

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21593

研究課題名(和文)哺乳類オートファジーに必須な巨大蛋白質FIP200の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural study of FIP200, a scaffold protein of mammalian autophagy initiation complex

研究代表者

鈴木 浩典(SUZUKI, Hironori)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員

研究者番号：20625694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーに関わるタンパク質群の多くは、出芽酵母からヒトに至る真核生物において広く保存されているものの、一部のタンパク質はヒトなどの高等真核生物に固有の因子であり、その一つがオートファジー始動複合体の足場タンパク質FIP200である。今回ヒト由来FIP200を用いて、試料調製に最適な領域を絞るとともに、得られた良質なサンプルを用いて結晶化と構造解析を行った。FIP200のC末端側の領域は平行なcoiled-coilダイマーを形成していた。このことから、複合体の足場として機能する巨大なタンパク質FIP200は平行な二量体構造をとることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：A lot of proteins involved in autophagy are widely conserved in eukaryotes from budding yeast to humans. However, some proteins are unique factors to higher eukaryotes such as human. One of which is FIP200, a scaffold protein of mammalian autophagy initiation complex. In this study, we first prepared to stable region to use biochemical analysis and crystallographic studies. Moreover, we crystallized and determined the structure of a part of FIP200. The C-terminal region of FIP200 formed a parallel coiled-coil dimer. This result indicates that the large protein FIP200 functioning as a scaffold protein assumes a parallel dimeric structure.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

マクロオートファジー(以後、オートファジー)は真核生物に広く保存された基本的な細胞内分解システムである。オートファジーは多様な生理的機能を担っており、その異常によりガンや神経変性疾患、感染症、代謝性疾患など重篤な疾患が引き起こされる。モデル生物である出芽酵母を用いた遺伝学的な解析により、多数のオートファジー関連(Atg)因子が同定された。これらの多くはヒトなどの高等な真核生物でも保存されている。哺乳類におけるオートファジーは以下のような過程で進行する。まず、小胞体近傍の Autophagosome formation site に Atg タンパク質群が集積する。続いて、この部分から隔離膜が出現し、湾曲伸張しながら被分解物を取り囲む。形成された二重膜がオートファゴソームであり、最終的にリソソームと融合して、リソソーム内の分解酵素によって被分解物が分解される。この過程に関わる分子群は複合体形成能や遺伝学的な解析から、ULK 複合体、PI3K 複合体、Atg9、Atg2-WIPI 複合体、Atg12-5-16L1 結合系、LC3-PE (phosphatidylethanolamine) 結合系に分けられる。このうち、ユビキチン様の 2 つの結合形に関わる因子群については、酵母の因子とともに、ヒトの因子についても構造解析と機能解析が進められ、よく理解が進んでいる。しかし、それ以外の Atg タンパク質群については実際にそれらがどのように機能してオートファゴソーム形成に関わっているのか未解明な部分が多い。また、ヒトなどの高等生物に特有の因子や蛋白質領域も存在することから、出芽酵母とより高等な生物とでオートファジーの進行過程に差異がある可能性が考えられる。

2. 研究の目的

出芽酵母においては Atg1 複合体(Atg1, Atg13, Atg17, Atg29, Atg31) の 5 因子からなるがオートファジーの起点となるが、高等生物においては ULK 複合体がこれに対応する。構成因子は ULK1/2 (Atg1 のホモログ)、Atg13、FIP200(Atg17 の機能類縁体)、Atg101 の 4 因子である。FIP200 と Atg101 は高等生物に特有の因子であり、これらのついての構造機能解析が高等生物のオートファジー始動の理解に必要となる。Atg101 はすでに申請者らによって、全体構造と機能の一端が明らかとなっていたため(Suzuki et al., NSMB 2015)、本研究ではもう一つの固有の因子である FIP200 に的を絞り、構造解析と機能解析を行うことを主目的とした。あわせて、Atg12-5-16L1 結合系の因子である Atg16L1 が出芽酵母には存在しない高等生物に固有の領域を使って FIP200 と相互作用すること、これによって Atg12-5-16L1 結合系の隔離膜へのターゲティングに関与することが示唆されている。Atg16L1 に関して高等生物に特有の機能を有することから、この点に焦点を当てて構造機

能解析を行うことで、そのメカニズムの詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の調製

まず、FIP200 全長体の発現を試みた。ヒト FIP200 は 1594 アミノ酸残基からなる巨大な蛋白質であり、通常用いられる大腸菌では発現が困難であったため、昆虫細胞による発現と精製を試みた。発現確認用に付加した FLAG タグおよび His タグを western blotting により検出すると、全長体相当のバンドとともに分解したサンプルのバンドがラダー状に見られた。分解は主として全長体のほぼ中間で起きていることが推察されたため、FIP200 分子を N 末端側と C 末端側に分け、昆虫細胞および大腸菌による発現コンストラクトの検討を行った。溶解度の向上や精製を簡便に行うため、アフィニティータグとして、GST や MBP を付加しての発現を行った。アフィニティークロマトグラフィーによる粗精製ののち、イオン交換クロマトグラフィー、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。

