

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687012

研究課題名(和文)オートファジー特異的 E1 酵素 Atg7 の構造的基盤

研究課題名(英文)Structural basis of the autophagy-specific E1 enzyme Atg7

研究代表者

野田 展生 (NODA, Nobuo)

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

研究者番号：40396297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,100,000 円、(間接経費) 5,130,000 円

研究成果の概要(和文)：オートファジーに特異的に機能する E1 酵素 Atg7 の立体構造を、単独あるいは他の Atg 因子群との複合体として初めて明らかにした。得られた立体構造に基づいた機能解析を進めた結果、Atg7 は他の E1 酵素に見られない特徴的な構造を用いてユビキチン様因子および E2 酵素を認識し、両者の間の結合反応をこれまで知られていない新規なメカニズムで担うことを明らかにした。Atg7 が担う反応はオートファジーにのみ必須であることから、今回得られた知見はオートファジー特異的な制御剤開発への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The crystal structure of Atg7, the E1 enzyme specific to autophagy, has been determined alone and in complex with various Atg factors. Using the structural information, mutational analyses were performed, which revealed that Atg7 recognizes ubiquitin-like proteins and E2 enzymes using unique structures that were not observed in other E1 enzymes and that Atg7 catalyzes the conjugation reaction between ubiquitin-like proteins and E2 enzymes using a novel mechanism that has never been observed in other E1 enzymes. Since the reactions catalyzed by Atg7 are essential only to autophagy, the obtained knowledge will contribute to the development of novel compounds that specifically regulate autophagy.

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：オートファジー Atg7 E1 酵素 構造生物学 結晶構造

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、真核細胞に広く保存された細胞内の主要な分解系であり、細胞内浄化、発生、分化、細胞死、抗原提示、細胞内に進入した細菌の駆除等、多彩な高等機能を担っている。またオートファジーの異常は神経変性疾患や癌などの重篤な疾病をもたらす。出芽酵母をモデル生物とした遺伝学的解析で、これまでに多数のオートファジー関連遺伝子 ATG が同定されたが、その多くがヒトでも保存されていることから、オートファジーの基本的メカニズムは進化上保存されていると考えられる。オートファジーでは、細胞質内にオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体を新生するが、オートファゴソームに包まれたものすべてが基本的に分解対象となることから、オートファゴソーム形成機構の理解が非常に重要である。オートファゴソーム形成には、18種類の Atg 蛋白質が必須であることが明らかにされており、そのうち8種類は2つのユビキチン様修飾系である Atg8系と Atg12系を構成している。ユビキチン様修飾因子 Atg8 および Atg12 は、共通の E1 様酵素である Atg7 により ATP 依存的に活性化されたのち、それぞれの E2 様酵素である Atg3 および Atg10 に受け渡され、最終的に Atg8 はリン脂質の一種、ホスファチジルエタノールアミン (PE) とアミド結合を、Atg12 は Atg5 とイソペプチド結合を形成する。Atg8-PE 結合体および、Atg16 と複合体を形成した Atg12-Atg5 結合体は、オートファゴソーム前駆体膜上に局在し、オートファゴソーム形成と分解対象の認識に中心的な役割を担う。

これまでにユビキチンおよびユビキチンと相同性の高い修飾因子である NEDD や SUMO などの修飾系の構造生物学研究は広く行われており、修飾反応のメカニズムもかなり明らかとなっている。Atg 修飾系もユビキチン修飾系と類似の反応系と考えられてきたが、一方で構成する蛋白質すべてがユビキチン修飾系の構成因子との配列相同性をほとんど持たないことや、Atg8系では修飾相手が蛋白質でなく脂質であることなど、相違点も多い。特に Atg7 は、一般的な E1 が活性部位を一つしか持たないヘテロダイマーもしくはモノマーで機能するのに対し、活性部位が2つ存在するホモダイマーを形成して機能するなど、既知の E1 酵素の触媒機構とは顕著に異なることが予想される。したがって、Atg 修飾系の反応メカニズムを明らかにするためには、Atg 因子群の立体構造情報が不可欠である。我々はこれまで Atg 修飾系を構成する8種類の Atg 蛋白質に関する構造生物学的研究を進め、そのうち6種類 (Atg3,4,5,8,12,16) について世界に先駆けて立体構造決定に成功してきた。これまでの構造解析の結果、どの Atg 因子も配列相同性がないにも関わらずユビキチン系の因子と構造類似性があること、その一方で Atg 因子

独自の挿入構造を持っていることが明らかとなった。特に Atg7 に関しては、これまで立体構造が明らかとなっている E1 酵素すべてに保存されていた E2 結合ドメインや触媒システインドメインなどを持っていないことが配列から予想されている。したがって、Atg 修飾系の反応機構はユビキチン系で明らかとされた機構では説明できず、独自のものを持つことが予想された。

