

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21608

研究課題名(和文)オートファジーに必須な6回膜貫通型タンパク質Atg9の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of autophagy essential protein Atg9

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・構造生物学研究部・研究員

研究者番号：60613792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーに必須な膜タンパク質の構造解析を目指し、大量発現系の構築、可溶化条件の探索を行なった。その結果、CCB染色で単一なバンドとして精製できる条件を確立した。抗体(Fab)-膜タンパク質複合体の結晶化を行ったが、構造解析には至っていない。次にクライオ電子顕微鏡による高分解能な単粒子解析を行うために、ナノディスク-膜タンパク質-Fab複合体を再構成した。ネガティブ染色により粒子を観察したところ、Fabが結合した粒子像が得られた。

研究成果の概要(英文)：To determine a structure of autophagy essential membrane protein, overexpression and solubilization conditions were established and the purity was high enough to be detected as a single band using CBB staining. Protein-Fab complex crystallization was performed, but structural analysis has not been the success. In order to observe the single particle by cryo-electron microscope, Nanodisc-protein-Fab complex was reconstituted. As a result, Fab bound particle was observed by negative staining.

研究分野：構造生物学

キーワード：オートファジー 膜タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内分解機構あるいはリサイクリング機構として知られている。オートファジーの進行過程は、分解対象物を二重膜で取り囲む過程と、それによって生成されるオートファゴソームと液胞（人はリソソーム）が融合する過程の二つに大別できる。(図1A)

酵母の遺伝学的な解析から、オートファジーに必須なタンパク質群が同定され、6つの機能グループに分類されている(Atg1 キナーゼ複合体、PI3 キナーゼ複合体、Atg2-Atg18 複合体、Atg12-Atg5 結合反応系、Atg8-PE 結合反応系、Atg9)。これらの機能グループはオートファジーが誘導されると液胞近傍に集積し、顕微鏡下で輝点として観察される。この輝点を PAS (Pre-Autophagosomal Structure) と呼び、初めに Atg1 キナーゼ複合体が集まり、続いて Atg9、PI3 キナーゼ複合体、Atg2-Atg18 複合体などと下流の因子が順序立って集積する。続いて、隔離膜と呼ばれるカップ状の膜構造体が伸長し、分解対象を包み込む(図1A)。

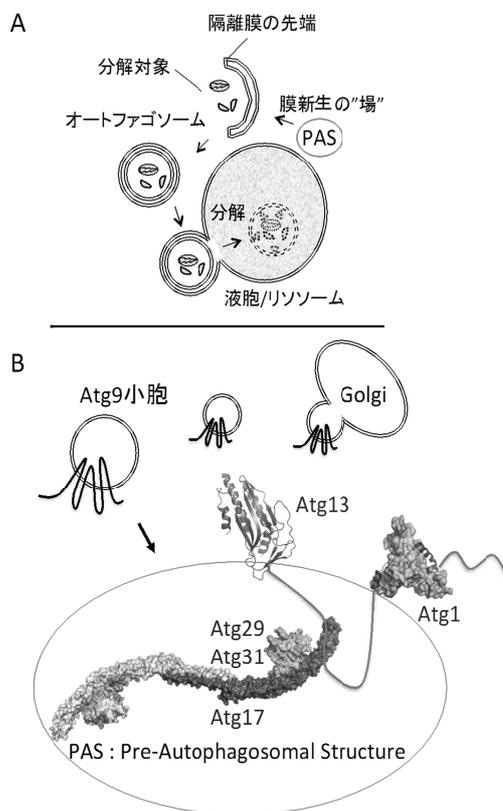


図1 オートファジー進行の模式図

Atg9はゴルジ体から出芽する30-60 nmの小胞として細胞質に局在し、Atg1 キナーゼ複合体に含まれる Atg13 依存的に PAS に集まることから、初期の膜成分として隔離膜伸長に使われる(図1B)。しかし、それだけでは隔離膜の伸長を説明できず、どこからか膜成分を流入することが考えられるが、その起源は不明である。さらに Atg9 はアミノ酸配列から6回膜貫通タンパク質であること、さらに、

