

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440052

研究課題名(和文) ユビキチン様タンパク質Atg8の新規結合様式とその生物学的意義

研究課題名(英文) Novel conjugation of the ubiquitin-like protein Atg8 and its biological significance

研究代表者

岡本 徳子 (OKAMOTO, Noriko)

大阪大学・生命機能研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：90568750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Atg8はリン脂質に共有結合する、オートファジーに必須なユビキチン様タンパク質である。出芽酵母を用いた本研究により、選択的ミトコンドリア分解が誘導される条件下で、Atg8が複数のタンパク質に共有結合することが明らかとなった。また、Atg8化の基質分子として、小胞体膜タンパク質Asu1 (Atg8ylation substrate 1)を同定した。Atg8化は、オートファジー依存的なAsu1の分解に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Atg8 is a phospholipid-conjugated ubiquitin-like protein essential for autophagy. Using budding yeast, this study demonstrated that Atg8 is also conjugated to several proteins under selective mitochondrial degradation-inducing conditions. In addition, Asu1 (Atg8ylation substrate 1), an endoplasmic reticulum membrane protein, has been identified as a substrate for Atg8 conjugation. It is possible that Atg8ylation contributes to autophagy-dependent degradation of Asu1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Atg8 ユビキチン様タンパク質 オートファジー 翻訳後修飾 タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾は、タンパク質分解のみならず、細胞分裂・DNA修復・転写制御・免疫応答・膜輸送などを含む様々なプロセスに関与している。これは、ユビキチンの多彩な修飾様式に加え、ユビキチンによく似た構造(ユビキチンフォールド)をもつ分子が16種類も存在し、機能していることによる。ユビキチン様タンパク質と呼ばれるこれらの分子の中で、Atg8とAtg12はオートファジーに必須な役割を果たしている(図1)。進化的に保存されたこれら2つのAtgタンパク質は、隔離膜と呼ばれる2重膜の構造に働き、分解基質を包み込むためのオートファゴソームの形成を媒介する。Atg8はリン脂質PEに共有結合し、隔離膜やオートファゴソームに局在して機能する、ユニークなユビキチン様タンパク質である。長らくの間、Atg8およびAtg12の結合基質は、各々PEおよびAtg5だけが知られていた。最近、Atg12がAtg3(Atg8結合反応系のE2酵素)にも共有結合し、ミトコンドリアの恒常性や細胞死に関与することが報告されたが、その機構はよくわかっていない。

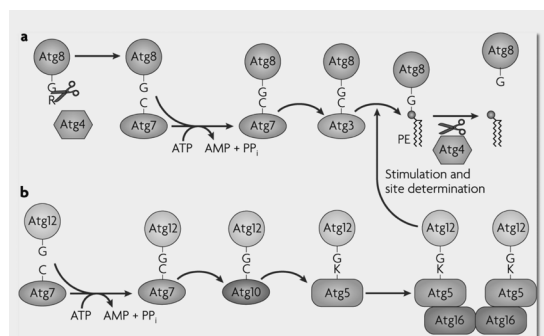


図1. オートファジーに必須な2つのユビキチン様タンパク質結合系。(a) Atg8結合反応系。Atg4, システインプロテアーゼ; Atg7, E1酵素; Atg3, E2酵素。(b) Atg12結合反応系。Atg7, E1酵素; Atg10, E2酵素; Atg5, Atg12結合反応の標的タンパク質。Atg16, Atg12-5のオートファゴソーム形成場への局在を媒介。

「膜形成の実働因子」としての機能に加え、Atg8はオートファゴソームの積み荷の認識にも直接働き、積み荷の特異的な分解に寄与している。この選択的なオートファジーの重要性が最近注目を集めており、研究が劇的に進展しつつある。申請者は、出芽酵母の選択的ミトコンドリア分解(マイトファジー)に必須なタンパク質Atg32を世界で初めて同定し、その分子機能の一端を解明した。Atg32はミトコンドリア外膜に局在し、Atg8およびAtg11をミトコンドリア表面にリクルートする。Atg11は、オートファゴソーム形成に必要な他のAtgタンパク質を分子集合させるための「足場」として働く。これら3つのAtgタンパク質間相互作用は、マイトファジーに重要である。

