

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870828

研究課題名(和文)オートファジーの膜形成を担うAtg8の脱脂質化の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of delipidation of Atg8 that mediates autophagosome formation

研究代表者

藤岡 優子(野田優子)(FUJIOKA, Yuko (NODA Yuko))

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：80399964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーの膜動態に重要なタンパク質Atg8は、リン脂質によって修飾され膜に局在することによってオートファジーの進行に寄与することが知られている。Atg4は脂質化されたAtg8を脱脂質化する酵素でありAtg8のリサイクルにも寄与しているが、その制御機構は明らかになっていなかった。本研究ではAtg4の活性の制御について試験管内で検討した。その結果、Atg4の活性は他のAtgタンパク質との相互作用やAtg1によるリン酸化では影響を受けなかった一方、Atg4自身の領域で制御を受けることを示唆するデータを得た。Atg4は細胞内局在等の変化に応じて自身の活性を制御する能力を有しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Atg8, a ubiquitin-like protein important for membrane dynamics during autophagy, is modified with a phospholipid and localizes to the membrane, thereby contributes to the progression of autophagy. Atg4 is a deconjugating enzyme for lipidated Atg8 and contributes to the recycling of Atg8; however, the regulation mechanism of Atg4 activity remained elusive. Here, I studied the components that regulate Atg4 activity in vitro. The data showed that the activity of Atg4 was affected by neither the interaction with other Atg proteins nor Atg1-mediated phosphorylation, but by the regulatory regions within Atg4. These data suggested that Atg4 might possess an ability to regulate its deconjugating activity depending on the intracellular localization.

研究分野：生物学

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーが飢餓などで誘導されると、被分解物を細胞質から隔離する“オートファゴソーム”と呼ばれる二重膜構造体が形成される。出芽酵母では飢餓条件下、18種類あるAtg (AuTophaGy) タンパク質の殆どが液胞近傍の前オートファゴソーム構造体 (pre-autophagosomal structure : PAS) に局在し、隔離膜の形成に働く。オートファゴソーム形成にはユビキチン結合系に類似する二つの結合系、Atg8 結合系と Atg12 結合系が重要な役割を担う。ユビキチン様タンパク質である Atg8 と Atg12 は共通の活性化酵素 (E1) である Atg7 により活性化されたのち、結合酵素 (E2) である Atg3 と Atg10 にそれぞれ受け渡され、最終的には Atg8-PE (phosphatidylethanolamine) 結合体と Atg12-Atg5 結合体を形成する。Atg12-Atg5 結合体は更に Atg16 と相互作用して Atg12-Atg5-Atg16 複合体を形成する。Atg8-PE 結合体と Atg12-Atg5-Atg16 複合体は PAS および伸張中の隔離膜上に局在し、オートファゴソーム形成に働く。Atg8-PE 結合体は膜のヘミヒュージョン活性を持ち、膜の伸長に直接関与することが示唆されている。働きを終えた Atg8-PE 結合体は、特異的プロテアーゼである Atg4 によって脱 PE 化され再利用される。また、Atg4 は Atg8 が PE と結合する際に利用するグリシン残基が露出するように、全長 Atg8 をプロセシングする役割も果たしている。一方、オートファジーの機能を妨害することによって宿主の免疫機構を免れている病原細菌が報告された (Choy et al., Science 2012)。レジオネラ菌のエフェクタータンパク質である RavZ は、膜に結合している Atg8 を特異的に切断するプロテアーゼであるが、Atg4 と異なり膜に結合していない Atg8 は全く切断することができない。また、RavZ はグリシン残基の C 末端側でなく N 末端側を特異的に切断することで Atg8 を不可逆的に不活化し、オートファジーを阻害する。

2. 研究の目的

上述したように Atg4 は Atg8-PE 結合体の脱脂質化反応を担うプロテアーゼである。興味深いことに、オートファジー関連膜上で膜形成に働いている最中の Atg8-PE 結合体は Atg4 により切断を受けにくいことが報告されている (Nakatogawa et al., Autophagy 2012)。つまりオートファジー関連膜上において、Atg4 のはたらきを制御している分子の存在が想定される。そこで申請者は、Atg8-PE 結合体を組み込んだ人工膜と Atg4 の相互作用解析を行い、制御因子の候補と考えられる Atg タンパク質群が相互作用に与える影響を調べる。制御因子を同定することに成功したのちには、複合体の立体構造解析を通して阻害メカニズムの詳細を明らかにする。また似て非なる切断活性を持つレジオネラ菌由来

