

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：72801

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25111004

研究課題名(和文)オートファジーを担うAtgタンパク質群の構造基盤

研究課題名(英文)Structural basis of Atg proteins responsible for autophagy

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・部長

研究者番号：40396297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 102,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーの始動を司るAtg1複合体およびAtg101、オートファゴソーム形成と積荷認識に関わるAtg8の線虫ホモログ群、酵母における選択的オートファジーの積荷Ape1およびその選択的アダプターAtg19等の立体構造をX線結晶構造解析法により決定した。構造情報に基づいた機能解析を行なうことで、飢餓によるオートファジー始動のメカニズム、高等生物におけるAtg8ホモログ間の機能分担、蛋白質凝集体の選択的オートファジーにおける凝集体認識機構などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have determined the crystal structures of the autophagy-initiating Atg1 complex and Atg101, the worm homologs of Atg8 that mediate autophagosome formation and cargo recognition, as well as the selective cargo Ape1 and its adaptor Atg19. By functional analyses based on the structural information, we have revealed the molecular mechanisms of autophagy initiation upon starvation, different functions mediated by Atg8 homologs, and selective recognition of protein aggregates during selective autophagy.

研究分野：構造生物学

キーワード：オートファジー 結晶構造 リン酸化 選択的オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは飢餓により誘導される、真核細胞に保存された基本的な細胞内分解システムである。高等生物ではオートファジーは様々な生理的機能を担い、その異常は神経変性疾患等の重篤な疾病を引き起こす。酵母をモデル生物としたこれまでの研究で、オートファジーに必須な Atg タンパク質群が 30 以上同定されてきた。そして Atg 結合系に関わる 8 つの Atg 因子について立体構造が明らかとなってきた。しかしオートファゴソーム形成に関わる主要 Atg 因子群や選択的基質認識に関わるアダプター因子群に関する構造情報は決定的に不足しており、オートファゴソーム形成や選択的基質認識の分子機構の理解は遅れている。さらに Atg 因子の哺乳類と酵母の間の構造的差異に関する研究もほとんどされておらず、高等生物固有のオートファジー制御機構の理解が遅れている。

2. 研究の目的

本研究課題では、酵母の主要 Atg 因子群、様々な選択的基質認識に関わるアダプター因子群、そして哺乳類オートファジーを制御する因子群の構造解析を行い、オートファゴソーム形成機構や選択的基質認識機構など、オートファジーの未解決課題解明に向けて構造基盤を確立することを目指した。

3. 研究の方法

出芽酵母においてオートファゴソーム形成の中核を担うと考えられる主要 Atg 因子群、選択的オートファジーを担うアダプター因子群、そして哺乳類固有の因子に関してリコンビナント蛋白質を調製し、主に X 線結晶構造解析法による構造生物学的研究を行った。得られた構造に基づき変異体を作製し、*in vitro* で機能解析を行なうとともに、出芽酵母や哺乳類細胞を用いた機能解析も行ない、構造から得られた知見の検証を行った。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母 Atg1 複合体の構造とオートファジー始動機構

オートファジーは飢餓で強く誘導される。出芽酵母では飢餓依存的に Atg13 が脱リン酸化し、Atg1、Atg17 などと Atg1 複合体を形成し、オートファジーの始動に働く。Atg13 の天然変性領域内に Atg1 結合領域および Atg17 結合領域を同定し、小型化した Atg1-Atg13 複合体および Atg13-Atg17 複合体の結晶構造を決定した。その結果、Atg1 は MIT ドメインを持ち、Atg13 は MIT 相互作用モチーフ (MIM) を用いてそれに結合すること、一方 Atg13 は短い Atg17 結合領域 (17BR) で Atg17 の疎水性ポケットに結合することが明らかとなった。さらに飢餓依存的に脱リン酸化を受ける Atg13 の残基を LC-MS/MS により網羅的に同定し、MIM および 17BR のリン酸化が Atg1 および Atg17 との相互作用を負に制御しているこ

とを明らかにした。さらに Atg13 内に第二の Atg17 結合領域 (17LR) を同定し、その結合構造を決定した。構造情報に基づいた機能解析の結果、Atg13 がひも状の構造を用いて Atg17 分子同士を繋ぎとめ、Atg1 複合体の高次会合体形成に働くこと、その結果オートファゴソーム形成の場である PAS が構築されることを明らかにした。