膜外ドメインの大部分が天然変性領域であることが予測されている。

研究当初、Atg2、Atg9に関する構造情報は報告されておらず、これらのタンパク質の機能も不明である。近年 Atg2 の電子顕微鏡像が報告されたが、機能についてはよくわかっていない。

### 2. 研究の目的

オートファジーの進行は隔離膜の伸張や融合など複雑な膜動態を制御して達成される。Atg 必須遺伝子の中で唯一の膜タンパク質である Atg9 の機能を明らかにすることは、オートファジーを理解する上で欠かせない。本研究では Atg9 に関連するタンパク質の構造解析を行う。さらに Atg9 小胞の PAS への集積メカニズムや Atg9 の構造・機能を解明することで、分子レベルでのオートファジーの理解を目指す。

### 3. 研究の方法

X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行うために、以下の研究を行った。

- (1) リコンビナントタンパク質の調製  
酵母発現系を用い、目的タンパク質を大量発現する条件の検討を行った。続いて可溶化条件および熱安定性の高い生物種の Atg9 を探索した。
- (2) Atg9 安定化抗体の探索  
FSEC-TS 法 (Fluorescence-detection size exclusion chromatography based thermostability assay) は微量の粗精製タンパク質で熱安定性を測定できる方法で、ゲルろ過ピーク形状を GFP の蛍光で検出することで、迅速に熱安定性を検討することができる (Hattori et al., Structure. 2012)。この手法を用い、6種類の抗体 (Fab) との熱安定性を評価した。
- (3) 抗体複合体の結晶化  
1で調製したサンプルを用い、抗体 (Fab) との結晶化を行った。結晶化は蒸気拡散法や脂質中で結晶化を行う脂質キュービックフェーズ法を用いた。
- (4) ナノディスク再構成  
界面活性剤不使用で、Atg9 を取り扱うことができるように、ナノディスク Atg9 を調製した。
- (5) Negative 染色  
熱安定性の向上と特徴的な構造を付加させることを目的として、4で調製したナノディスク-Atg9 に Fab を加えた、ナノディスク-Atg9-Fab 複合体を調製した。これを用い、Negative 染色による電子顕微鏡解析を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 当初、His タグ発現系を構築したが収量、純度が共に低く、結晶化するにあたり問題であった。そこで初年度は Atg9 の可溶性条件およびアフィニティ精製法の再検討を行い、これまでよりも数倍可溶性効率がよく、構造純度の高い Atg9 を精製できる系を確立した。

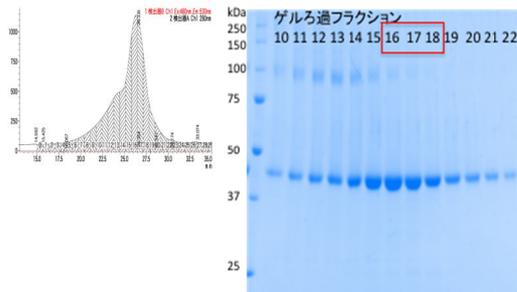


図 2 精製 Atg9 のゲル濾過クロマトグラフィ(右)と、その SDS-PAGE CBB 染色(左)

- (2) FSEC-TS 法により、6 種類の抗体が結合した Atg9 の熱安定性の評価を行なったところ、全ての抗体で安定性の向上が見られた。抗体 #2 は 20%程度、熱安定性の向上が見られた(図 3 B)。また、抗体 #2-Atg9 間の結合は、他の抗体と競合しないことも FSEC により明らかになった。