RavZ の構造機能解析を行い、Atg4 と比較することで、Atg4 のメカニズムの理解を深める。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の調製

大腸菌 BL21(DE3) を宿主として、アフィニティークロマトグラフィー用のタグをつけた状態で各 Atg タンパク質および RavZ を過剰発現し、アフィニティークロマトグラフィーで粗精製を行った。引き続きイオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーを用いて高度な精製を行った。発現が見られなかったタンパク質や、非特異的な凝集などが見られ性質が悪いと判断したタンパク質に関しては、発現ベクターの変更、アフィニータグの変更、タンパク質の長さの変更、シャペロンタンパク質との共発現、結合タンパク質との共発現を行った。加えて、多様な種のホモログタンパク質についての発現の検討もを行い、出芽酵母に加えて分裂酵母、耐熱性酵母二種、ヒト由来のホモログについて発現を試みた。大腸菌からではタンパク質が得られないものに関しては、昆虫細胞からの発現精製を検討した。昆虫細胞における発現は Thermo Fisher Scientific 社の Bac-to-Bac システムに則って行った。昆虫細胞で発現したタンパク質はアフィニティークロマトグラフィーで粗精製を行い、引き続きゲルろ過クロマトグラフィーを用いて高度な精製を行った。

(2) 人工膜の調製

リポソームは PC, PE に加えて、オートファジーの進行に必須な PI3P を用いて、超音波破砕機を使用して調製した。平面膜モデルであるナノディスクの調製では、まず Membrane Scaffold Protein (MSP) を大腸菌を用いて大量発現し、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。界面活性剤で可溶化した各種脂質と MSP を混合し、Biobeads で界面活性剤を除去することでナノディスクを形成させた。その後ゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで精製ナノディスクを得た。

(3) *in vitro* 反応系を用いた Atg4 阻害因子の解析

in vitro での Atg8-PE 結合反応系 (Atg3 Atg7, Atg8, 人工膜, MgATP 等を含む) に対し、Atg4 を様々な濃度および条件 (時間等) で添加し、反応サンプルを尿素含有 SDS-PAGE で分析した。適切な反応条件を決定したのちに、Atg4 と Atg8-PE の相互作用を阻害する因子に関して、脱結合反応系に添加し、阻害活性を速度論的に解析した。Atg1 によるリン酸化は、被リン酸化タンパク質、Atg1, MgATP を混合することによって行った。相互作用解析は、GST プルダウン実験やゲルろ過クロマトグラフィー分析によって行った。

(4) 結晶化スクリーニング

結晶化のスクリーニングは sitting-drop 蒸気拡散法により 20 で行った。結晶化剤は市販の各種結晶化スクリーニングキットを

用いた。

4. 研究成果

Atg8-PE と Atg4 の間の相互作用解析に関しては、まず Atg8 を各種人工膜上の PE に結合させたものを調製した。平面膜のモデルとしては脂質二重層を膜骨格タンパク質で囲むことで水溶性にしたナノディスクを調製した。調製に際しては膜脂質の組成の検討を繰り返した。その結果、*in vitro* Atg8 結合反応系にナノディスクを用いることで、ナノディスク膜内の PE と Atg8 を結合させる反応に成功した。

Atg4 の活性制御因子の同定に関しては、先行研究などから申請者が想定したターゲットの制御因子の調製を試みたものの、非特異的凝集などを起こさないような、活性を保持したタンパク質の調製に難航した。そのため、様々な種由来ホモログの発現精製を検討することとなった。同時に様々な種における *in vitro* Atg8 結合反応系を構築した。長期にわたる検討の結果、同じ生物種で制御因子候補と結合反応系を揃えて確立することに成功した。しかし予想に反して、制御因子候補の導入による Atg4 の脱 PE 化阻害は起こらず、候補因子すべてを同時に加えても阻害は起こらなかった。制御因子候補の中には 1 つキナーゼ (Atg1) が含まれていたことから、次にリン酸化による制御の可能性を考えた。そこで、Atg1 を用いて、系に導入するタンパク質のリン酸化を試みた。Atg1 は Atg タンパク質の中で唯一のタンパク質キナーゼであり、他の Atg タンパク質をリン酸化することによって、オートファジーの進行を制御することが報告されている。まず、Atg4 や制御因子候補が Atg1 によって直接リン酸化を受けるかどうかを *in vitro* で確認したところ、確かにリン酸化されることを確認した。そこで次に、Atg4 の活性制御における Atg1 によるリン酸化の影響を詳細に検討した。Atg4 自身が Atg1 にリン酸化されることで、Atg8 の脱 PE 化活性が変化するかどうかを検討したところ、有意な影響が見られなかった。次に Atg4 および Atg4 の相互作用因子を Atg1 によってリン酸化し、相互作用の変化を検討したが、リン酸化による相互作用への影響も見られなかった。そこで最後に、Atg4 自身が活性を制御している可能性を検討した。ナノディスクやリポソームに組み込まれた Atg8-PE について、各種 Atg4 欠損変異体を導入して活性を測定したところ、Atg4 のフレキシブルな領域が活性を制御していることが示唆されるデータが得られた。Atg4 は細胞内局在に応じて、自身のコンフォメーションを変化させ、脱 PE 化の活性や膜との相互作用を制御している可能性が考えられるが、今後細胞レベルでの更なる検証が必要である。