(2) 高等生物のオートファジー始動を制御する Atg101 の構造機能解析

計画研究の水島グループと共同で、オートファジー始動複合体サブユニットの Atg101-Atg13 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析法により決定した。その結果、Atg101 は Atg13 の N 末端領域と同様に HORMA ドメイン構造を持ち Atg13 と HORMA-HORMA 複合体を形成すること、その反対面に特徴的な WF フィンガーをもち下流の Atg 因子の集積に重要であることを明らかにした。

(3) 高等生物における Atg8 ホモログ間の構造の差異と機能分担との関連の解明

Atg8 はオートファジーにおける中心的な制御因子であり、高等生物では複数ホモログが存在することが知られている。線虫の Atg8 ホモログ LGG-1、LGG-2 の結晶構造を多様な結合相手との複合体状態で決定し、これまでに報告された哺乳類ホモログとの構造比較を行った結果、LGG-1 および哺乳類 GABARAP ファミリーはクローズ型、LGG-2 および哺乳類 LC3 ファミリーはオープン型の N 末端構造を取ることが明らかとなった。詳細な機能解析の結果、クローズ型構造は膜の融合活性に必要であることが示唆された。また 2 つのファミリー間でターゲットの特異性に違いがあることも明らかとなり、高等生物における Atg8 ファミリーの機能分担解明のための構造基盤の確立に成功した。

(4) 酵母における Ape1 の選択的オートファジーの構造基盤

出芽酵母におけるオートファジーの選択的積荷である Ape1 について、単独あるいはアダプター蛋白質である Atg19 との複合体として結晶構造を決定した。その結果、Ape1 はホモ 1 2 量体からなる正四面体構造を取り、1 2 本のプロペプチドを外に提示していること、プロペプチドはホモ三量体コイルドコイル構造を取ること、一方で Atg19 のコイルドコイルはプロペプチドと 2:1 のヘテロ三量体コイルドコイル構造を取ることが明らかとなった。その結果 Ape1 はプロペプチドを介して凝集する一方、Atg19 はその表面選択的に結合することで凝集体のサイズを制御し、オートファジーの積荷となるのに適したサイズに制御していることを明らかにした。

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 3 2 件)

