

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06097

研究課題名（和文）オートファジー関連因子Atg9の構造生物学的研究

研究課題名（英文）Structural biology studies of autophagy-related 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・研究員

研究者番号：60613792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：オートファジーが機能するために必須の因子の中で唯一の複数回貫通膜タンパク質 Atg9はこれまでその機能は不明であった。

本研究期間中に精製したAtg9が試験管内で脂質スクランブル活性があることを示した。次に、クライオ顕微鏡を用いて単粒子解析を行い構造を決定した（分解能3.0 Å）。構造を基に変異体を作製し、脂質スクランブル活性が低下する変異体を見出した。これらの変異体は酵母で隔離膜形成ができずオートファジーが正常に機能しないことがわかった。このことからAtg9の脂質スクランブル活性がオートファジーの正常な進行に必要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーが機能する上で必須のタンパク質であるAtg9の機能と立体構造を明らかにし、オートファジーの特徴である隔離膜がどのように伸びるのか、膜伸展モデルを提唱することができた。これらの作動原理は学術的にインパクトがあるだけでなく、Atg9の構造をもとにしたオートファジー制御剤の開発に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：During this study, we showed that the recombinant Atg9 had lipid scrambling activity in vitro. Atg9 structure was then determined by single particle analysis using cryo-EM (3.0 Å resolution). Based on the structure, mutants were prepared, and mutants with reduced lipid scrambling activity were found. These mutants were not able to elongate isolation membranes in yeast. This suggests that the lipid scrambling activity of Atg9 is necessary for the normal progression of autophagy.

研究分野：構造生物学

キーワード：オートファジー クライオ電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで我々のグループはオートファジー関連タンパク質の結晶構造解析を行ってきた。これらのうち膜貫通型タンパク質は Atg9 のみが同定されている。特異な膜動態で分解対象を包み込むオートファジーにおいて、機能未知な Atg9 の構造を知ることが重要な知見である。オートファゴソーム形成に関わる Atg9 に関して構造情報は報告されておらず、どのような機能を有しているのかも不明であった(Hurley et al., Cell 2014)。Atg9 はオートファゴソーム形成に必須でありゴルジ体から出芽する 30-60 nm の膜小胞 (Atg9 小胞)として細胞質に局在する。そのアミノ酸配列から 6 回膜貫通型の膜タンパク質であること、天然変性領域を N、C 末端に含むことが予測されている。オートファジーが誘導されると細胞質内の Atg9 小胞の一部が PAS (pre-autophagosomal structure)に集まるが、その集積機構や分子機能は不明である。オートファジー進行初期、隔離膜新生の“場”となる PAS において、Atg9 がどのような因子と結合し機能しているかは不明な点が多いが、3 つの Atg9 小胞が集まることで十分に機能することから (Yamamoto et al., J Cell Biol. 2012)、隔離膜の供給源としてだけではなく、Atg9 が持つ何らかの機能がオートファゴソーム形成に重要であると考えていた。また、隔離膜伸張時には Atg9 は Atg2-Atg18 複合体と隔離膜先端に共局在することが報告されているが、これについても詳細な機能は不明であった。

申請当時、日本での、タンパク質の構造解析は過渡期にあり X 線結晶構造解析に加えて、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法が新たに加わった頃で、まだ一般の研究者が使えるような測定装置は整備されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は Atg9 の構造解析を通じて、Atg9 の機能を明らかにするものである。これまで欠けていた Atg9 に関する構造・機能が明らかになることで、分子レベルで隔離膜形成を理解することができるため学術的意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) 当初の計画では X 線結晶構造解析, 単粒子解析を目指したクライオ電子顕微鏡を予定していた。そのため、結晶化のために構造認識抗体を作製した。様々なコンストラクトを作製し結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。そのため結晶化による構造解析を諦め、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を試みた。

(2) リコンビナント Atg9 を用いてプロテオリポソームを調製し、脂質スクランブル活性を以下の 2 通りの測定方法で確認した。(a) 蛍光脂質 (NBD-PE) を用いた系では、還元剤で蛍光脂質を還元することで外葉の蛍光脂質を消光し、非対称リポソームを調製した。(b) PI3P (ホスファチジルイノシトール 3 リン酸) を検出する系では、ホスファチジルイノシトールを含むリポソームを PI3 キナーゼ処理することで、PI3P を外側の層に持つ非対称リポソームを調製した。これらのリポソーム上の脂質分布を蛍光測定あるいは急速凍結活断レプリカ標識により検出した。

(3) 活性を失った変異体の作出。立体構造を基に変異体を作製し、方法(2b)により、脂質スクランブル活性を測定した。

(4) (3)により作製した変異体 Atg9 を用いて、酵母内での Atg9 の局在やオートファゴソーム、隔離膜の観察を行った。

4 . 研究成果

研究期間中に、機能がこれまで分かっていなかった膜タンパク質 Atg9 が、脂質スクランブル活性を持つことを試験管内の実験で明らかにしました。さらに Atg9 の立体構造をクライオ電子顕微鏡で調べた結果、Atg9 は4回膜貫通型膜タンパク質であり、脂質二重層の2つの層をつなぐ細孔を持つことが分かりました。また、細孔を形成するアミノ酸に変異を入れたところ試験管内での Atg9 の脂質スクランブル活性が失われ、同じ変異により酵母におけるオートファゴソームの形成も阻害されることを見いだしました。これらのことから、Atg9 は新規脂質スクランブラーゼであり、脂質輸送タンパク質 Atg2 と協力してオートファゴソームの形成に働くという全く新しい仕組みを明らかにしました。これはオートファジー分野のみならず、細胞生物学全般において初めて明らかとなった現象であり、細胞生物学の基礎研究に貢献する成果です。この研究によりオートファジー膜形成過程の分子機構の全容解明が加速されることが期待されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matoba Kazuaki, Noda Nobuo N	4. 巻 0
2. 論文標題 Structural catalog of core Atg proteins opens new era of autophagy research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matoba Kazuaki, Noda Nobuo N.	4. 巻 27
2. 論文標題 Secret of Atg9: lipid scramblase activity drives de novo autophagosome biogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 3386 ~ 3388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41418-020-00663-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matoba Kazuaki, Kotani Tetsuya, Tsutsumi Akihisa, Tsuji Takuma, Mori Takaharu, Noshiro Daisuke, Sugita Yuji, Nomura Norimichi, Iwata So, Ohsumi Yoshinori, Fujimoto Toyoshi, Nakatogawa Hitoshi, Kikkawa Masahide, Noda Nobuo N.	4. 巻 27
2. 論文標題 Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-020-00518-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mochida Keisuke, Yamasaki Akinori, Matoba Kazuaki, Kirisako Hiromi, Noda Nobuo N., Nakatogawa Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Super-assembly of ER-phagy receptor Atg40 induces local ER remodeling at contacts with forming autophagosomal membranes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17163-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所
<https://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------