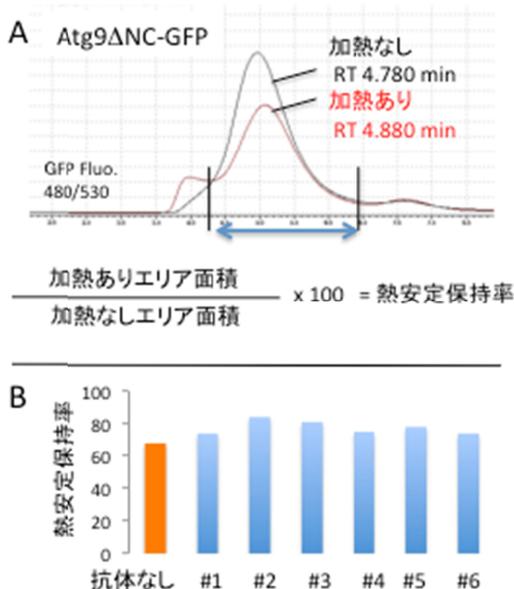


図 3 FSEC-TS 結果 (A) 蛍光検出によるクロマトグラフィチャート (B) 各種抗体の熱安定保持率

- (3) 精製した Fab-Atg9 複合体を様々な界面活性剤、添加剤、生物種などで結晶化を行った。しかし、タンパク質結晶は得られていない。

- (4) 界面活性剤で可溶化した Atg9 と膜骨格タンパク質、脂質を混合し、徐々に界面活性剤を除くことで、Atg9 をナノディスク中に再構成することに成功した(図 4)。このサンプルには膜骨格タンパク質、Atg9 が共に含まれていることを SDS-PAGE によって確認した。

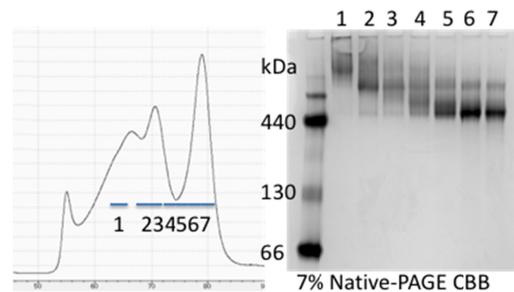


図 4 ナノディスク Atg9 のゲル濾過クロマトグラフィ(右)と、その Native-PAGE CBB 染色(左)

- (5) クライオ電子顕微鏡による単粒子解析に向けた検討を以下の通り行なった。ナノディスク Atg9 をネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察すると均一な粒子を確認できた。さらに抗体を結合させたナノディスクでは、抗体の形を 2D クラスアベレージにより確認できた(図 5)。

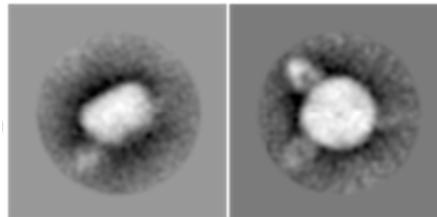


図 5 ナノディスク-Atg9-Fab 2D クラスアベレージ像

そこで、クライオ電子顕微鏡測定を行ったところ、ネガティブ測定時よりも小さな粒子が観察され、サンプル凍結時に粒子が崩壊していることが示唆された。現在もクライオ条件の検討中である。

結晶化という手順を経ないクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析は、構造解析手法として、近年注目されている。これは検出器の改良やデータ処理の進歩により、原子分解能で解析される例が報告されていることによる。2017 年にはクライオ電子顕微鏡の開発にノーベル化学賞が与えられた。これらの解析においても、構造純度の高い試料を調製することは重要であり、今回得られた成果を生かすことができる。これらの研究成果は Atg9 の構造解析を完了するための基礎的な知見となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

A.Yamasaki, Y. Watanabe, W. Adachi, K. Suzuki, K. Matoba, H. Kirisako, H. Kumeta, H. Nakatogawa, Y. Ohsumi, F. Inagaki and N. N. Noda. Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. 査読有 Cell Reports, 2016, 16, pp.19-27  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.066>

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

微生物化学研究所

<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・構造生物学研究部・研究員

研究者番号：60613792