以下は全て査読有り

1. Yamaguchi, M., Satoo, K., Suzuki, H., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F., *Noda, N. N. Atg7 activates an autophagy-essential ubiquitin-like protein Atg8 through multi-step recognition. *J. Mol. Biol.* 430, 249-257 (2018). DOI: 10.1016/j.jmb.2017.12.002.
2. Suzuki, H. and *Noda, N. N. Biophysical characterization of Atg11, a scaffold protein essential for selective autophagy in yeast. *FEBS Open Bio* 8, 110-116 (2017). DOI: 10.1002/2211-5463.12355.
3. Yamasaki, A. and *Noda, N. N. Structural biology of the Cvt pathway. *J. Mol. Biol.* 429, 531-542 (2017). DOI: 10.1016/j.jmb.2017.01.003.
4. Suzuki, H., Osawa, T., Fujioka, Y. and *Noda, N. N. Structural biology of the core autophagy machinery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 43, 10-17 (2017). DOI: 10.1016/j.sbi.2016.09.010.
5. Yamamoto, H., Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Ando, T., *Noda, N. N. and *Ohsumi, Y. The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes. *Dev. Cell* 38, 86-99 (2016). DOI: 10.1016/j.devcel.2016.06.015.
6. Yamasaki, A., Watanabe, Y., Adachi, W., Suzuki, K., Matoba, K., Kirisako, H., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., Inagaki, F. and *Noda, N. N. Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. *Cell Rep.* 16, 19-27 (2016). DOI: 10.1016/j.celrep.2016.05.066.
7. *Noda, N. N. and *Mizushima, N. Atg101: not just an accessory subunit in the autophagy-initiation complex. *Cell Struct. Funct.* 41, 13-20 (2016). DOI: 10.1247/csf.15013.
8. Suzuki, H., Kaizuka, T., Mizushima, N. and *Noda, N. N. Open and closed HORMA5 regulate autophagy initiation. *Autophagy* 11, 2123-2124 (2015). DOI: 10.1080/15548627.2015.1091144.
9. Wu, F., Watanabe, Y., Guo, X. Y., Qi, X., Wang, P., Zhao, H. Y., Wang, Z., Fujioka, Y., Zhang, H., Ren, J. Q., Fang, T. C., Shen, Y. X., Feng, W., Hu, J. J., *Noda, N. N. and *Zhang, H. Structural basis of the differential function of the two *C. elegans* Atg8 homologs, LGG-1 and LGG-2, in autophagy. *Mol. Cell* 60, 914-929 (2015). DOI: 10.1016/j.molcel.2015.11.019.
10. Yamamoto, H., Shima, T., Yamaguchi, M., Mochizuki, Y., Hoshida, H., Kakuta, S., Kondo-Kakuta, C., Noda, N. N., Inagaki, F., Itoh, T., Akada, R. and *Ohsumi, Y. The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* is a useful organism for structural and biochemical studies of autophagy. *J. Biol. Chem.* 290, 29506-29518 (2015). DOI: 10.1074/jbc.M115.684233.
11. Suzuki, H., Kaizuka, T., *Mizushima, N., *Noda, N. N. Structure of the Atg101 - Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in mammalian autophagy initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22: 572 - 580 (2015). DOI: 10.1038/nsmb.3036.
12. *Noda, N. N., *Inagaki, F. Mechanisms of autophagy. *Annu. Rev. Biophys.* 44, 101-122 (2015). DOI: 10.1146/annurev-biophys-060414-034248.
13. *Noda, N. N., Fujioka, Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cell Mol. Life Sci.* 72, 3083-96 (2015). DOI: 10.1007/s00018-015-1917-z.
14. Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., *Ohsumi, Y., *Noda, N. N. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21:513-521 (2014). DOI: 10.1038/nsmb.2822.
15. *Suzuki, K., Nakamura, S., Morimoto, M., Fujii, K., Noda, N. N., Inagaki, F., Ohsumi, Y. Proteomic Profiling of Autophagosome Cargo in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 9:e91651 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0091651.

[学会発表](計 2 5 件)

1. Nobuo N. Noda. "Molecular mechanisms of initial steps of autophagy" 24th IUBMB Congress. 2018.
2. Nobuo N. Noda. "Identification of helical AIMS as a novel type of Atg8-interacting motif" The 8th International Symposium on Autophagy. 2017.
3. Nobuo N. Noda. "Structural basis of the Cvt pathway" The 4th Sino-Japan Symposium on Autophagy. 2016.
4. Nobuo N. Noda. "Structure and

regulation of the autophagy initiation complex" The 16th Northeastern Asian Symposium on Autophagy: from Basic to Medicine. 2014.

5. Nobuo N. Noda. "Structural insights into ubiquitin-like modifications essential for autophagy" 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. 2014.
6. Nobuo N. Noda. "Structural basis of autophagy initiation by starvation" The 4th Asia Pacific Protein Association Conference. 2014.

〔その他〕

ホームページ等

領域 HP

<http://www.proteolysis.jp/autophagy/>

研究代表者 HP

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

新聞等報道

1. 信濃毎日新聞 2016.9.19 細胞のタンパク質分解 再利用 自食作用始動の仕組みを解明(野田・山本)
2. 岩手日報 2016.9.11 細胞自食 解明へ一歩(野田・山本)
3. 静岡新聞 2016.9.5 細胞の自食作用 始動仕組み解明(野田・山本)
4. 朝日新聞デジタル 2016.7.12 細胞の再利用「オートファジー」、動き出しの仕組み解明(野田・山本)
5. マイナビニュース 2016.7.12 オートファジーの初期過程に働く巨大複合体の仕組みを解明(野田・山本)
6. 日刊工業新聞 2016.7.12 オートファジー始動たんぱく質が巨大化する仕組み解明(野田・山本)
7. 日経産業新聞 2015.6.2 自食作用の引き金解明(野田・水島)
8. 日本経済新聞 2014.5.27 細胞の不要たんぱく質分解の仕組み解明(野田・山本)

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・部長

研究者番号：40396297