### 2. 研究の目的

オートファジーは細胞内の主要な分解系として多様な生理機能を担い、その異常は神経変性疾患等の重篤な疾病を引き起こす。オートファジーの分子機構解明のためには、その主要な制御系である Atg8 修飾系および Atg12 修飾系の理解が必須である。Atg7 はこれらに共通の E1 様酵素として双方の修飾反応を制御している中心的因子であるが、既知の E1 とは顕著に異なる配列とドメイン構成を持つことから、その触媒機構の詳細は不明である。本研究では Atg7 とその相互作用因子群との複合体構造解析および構造情報に基づいた機能解析を進めることで、Atg 修飾反応のメカニズムを分子レベルで明らかにし、オートファジーの人為的制御に道を拓くことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛋白質の調製

大腸菌 BL21 を宿主として、GST 融合蛋白質として各 Atg 因子を過剰発現し、GST アフィニティーカラムで初期精製を行った。HRV 3C プロテアーゼ消化により GST タグを除去したのち、さらにイオン交換カラムあるいはゲルろ過カラムを用いて精製を行うことで最終精製品を得た。

#### (2) 構造解析

結晶化は sitting-drop 蒸気拡散法により 20 で行った。初期スクリーニングは市販の各種結晶化スクリーニングキットを用いて行った。X 線回折データの収集は大型放射光施設 Spring8 もしくは PF を利用して行った。Atg7 の構造解析では Atg7 に結合した Zn イオンを用いて、Atg7-Atg3 複合体の構造解析ではセレノメチオニンを用いて、異常分散法により初期位相を決定した。Atg7-Atg8 複合体および Atg7-Atg10 複合体は分子置換法により初期位相を決定した。構造精密化およびモデリングはプログラム CNS および COOT を用いて行った。NMR による構造解析では、プロトン間距離情報を  $^{13}\text{C}$ -edited および  $^{15}\text{N}$ -edited NOESY-HSQC スペクトルから得たのち、プログラム CYANA を用いて構造計算を行った。

#### (3) *In vitro* 変異体解析

Atg7 による Atg8 活性化反応は、精製した Atg7 と Atg8 に MgATP を添加することで、ま

た Atg3~Atg8 あるいは Atg10~Atg12 チオエステル中間体形成反応は、精製した Atg7, Atg3, Atg8 あるいは Atg7, Atg12, Atg10 に MgATP を添加することで *in vitro* で行った。各種変異体蛋白質を調製し、*in vitro* 反応系に供することで変異の効果を検証した。また蛋白質間の親和性は *in vitro* プルダウン法により検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Atg7 の構造

一般的 E1 はヘテロ二量体もしくは単量体として機能し、活性のあるアデニル化ドメイン (AD)、活性のないアデニル化様ドメイン、触媒システインドメイン、そして E2 結合を担うユビキチンフォールドドメイン (Ubiquitin-fold domain: Ufd) からなっており、触媒システイン残基、ATP 結合部位および E2 結合部位をそれぞれ一つずつ持つ (図 1a)。ほぼ全長の Atg7 の結晶構造を決定した結果、Atg7 は N 末端ドメイン (NTD) および C 末端ドメイン (CTD) が短いリンカーでつながれた構造を持ち、CTD の二量体化を通してホモ二量体構造をとることが明らかとなった。CTD は他の E1 酵素の AD と高い構造相同性を持つが、その最 C 末端領域 (extreme CTD: ECTD) は Atg7 に固有の構造であった。触媒システイン残基は CTD 内のフレキシブルなループ (cross-over loop: CL) 上に存在しており、他の E1 のような特定のドメイン構造を有さなかった。一方 NTD は他の E1 には全く見られない構造と配列を持っていた。*In vitro* 結合実験の結果、Atg7 は NTD を介して E2 酵素である Atg3 および Atg10 を、CTD を介して Atg8 および Atg12 を認識することが明らかとなった。Atg7 はホモ二量体構造をとるため、触媒システイン残基、ATP 結合部位および E2 結合部位をそれぞれ二つずつ持つ。

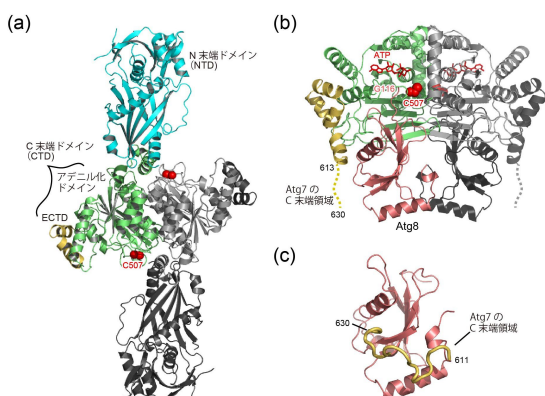


図 1 Atg7 単体および Atg8 との複合体の構造

##### (2) Atg7 による Atg8 の二段階認識機構

続いて Atg7CTD-Atg8 複合体の構造を X 線結晶構造解析法により (図 1b)、Atg7ECTD-Atg8 複合体の構造と NMR 法により決定した (図 1c)。興味深いことに、結晶構造と NMR 構造では互いに相容れない相互作用を形成していた。構造情報に基づいた変異体解析を進めた結果、どちらの相互作用も Atg7 による Atg8 の活性