これまでに、Atg8が特定のin vitro条件下でリン脂質フォスファチジルセリンに共有結合することが知られている。また申請者の

研究グループでは最近、Atg8の新たな結合基質として、リン脂質フォスファチジルモノメチルエタノールアミンを見出している。加えて、マラリア原虫のアピコプラスト(退化した2次共生色素体)にAtg8が局在し、オートファジー以外の未知の機能を果たしている可能性も報告されている。しかし、Atg8が他のタンパク質に共有結合しているという報告はない。Atg8は酵母からヒトまで保存されたタンパク質であり、哺乳類では7種のホモログが存在するなど、生命現象に普遍的かつ多彩な役割を果たしていると考えられるが、その多くは今なお謎のベールに包まれている。

2. 研究の目的

申請者の研究グループは最近、マイトファジーが誘導される条件下で、Atg8抗体に陽性を示す50-150 kDaの高分子量バンドが複数出現することを偶然見出した。これらのシグナルは、様々な変性条件下でも検出されることから、タンパク質分子間での共有結合が想定される。この現象は、富栄養条件下や非選択的オートファジーが誘導される窒素源飢餓状態では見られない。

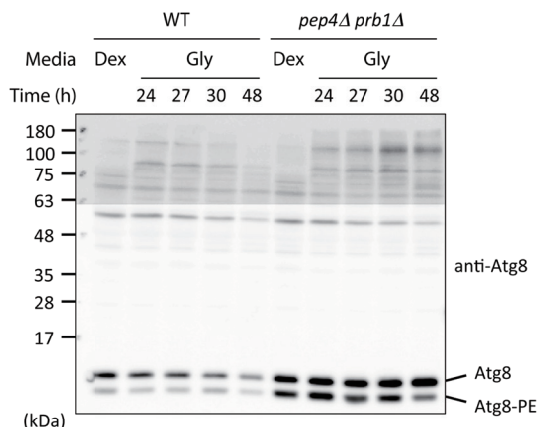


図2. 高分子量Atg8陽性タンパク質の出現。野生型(WT)および液胞内分解酵素欠損変異(*pep4Δ prb1Δ*)細胞を富栄養(Dex)からマイトファジー誘導条件(Gly)にシフトし、サンプリングしてウェスタン解析した。

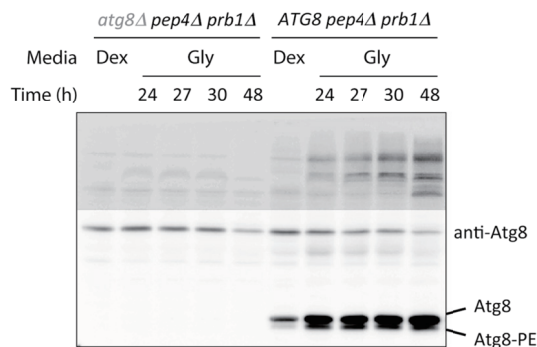


図3. 高分子量Atg8陽性タンパク質の出現。液胞内分解酵素欠損(ATG8 *pep4Δ prb1Δ*)およびそのAtg8欠損(*atg8Δ pep4Δ prb1Δ*)細胞をサンプリングしてウェスタン解析した。

これらの Atg8 陽性因子は、液胞（酵母のリソソーム）の分解酵素を欠損させた細胞でより多く蓄積する（図 2, 3）。このことは、Atg8 がポリマー化するか、あるいは未知のタンパク質に共有結合し、それらが液胞に運ばれる可能性を提起している。

本研究では、Atg8 の新規結合様式の実態を分子レベルで明らかにし、その仕組みと生理機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 平成 26 年度においては、マイトファジーが誘導される条件下において、高分子量領域に現れる Atg8 結合タンパク質群の精製・同定を試みた。
- (2) 平成 27 年度においては、前年度に得られた候補因子の変異解析（アミノ酸置換および部分的欠失）を行い、Atg8 結合に対する影響を解析した。
- (3) 平成 28 年度においては、上記タンパク質の Atg8 結合部位の同定に必要な Atg8 変異体を作成し、その機能を調べるとともに、Atg8-Atg8 結合タンパク質の精製・質量分析を行った。

