

研究課題別評価書

1. 研究課題名

オートファジーにおける脂質膜組織化機構の解明

2. 氏名

中戸川 仁

3. 研究のねらい

細胞は、飢餓状態に陥るとオートファジーを誘導する(図1)。小さな扁平状の膜が細胞質に現れ、これが袋状に伸展して細胞質の一部やオルガネラを包み込み、最終的に閉じて直径 $0.5\text{--}1\ \mu\text{m}$ 程のオートファゴソームと呼ばれる膜胞が形成される。オートファゴソームが種々の加水分解酵素を含むリソソームや液胞と融合することで、オートファゴソームの中身が消化される。その分解産物を再利用して、細胞は飢えを凌ぐことができる。こうした飢餓応答だけでなく、発生や分化、抗原提示等、多彩な生理機能にもオートファジーが関与することが明らかになってきた。また、オートファジーは、細胞内に侵入した細菌や、神経変性疾患等の原因となる異常タンパク質の除去にも重要な役割を果たすことから、こうした病気との関連でも注目を集めている。

私たちは、出芽酵母をモデル生物として、オートファゴソームの形成機構に関する研究を進めてきた。オートファゴソームの形成に必須の因子として、Atg と名付けられた特異な因子群が同定され、その詳細な解析が進んでいるが、オートファゴソームの膜が何に由来し、どのようにして形成されるのか、そのメカニズムは未だ謎に包まれている。本研究では、Atg8 というユビキチン様タンパク質に注目し、オートファゴソーム形成機構の全容解明に向けて突破口を開くことを目的とした。

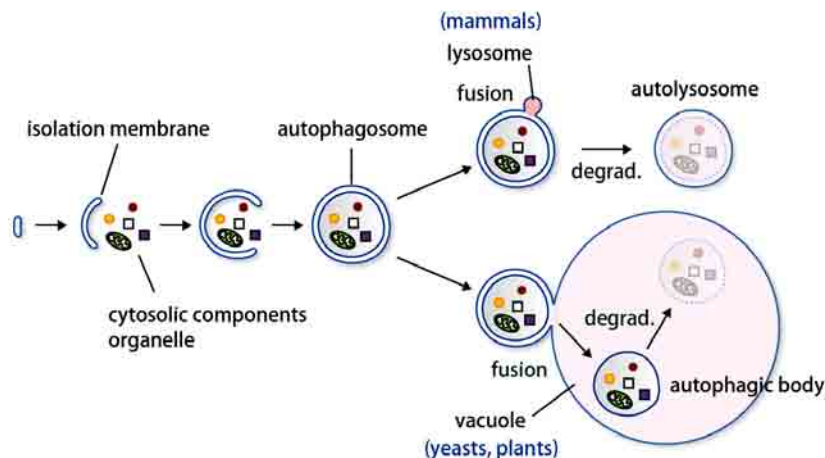


図1 オートファジーの進行過程

4. 研究成果

I. Atg8-PE の機能の解明

Atg8 は、オートファゴソームの形成に必要なユビキチン様タンパク質であるが、ユビキチンや他のユビキチン様タンパク質とは異なり、標的タンパク質のリジン残基ではなく、脂質分子ホスファチジルエタノールアミン(PE)の親水性頭部のアミノ基に結合するというユニークな特徴を持っている(図2)。Atg8 は、おそらくは PE との結合体(以下、Atg8-PE と記す)として伸張中のオートファゴソームの膜に局在することから、Atg8-PE の機能の解明は、膜形成のメカニズムの理解に直結すると考えられてきた。Atg8 と PE との結合反応は、Atg8 および、E1 酵素 Atg7、E2 酵素 Atg3 それぞれの精製タンパク質を、PE を含む人工膜小胞、ATP と共にインキュベーションすることで、in vitro

で再構成できる。この反応液を光学顕微鏡で観察したところ、Atg8 が人工膜小胞上の PE と結合体を形成するにしがたい、人工膜小胞が巨大な凝集体を形成することが明らかとなった。電子顕微鏡解析および、生化学的アッセイ系を用いて調べたところ、人工膜小胞は、結合し合う(図3, 左上パネル矢頭)だけでなく、ヘミフュージョン(向かい合う二枚の膜(脂質二重層)において近接した層(外層)同士のみが融合すること)と呼ばれる特異な融合反応を起こしていることが示された(図3, 左上パネル矢印および下図)。免疫電子顕微鏡解析の結果、Atg8-PE が人工膜小胞同士の接合面に濃縮された様子を捉えることができた(図3, 右上パネル)。さらに、化学的架橋試薬を用いた実験から、Atg8 は PE との結合に伴い、多量体を形成することが示唆された。以上の結果から、Atg8 には、PE と結合すると多量体を形成し、自身がアンカーされた脂質膜を繋ぎ合わせ、ヘミフュージョンさせる機能があることを提唱した。