化には重要であること、一方で Atg7-Atg8 間の親和性には NMR 構造で見られた相互作用が主に寄与していることが分かった。以上の結果から、Atg7 による Atg8 の認識は、以下に示す二段階を経て行われるというモデルが考えられた。まず Atg7 の ECTD にある酸性残基に富んだ天然変性領域で Atg8 の塩基性に富んだ面を認識し、「釣り」のように Atg8 を捕捉する。この際イオン性の相互作用に加えて疎水性の相互作用も重要である。この相互作用は NMR 法により明らかとなった。続いて Atg8 は ECTD から AD へと受け渡され、Atg7 の触媒部位に Atg8 の C 末端グリシンが結合する。Atg7CTD-Atg8-ATP 複合体の結晶構造では、Atg8 の C 末端グリシンは ATP の  $\alpha$  リン原子近傍に位置し、アデニル化反応に適した相対配置をとっていた。また Atg7 の触媒システイン残基が含まれる CL は Atg8 のグリシン残基上方に位置しており、CL の局所的なコンホメーション変化により触媒システイン残基は Atg8 の C 末端グリシンを攻撃できる位置に存在していた。したがって、Atg8 が触媒部位に結合した後は、アデニル化反応およびチオエステル結合反応が大規模な配置換え等を伴わずに進行すると考えられる。

##### (3) Atg7 による E2 認識とトランス転移機構

Atg7 とチオエステル結合を形成した Atg8 および Atg12 は、それぞれの E2 酵素である Atg3 および Atg10 の触媒システイン残基へと受け渡される。Atg7NTD-Atg3 複合体および Atg7NTD-Atg10 複合体の結晶構造を決定した結果 (図 2)、Atg3 および Atg10 はどちらも  $\beta$  ストランド 4 番下流のループ領域を用いて Atg7 の NTD の  $\beta$  ストランド 15 番付近に類似の位置関係で結合することが明らかとなった。Atg10 の場合、この相互作用で分子間の  $\beta$  シートが形成されるが、Atg3 の場合はそれが見られず、主に側鎖を介した相互作用になっていた。

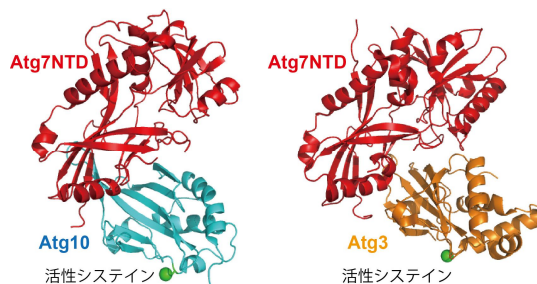


図 2 Atg10 および Atg3 との複合体構造

複合体構造に全長の Atg7 の構造を重ねたところ、Atg7 の NTD に結合した Atg3 および Atg10 の触媒システイン残基は、同じ Atg7 分子の触媒システイン残基よりも、ホモ二量体を形成したもう一分子の Atg7 の触媒システイン残基に圧倒的に近い配置をとっていた。このことは、Atg7 とチオエステル結合を形成した Atg8 および Atg12 が、同じ Atg7 分子に結合した E2 酵素ではなく、ホモ二量体のも

う一分子の Atg7 に結合した E2 酵素へと受け渡される可能性を強く示唆していた（前者をシス機構、後者をトランス機構と呼ぶ）。一方の NTD を欠損させヘテロ二量体化した Atg7 変異体を用いた生化学的解析により、Atg7 はシスの機構ではなく、トランスの機構で Atg8 を Atg3 へ、Atg12 を Atg10 へと受け渡すことが実際に証明された。これは他の E1 酵素では見られない、Atg7 に固有の機構であり、今後オートファジー特異的制御剤開発の良いターゲットとなることが期待できる。

