して液胞内に放出された被分解を包み込んだ一重膜小胞) を電子顕微鏡により観察した。野生型 Atg3 を発現する株に比べて、AIM 変異体を発現する株ではオートファジックボディの数や大きさが僅かに減少していた。これらの結果は、Atg3 は PAS や隔離膜に局在することで、隔離膜の伸張に寄与し、オートファゴソーム形成にも影響することを示唆している。



本研究により、私は Atg3 が PAS と隔離膜に局在することを明らかにした。このことは、Atg8-PE が PAS や隔離膜上で形成されることを強く示唆する。Atg8 の発現量はオートファゴソームのサイズに影響することが報告されている [Xie *et al.*, *Mol. Biol. Cell.*, 2008]。Atg3 が Atg8 との結合を介して PAS や隔離膜に濃縮されることで、そこでの Atg8-PE 形成を促進し、膜伸張の効率化に寄与していることが考えられる。

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4件)

1. Sakakibara K., Eiyama A., Suzuki S.W., Sakoh-Nakatogawa M., Okumura N., Tani M., Hashimoto A., Nagumo S., Kondo-Okamoto N., Kondo-Kakuta C., Asai E., Kirisako H., Nakatogawa H., Kuge O., Takao T., Ohsumi Y., Okamoto K. Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J.* 査読あり, 32(21) (2015) 2709-2719
doi: 10.15252/embj.201591440.
2. Sakoh-Nakatogawa M., Kirisako H., Nakatogawa H., Ohsumi Y. Localization of Atg3 to autophagy-related membranes and its enhancement by the Atg8-family interacting motif to promote expansion of the membranes. *FEBS Lett.* 査読あり, 589 (2015) 744-749
doi: 10.1016/j.febslet.2015.02.003.
3. Morgan A. H., Hammond V. J., Sakoh-Nakatogawa M., Ohsumi Y., Thomas C. P., Blanchet F., Piguet V., Klselyov K., O'Donnell V. B. A novel role for 12/15-lipoxygenase in regulating autophagy. *Redox Biol.* 査読あり, 4C (2014) 40-47
doi: 10.1016/j.redox.2014.11.005.
4. Tanaka C., Tan L.J., Mochida K., Kirisako H., Koizumi M., Asai E., Sakoh-Nakatogawa M., Ohsumi Y., Nakatogawa H. Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *J. Cell Biol.* 査読あり, 207 (2014) 91-105
doi: 10.1083/jcb.201402128.

〔学会発表〕(計2件)

1. 中戸川万智子、的場一晃、野田展生、稲垣冬彦、中戸川仁、大隅良典「オートファゴソーム形成を駆動するユビキチン様タンパク質脂質化反応のメカニズム」第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月25日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア(横浜)
2. Machiko Sakoh-Nakatogawa, Kazuaki Matoba, Nobuo N. Noda, Fuyuhiko Inagaki, Hitoshi Nakatogawa, Yoshinori Ohsumi “Regulation of lipidation of the ubiquitin-like protein Atg8 that drives autophagosome formation” APPA2014, May 18, 2014, Jeju Island, Korea

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・生命理工学院・JSPS 特別研究員

研究者番号: 90402461