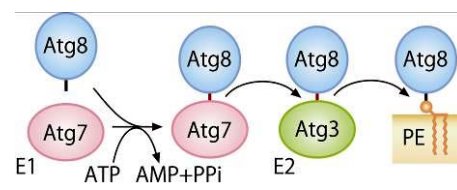


図2 Atg8 と PE の結合反応

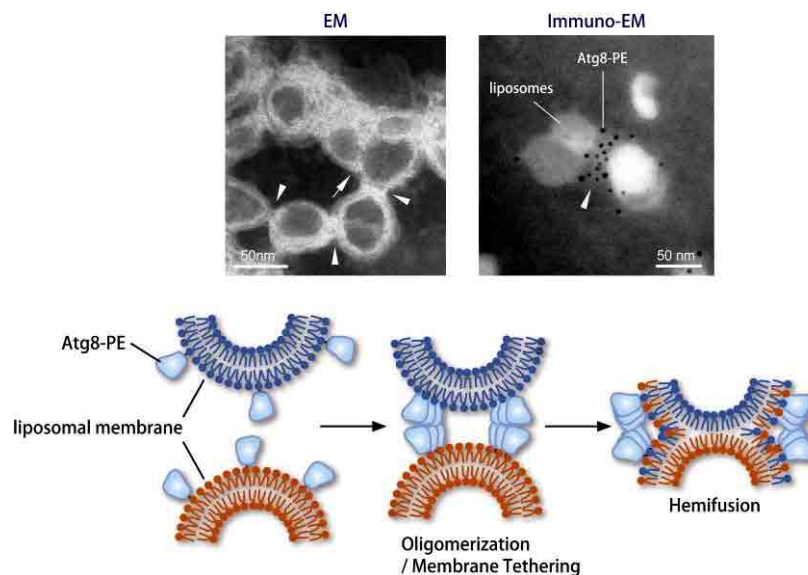


図3 Atg8 による人工膜小胞の繋ぎ合わせとヘミフュージョン

II. Atg8 の機能とオートファゴソーム形成との関連

In vitro の反応系で明らかとなった Atg8 の機能と、細胞内でのオートファゴソーム形成との関連を調べるために、立体構造情報をもとにした系統的分岐解析をおこない、オートファジーに欠損を示す Atg8 の変異体を複数分離した。変異型タンパク質を精製し、調べたところ、その多くが、PE との結合体は形成するが、膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンに欠損を示すことが明らかとなった。さらに、電子顕微鏡解析により、Atg8 の機能が著しく低下した変異体を発現する酵母細胞では、オートファゴソームが形成されないことが明らかとなった(図4, F104A+Y106A 変異株の液胞(V)には野生株(WT)の液胞中に見られるオートファジックボディ(図1を参照)が見られない)。すなわち、

Atg8 による膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンは、オートファゴソームの形成に重要であることが示唆された。さらに、Atg8 の機能が部分的に低下した細胞では、野生株に比べ顕著に小さなオート

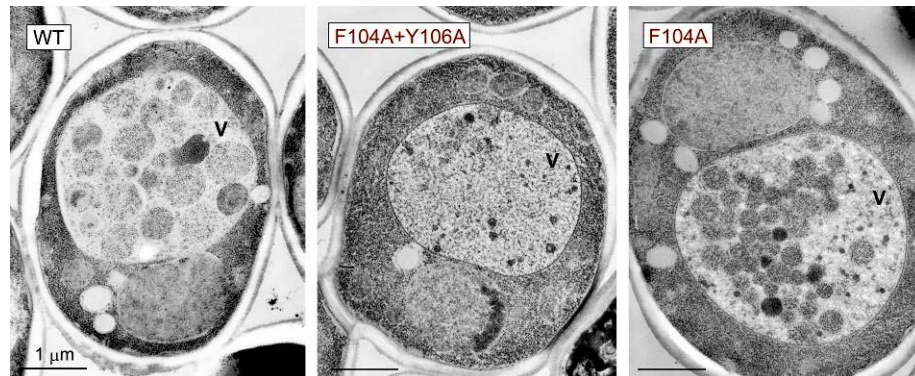


図4 Atg8 の機能が欠損した酵母細胞の電子顕微鏡像

ファゴソームが形成されることが示された(図4, F104A 変異株)。Atg8 による膜の繋ぎ合わせとヘ

ミフュージョンは、特にオートファゴソームの膜の伸張過程に重要であることが示唆された。

以上の成果は、これまで全く未知であったオートファゴソームの形成メカニズムに、膜動態と直接関連する Atg タンパク質の機能の発見とその重要性を示すことで、初めて具体的に切り込んだ研究として高い評価を得た。また、本成果は、以下に記すような、数々の新たな疑問を具体的に提起するものであり、オートファゴソーム形成のメカニズムの全容解明に向けての起爆剤となると期待される。