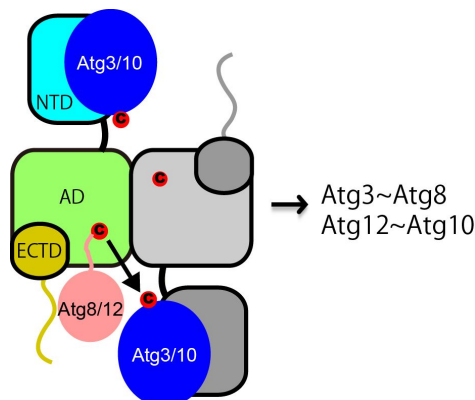


図3 トランス機構による転移反応

## 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8件)

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

Noda, N. N., Fujioka, Y., Hanada, T., Ohsumi, Y. and Inagaki, F., Structure of the Atg12-Atg5 conjugate reveals a platform for stimulating Atg8-PE conjugation, EMBO Reports, Vol.14, 206-211, 2013, 査読有  
DOI:10.1038/embor.2012.208

野田 展生, オートファジーの構造生物学, 生化学, Vol. 85, 762-774, 2013, 査読無

<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/06/85-09-04.pdf>

野田 展生, オートファジーの構造生物学 主要 Atg 因子の構造の最新像と未解決課題, 実験医学, Vol.31, 1355-1361, 2013, 査読無

Yamaguchi, M., Matoba, K., Sawada, R., Fujioka, Y., Nakatogawa, H., Yamamoto, H., Kobashigawa, Y., Hoshida, H., Akada, R., Ohsumi, Y., Noda, N. N. and

Inagaki, F., Non-canonical recognition and Ubl-loading of distinct E2s by autophagy-essential Atg7, Nature Structural & Molecular Biology, Vol.19, 1250-1256, 2012, 査読有

DOI:10.1038/nsmb.2451

Yamaguchi, M., Noda, N. N., Yamamoto, H., Shima, T., Kumeta, H., Kobashigawa, Y., Akada, R., Ohsumi, Y. and Inagaki, F., Structural insights into Atg10-mediated formation of the autophagy-essential Atg12-Atg5 conjugate, Structure, Vol.20, 1244-1254, 2012, 査読有

DOI:10.1016/j.str.2012.04.018

野田 展生, Atg7 とその Atg8 結合型の立体構造, 日本結晶学会誌, 54, 166-171, 2012, 査読有

DOI:10.5940/jcrsj.54.166

Noda, N. N., Satoo, K., Fujioka, Y., Kumeta, H., Ogura, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y. and Inagaki, F., Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7, Molecular Cell, Vol.44, 462-475, 2011, 査読有

DOI:10.1016/j.molcel.2011.08.035

[学会発表](計7件)

野田 展生, 構造生物学と生化学から迫るオートファジーの分子機構, 平成25年度日本生化学会関東支部例会, 平成25年6月15日, 山梨大学甲府キャンパス(山梨県甲府市)

Nobuo N. Noda, Structural insights into ubiquitin-like modifications essential for autophagy, 2013 KSBMB Annual Meeting, May 15, 2013, COEX (Seoul, Korea)

野田 展生, オートファジーに必須な Atg 結合系の構造基盤, 第85回日本生化学会大会, 平成24年12月14日, 福岡国際会議場(福岡市)

野田 展生, オートファジーの構造生物学的研究, 第85回日本生化学会大会, 平成24年12月14日, 福岡国際会議場(福岡市)

Nobuo N. Noda, Structure and function of the autophagy-essential E1, Atg7, 6th International Symposium on Autophagy: Molecular Mechanism, Cellular and Physiological Functions and Diseases, Oct. 29, 2012, Bankoku Shinryokan (Okinawa, Japan)

Nobuo N. Noda, Structural basis of Atg8 activation by Atg7, 2nd Japan-Sino Autophagy Symposium, Oct. 7, 2011, Shonan Village Center (Kanagawa, Japan)

Nobuo N. Noda, Structural basis of Atg8

activation and transfer to Atg3 by Atg7,  
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting  
On The Ubiquitin Family, May 19, 2011,  
Cold Spring Harbor Laboratory (Cold  
Spring Harbor, USA)

〔図書〕(計5件)

Noda, N. N. 他, Elsevier, Autophagy:  
Cancer, Other Pathologies,  
Inflammation, Immunity, Infection,  
and Aging Volume 3 - Mitophagy, 57-65,  
2014

Noda, N. N. 他, Elsevier, Autophagy:  
Cancer, Other Pathologies,  
Inflammation, Immunity, Infection,  
and Aging Volume 2 - Role in General  
Diseases, 39-48, 2013

野田 展生 他, 化学同人, オートファ  
ジー 生命をささえる細胞の自己分解シ  
ステム, 77-88, 2013

Noda, N. N. 他, InTECH, Biochemistry,  
333-348, 2011

Noda, N. N. 他, InTECH, Current Trends  
in X-Ray Crystallography, 381-396,  
2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/laboratories/molecule/summary.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 展生 (NODA, Nobuo)

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

研究者番号: 40396297