Atg16L1 についても同様に、大腸菌および昆虫細胞により発現の確認から各種クロマトグラフィーによる精製までを行った。

(2) 調製サンプルの性状解析と結晶化スクリーニング

ゲル濾過クロマトグラフィーにて単一のピークとして得られたサンプルは CD スペクトル、動的光散乱法により、結晶化妥当性を評価した上で、結晶化スクリーニングを行った。結晶化のスクリーニングは sitting-drop 蒸気拡散法により 20°C で行った。結晶化剤として市販のスクリーニングキットを用いた。

4. 研究成果

N 末端側の領域はおよそ 630 残基が安定な領域として調製可能であることがわかった。一方、C 末端側はおよそ 760 残基(アミノ酸残基 834-1594)を比較的良好なサンプルとして調製可能であったが、一部切断を受ける領域があった。この結果と二次構造予測とを併せて、さらに断片化してサンプル調製した。調製したサンプルをゲル濾過クロマトグラフィーと動的光散乱法に評価すると、いずれのサンプルも計算分子量よりもはるかに大きな値を示し、多量体を形成しているか、細かい構造をとることが予想された。

断片化した約 120 アミノ酸残基からなる領域のサンプルから結晶が得られた。放射光 X 線にて X 線回折強度データ収集を行ったところ、分解能 2.1 Å でのデータ収集に成功した。しかし、異常分散法による位相決定のためのセレンメチオニンを導入したサンプルからの結晶化や、重原子同型置換法による位相決定のための同一サンプルからの結晶化を行ったものの、結晶を得ることはできな

った。そこで、再現よく結晶を得ることと位相決定を目的として、当該領域のC末端側にT4Lysozymeを融合してサンプルを調製し結晶化を行い、X線回折強度データ収集が可能な結晶を得た。放射光X線を利用して、分解能3.2 Åのデータを収集し、T4Lysozymeの構造をサーチモデルに分子置換法を適用して構造を決定した(図1)。さらに、この構造をモデルとして前述の高分解能データに対して分子置換法を適用して、高分解能構造を決定した(図2)。

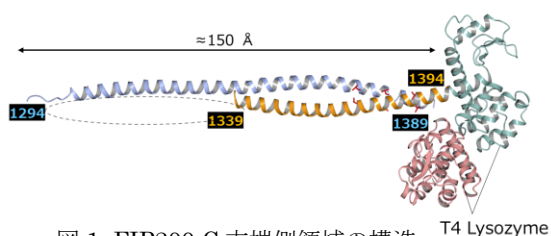


図1. FIP200 C末端側領域の構造 (T4Lysozyme 融合)



図2. FIP200 C末端側領域の構造

決定した構造は約100アミノ酸残基が1本の α ヘリックスを形成し、これがダイマーを形成していた。FIP200部分の長さはおよそ150 Åであった。ただし、当該領域のうちN末端側は揺らいだ構造をとっていたため、明瞭な電子密度として解釈できず、モデルには組み込んでいない(図1, 2中の破線部分)。それぞれプロトマーから3つのLeu残基がダイマー界面へと露出しロイシンジッパー構造をとることで安定なダイマーを形成していると考えられる。動的光散乱から計算される粒子径は、分子量から推定される値よりもはるかに大きく、細長い棒状の構造をしていることを想定していたが、それが事実であることが明らかとなった。FIP200に関しては、調製可能ないずれのサンプルも同様の傾向を示しており、分子全体として細長い平行なダイマー構造を有していることが示唆される。

Atg16L1については、高等生物に固有な領域であるC末端側のWD40リピートドメインの発現、精製系を確立し、結晶化スクリーニングを試行していたが、室温で沈殿しやすい等の問題があり、良質な結晶を得ることはできなかった。その過程で競合グループよりヒトAtg16L1のWD40リピートドメインの構造が報告された(Bajagic et al., *Protein Sci.*, 2017)。当該論文においては、Surface entropy reduction変異の導入と、マウス由来の配列を一部導入したキメラ体を調製することで良質な結晶を得ていた。

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 4件)

- 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. (2018) *J. Mol. Biol.*, 査読有, **430**, 249–257, DOI: 10.1016/j.jmb.2017.12.002.
- ② Suzuki, H., & Noda, N. N. Biophysical characterization of Atg11, a scaffold protein essential for selective autophagy in yeast. (2018) *FEBS Open Bio.*, 査読有, **8**, 110–116, DOI: 10.1002/2211-5463.12355.
- ③ Suzuki, H., Osawa, T., Fujioka, Y. & Noda, N. N. Structural biology of the core autophagy machinery. (2016) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 査読有, **43**, 10–17, DOI: 10.1016/j.sbi.2016.09.010.
- ④ Yamamoto, H., Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Ando, T., Noda, N. N., & Ohsumi, Y. The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes. (2016) *Dev. Cell* 査読有, **38**, 86–99, DOI: 10.1016/j.devcel.2016.06.015.

[学会発表] (計 1件)

Hironori Suzuki, Takeshi Kaizuka, Noboru Mizushima, & Nobuo N. Noda. Structure of Atg101 in complex with Atg13: Functional insights into mammalian autophagy initiation. 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, シヤトラーゼガトーキングダムサッポロ (北海道札幌市)

〔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

鈴木 浩典 (SUZUKI, Hironori)
公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員
研究者番号：20625694