III. 脂質修飾サイクルによる Atg8 の機能制御機構

上述のように、Atg8 が持つ膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョン活性は、PE との結合により誘起される。本研究では、Atg8 から PE を切り離す活性を持つシステインプロテアーゼである Atg4 のリコンビナントタンパク質を精製し、この Atg8-PE の脱結合反応を再構成することにも成功した。これにより、Atg8 が脱 PE 化されると、Atg8 の多量体が解離し、人工膜小胞の凝集も速やかに解消されることが明らかとなった。すなわち、Atg8 の機能は脂質修飾サイクルによって可逆的に制御されるものであることが示唆された。また、変異解析により明らかとなった膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンに重要なアミノ酸残基(これらは Atg8 の PE 化に伴う多量体化にも重要である)を Atg8 の立体構造上にマッピングした結果、同機能に重要な分子表面領域を特定することができた。この領域は、PE と結合していない Atg8 の立体構造において、Atg8 自身の N 末端領域で覆い隠されているが、この N 末端領域は PE との結合に伴って開くような構造変化を引き起こすことが以前の研究で示唆されている。これらに基づき、Atg8 は PE と結合すると N 末端領域に構造変化を起こし、上記の分子表面領域を露出させ、多量体を形成して膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンを誘起する、とのモデルを提唱した。

IV. 選択的オートファジーにおける Atg8 の役割

上述の系統的変異解析は、選択的オートファジーにおける Atg8 の機能に関する研究にも発展した。飢餓で誘導されるオートファジーでは、細胞質成分がランダムにオートファゴソームに取り込まれるのに対し、特定の「積み荷」が識別されて選択的にオートファゴソームに取り込まれる場合もあり、このようなケースは「選択的オートファジー」と呼ばれ近年特に注目を集めている。積み荷は、特定の酵素や、ミトコンドリア、ペルオキシソーム等のオルガネラ、ユビキチン陽性のタンパク質凝集塊、細胞侵入性細菌等、多岐にわたり、それぞれに結合する特異的な「受容体タンパク質」が存在する。受容体タンパク質のいくつかは、さらに Atg8 と相互作用することが知られており、おそらくは伸張中のオートファゴソーム膜上の Atg8-PE と結合することで、積み荷を効率良くオートファゴソームに取り込ませると考えられている。本研究における Atg8 の変異解析の過程で、飢餓誘導性のオートファジーには欠損を示さないが、選択的オートファジーと同等の経路を介した Ape1 という酵素の液胞への輸送に異常を示す変異体を複数同定し、それら変異体には Ape1 の受容体である Atg19 との相互作用に異常があることを明らかにした。変異部位を立体構造上にプロットすると、Atg8 の分子表面の特定の領域に集中し、同領域が Atg19 との相互作用部位であることが示唆された。この予想の通り、北海道大学

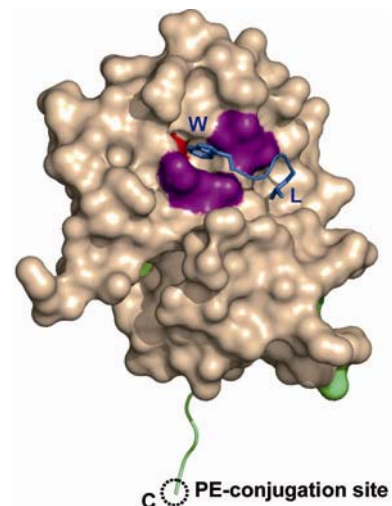


図5 Atg8-Atg19 由来ペプチド複合体の立体構造

稲垣冬彦教授のグループによる Atg8 と Atg19 との複合体の構造解析の結果、Atg19 の C 末端領域にある Trp-X-X-Leu という配列が、上記 Atg8 の分子表面にある疎水性のポケットに深く入り込んで結合していることが示された(図5)。このポケットは、Atg8 のホモログ間で高度に保存されたアミノ酸残基で構成されている。同グループによる Atg8 の哺乳動物ホモログである LC3 とユビキチン化されたタンパク質凝集塊の選択的オートファジーにおいて受容体として機能する p62 との複合体の構造解析の結果、p62 も、Trp-X-X-Leu という配列を使って、Atg8-Atg19 間の相互作用と