4. 研究成果

- (1) 精製用タグを付加した His-FLAG-Atg8 を酵母細胞で発現させ、マイトファジー誘導条件下で培養した後、集菌して細胞抽出液を調製した。これを Ni-NTA アガロースビーズと FLAG 抗体結合アガロースビーズを用いた 2 段階アフィニティー精製に供し、溶出したサンプルを SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離、タンパク質を銀染色で可視化してバンドを切り出し、質量分析器 LC-MS/MS で解析した。その結果、高分子量域の複数のバンドに特異的に Atg8 自身も含まれ、切り出したバンドの分子量より小さいタンパク質であるにも関わらず、複数の高分子量バンドとして繰り返し出現するタンパク質、Asu1 (Atg8tylation substrate 1)、Asu2、酢酸耐性獲得に機能するとされている膜タンパク質 Yro2 を同定した。次に、これらのタンパク質に HA タグを付加し、HA 抗体結合アガロースビーズを用いて免疫共沈降アッセイを行った。その結果、いずれの場合においても、Atg8 陽性のシグナルが高分子領域で検出されたことから、これらのタンパク質は Atg8 化修飾を受けていることが示唆された。
- (2) 部位特異的変異導入法を用いて Asu1 に様々なアミノ酸置換を導入するとともに、

部分的欠失を行い、Atg8ylation に対する影響を解析した。その結果、ユビキチン様タンパク質の一般的な結合部位であるリジンのアルギニン置換変異体では、Asu1 の Atg8 化はほぼ正常に起こることがわかった。すなわち、Atg8 の結合部位は別のアミノ酸、例えばユビキチン化を受けうるセリンやシステイン、メチオニンなどの可能性も考えられる。一方、Asu1 の C 末近傍には、Atg8 との相互作用に働く 4 アミノ酸の保存されたモチーフ AIM (Atg8-interacting motif) があり、これを欠失させたり点変異を加えると、Asu1 の Atg8 化が顕著に抑制されることが明らかとなった。この結果は、Atg8 化が起こるには、Asu1 は AIM を介して Atg8 と相互作用（共有結合ではない）する必要があることを示している。Asu1 は小胞体に局在する膜タンパク質であり、オートファジーに依存して液胞に運ばれる。AIM 変異により、Asu1 の液胞への移行が損なわれることもわかった。これらの知見は、Atg8 化がオートファジーを介した Asu1 の分解に寄与している可能性を提起している。

- (3) Asu1-Atg8 を質量分析する際、トリプシン処理で生じる Atg8 の C 末端領域のペプチドは長過ぎる。そこで、C 末端から 4 番目の N113 をアルギニン置換した N113R 変異体を作成した。アフィニティー精製用の His-FLAG-Atg8(N113R) 変異体のオートファジー活性を調べたところ、野生型と同様にオートファジーを駆動すること、PE 化も正常に起こることを確認した。加えて、Asu1 への共有結合活性を調べたところ、Asu1-Atg8(N113R) を検出することができた。そこで、この変異体を用いてアフィニティー精製・質量分析による Asu1 の Atg8 化部位の同定を試みた。その結果、Asu1-Atg8(N113R) の分子数が質量分析に必要な量に満たなかったため、Atg8 化部位を同定することができなかった。この問題を解決するには、タンパク質の過剰発現系の確立が必要であると考えられる。

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 1 件）

- ① Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M, Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, Nakatogawa H, Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, Okamoto K. (2015) Phospholipid methylation

controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J.*, 34, 2703-2719.
(査読有り)
DOI: 10.15252/emj.201591440

[学会発表] (計 1 件)

- ① 岡本徳子. Novel aspects of autophagy-related proteins under mitophagy-inducing conditions. 第66回 日本細胞生物学会大会. 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市). 2014年6月11日. (招待講演)

[図書] (計 1 件)

- ① 田中敦、岡本徳子、風間智彦. 実験医学 Close Up 実験法 Vol.32 No.14 (9月号) 2014年. pp.2283-2291.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/34/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 徳子 (OKAMOTO, Noriko)
大阪大学・生命機能研究科・特任講師
(常勤)
研究者番号：90568750

(2) 連携研究者

岡本 浩二 (OKAMOTO, Koji)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号：40455217