RavZ については発現、精製系を確立し、結晶化スクリーニングを繰り返していたが良好な反射が得られるような結晶を得ること

ができなかった。その過程で、競合するグループによって RavZ の結晶構造が報告された (Horenkamp et al., *Dev. Cell* 2015; Yang et al., *Elife* 2017)。その構造を Atg4 と比較した結果、RavZ は Atg4 とは全く異なる構造およびメカニズムで活性を発現していることが示唆され、本研究の目的である Atg4 の活性制御機構解明には資さないものであった。

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 5 件)

Suzuki H, Osawa T, Fujioka Y, Noda NN, Structural biology of the core autophagy machinery, *Curr Opin Struct Biol*, 査読有, 43:10-17, 2017, doi: 10.1016/j.sbi.2016.09.010.

Yamamoto H, Fujioka Y, Suzuki SW, Noshiro D, Suzuki H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Ando T, Noda NN, Ohsumi Y, The Intrinsically Disordered Protein Atg13 Mediates Supramolecular Assembly of Autophagy Initiation Complexes, *Dev Cell*, 査読有, 38(1):86-99, 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.015.

Wu F, Watanabe Y, Guo XY, Qi X, Wang P, Zhao HY, Wang Z, Fujioka Y, Zhang H, Ren JQ, Fang TC, Shen YX, Feng W, Hu JJ, Noda NN, Zhang H, Structural Basis of the Differential Function of the Two *C. elegans* Atg8 Homologs, LGG-1 and LGG-2, in Autophagy, *Mol Cell*, 査読有, 60(6):914-29, 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.11.019.

Noda NN, Fujioka Y, Atg1 family kinases in autophagy initiation, *Cell Mol Life Sci*, 査読有, 72(16):3083-96, 2015, doi: 10.1007/s00018-015-1917-z.

Fujioka Y, Suzuki SW, Yamamoto H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Akada R, Inagaki F, Ohsumi Y, Noda NN, Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex, *Nat Struct Mol Biol.*, 査読有, 21(6):513-21, 2014, doi: 10.1038/nsmb.2822.

[学会発表](計 4 件)

Fujioka Y, Yamamoto H, Suzuki SW, Ohsumi Y, Noda NN, Structural basis

of the pre-autophagosomal structure assembly mediated by an intrinsically disordered protein Atg13, 内藤コンファレンス「生命科学に革命をもたらす最先端構造生物学」, 2016年10月6日, シャトラーゼガトーキングダムサッポロ(北海道札幌市)

藤岡優子, 山本林, 鈴木翔, 大隅良典, 野田展生, プレオートファゴソーム構造体の中核複合体の in vitro 再構成と性状解析, BMB2015, 2015年12月1日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

藤岡優子, 山本林, 鈴木翔, 能代大輔, 有坂文雄, 安藤敏夫, 大隅良典, 野田展生, PAS の中核複合体の in vitro 再構成と溶液構造解析, 第9回オートファジー研究会, 2015年11月16日, 淡路夢舞台(兵庫県淡路市)

Fujioka Y, Suzuki SW, Yamamoto H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Akada R, Inagaki F, Ohsumi Y, Noda NN, Molecular mechanism of PAS (pre-autophagosomal structure) organization., 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(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
微生物化学研究所 HP
<http://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤岡 優子 (FUJIOKA, Yuko)
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: 80399964