酷似した様式で LC3 と結合していることが明らかとなった。またごく最近、酵母におけるミトコンドリアの選択的オートファジーの受容体である Atg32 も同様の相互作用様式で Atg8 と結合することが明らかにされた。このように、選択的オートファジーにおいて、積み荷、生物種を問わないユニバーサルな Atg8-受容体タンパク質間相互作用を明らかにすることができた。

5. 自己評価

本研究の提案書では、次の 5 つの研究項目を掲げた。

- (i) 隔離膜の伸長における Atg8-PE の機能の解明
- (ii) 脂質修飾サイクルによる Atg8 の機能制御機構の解明
- (iii) 隔離膜への脂質供給源と供給様式の解明
- (iv) オートファゴソーム形成における膜融合機構の解析
- (v) 隔離膜の組織化機構の解析

項目(i)と項目(ii)については、ほぼ当初の目標を達成できたと考えている。項目(iii)については、オートファゴソーム膜の前駆体様構造を捉えることができたため、さらなる研究の継続により、近く目標を達成できると考えている。項目(iv)については、当初、SNARE タンパク質のオートファゴソーム形成への関与を系統的に調べることを計画していたが、本研究の過程で Atg8-PE 自身に膜をヘミフュージョンさせる活性を見出し、また、Atg8-PE を含むオートファゴソーム膜の前駆体様構造を検出することができたため、この構造体に含まれるタンパク質を決定することがこの項目の目標の達成に繋がると考え、計画をそのように変更した。項目(v)については、本研究期間内に実質的な成果を得ることはできなかったが、隔離膜に局在する Atg タンパク質の変異解析を開始した。今後も研究を継続していきたいと考えている。

6. 研究総括の見解

In vitro での Atg8-PE 形成反応の顕微鏡解析などから、この反応により膜のつなぎ合せとヘミフュージョンが引き起こされることを発見し、更に同様の反応が in vivo でも起こることを明らかにするなど、オートファゴソーム形成機構の一端を見事に示すことに成功した。更に、選択的オートファジーにおける Atg の役割についても解明が進められている。これらの研究は、極めて独創的なものであり、国内外を問わず、他の追従を許さないものである。これらの研究がヒトを含む高等動物での研究へと発展し、病因解明や治療法開発に発展することも期待できる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, **130**, 165-178, (2007).
2. Oh-oka, K., Nakatogawa, H. and Ohsumi, Y. Physiological pH and acidic phospholipids contribute to substrate specificity in lipidation of Atg8. *J. Biol. Chem.*, **283**, 21847-21852, (2008).
3. Noda, N.N.*, Kumeta, H.*, Nakatogawa, H.*, Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells*, **13**, 1211-1218, (2008). * These authors contributed equally to this work..

②著書

1. 中戸川 仁「オートファジーにおける膜形成のメカニズム ―ユビキチン様タンパク質 Atg8 が統御するユニークな膜動態―」生化学 **79**, 20-23 (2007).
2. 中戸川 仁、大隅 良典「出芽酵母のオートファジー ―分子機構研究の最前線」蛋白質 核酸 酵素 増刊「メンブレントラフィックの奔流」大野 博司, 吉森 保 編 **53**, 2099-2105. (2008).

3. Nakatogawa H, Ohsumi Y. Starved cells eat ribosomes. *Nat. Cell Biol.*, 10, 505–507, (2008).
4. Nakatogawa H, Oh-oka K, Ohsumi Y. Lipidation of Atg8: How is substrate specificity determined without a canonical E3 enzyme? *Autophagy*, 4, 911–913, (2008).
5. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 458–467, (2009).

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Fujioka Y, Noda NN, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F. The dimeric coiled-coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and its functional significance in autophagy. *J. Biol. Chem.*, 285, 1508–1515, (2010).

②招待講演

1. 中戸川 仁, 大隅 良典「オートファゴソーム形成におけるユビキチン様タンパク質Atg8の機能とその脂質修飾による制御」日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO) 第 5 回大会 東京, 2007 年 7 月 30 日
2. Nakatogawa, H. "Membrane dynamics during autophagy: The function of the ubiquitin-like protein Atg8 in autophagosome formation", G-COE International Symposium on Frontier of Organelle Dynamics and Protein Functions, Nagoya, Japan, Mar. 13, 2008.
3. 中戸川 仁, 大隅 良典「Atg8 の解析から探るオートファゴソームの膜の由来」BMB2008 神戸, 2008 年 12 月 12 日
4. Nakatogawa, H. and Ohsumi, Y. "Analyses of Atg8-PE-containing structures involved in autophagosome formation", 5th International Symposium on Autophagy, Ohtsu, Japan, Sep. 25, 2009.