

選択的オートファジーの構造的基盤

微生物化学研究会 微生物化学研究所 分子構造解析部

野田 展生

1. はじめに

オートファジーは出芽酵母から高等動植物まで真核生物において広く保存された大規模な分解システムである。オートファジーが誘導されると、細胞質中に隔離膜と呼ばれる脂質膜構造が出現し、分解対象を取り囲みながら伸長し、閉じてオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体を形成する。その後オートファゴソームの外膜は液胞/リソソームと融合し、内膜ごと内容物は液胞/リソソーム内の加水分解酵素によって分解される(1)。オートファジーは飢餓等に応じて細胞質の一部を無作為に液胞/リソソームに輸送し分解することで、細胞内成分の再構成に関わっている。しかし近年、オートファジーは状況に応じてミトコンドリアやペルオキシソームなどのオルガネラ、タンパク質凝集体、細胞内に侵入した細菌などを特異的に認識し、それらの分解、除去にも関与していることが明らかになった(2)。このような選択的オートファジーは癌、神経変性疾患、感染症など様々な疾病に関与しているが、どのようにオートファジーが選択的分解を行っているのか、その基本的メカニズムに関する知見は乏しい。出芽酵母において現在30種類以上のオートファジー関連 (Atg) タンパク質が同定されている。本研究では選択的オートファジーの基本的メカニズムを明らかにするため、これらAtgタンパク質のうち、認識に関与するAtg19およびAtg34、そしてこれらの選択的積荷に焦点を当て、構造機能解析を行なった。

選択的オートファジーにおいて積荷が液胞/リソソームへ輸送されるには積荷を認識する受容体タンパク質が重要な役割を担っている(3)。出芽酵母では、液胞酵素である α -mannosidase (Ams1), aminopeptidase I (Ape1) は選択的オートファジーによって液胞へ輸送されることが知られており、これら二つの積荷の液胞への輸送には受容体タンパク質Atg19, Atg34が関与している(4,5)。細胞質中でAtg19はAms1, Ape1を、Atg34はAms1を直接認識し、その後、Atg19, Atg34は隔離膜上に局在しているAtg8と結合することでAms1, Ape1の選択的囲い込みを実現している。これまでの研究で、我々はAtg19, Atg34のC末端に存在するAms1結合ドメイン (ABD) を同定し、両者の立体構造をNMR法により決定してきた(6)。両者はよく似たimmunoglobulin-foldを形成しており、保存されたループ領域上のHis残基 (Atg19 H310, Atg34 H296)がAms1の認識に必須であることを明らかにした(6)。本研究では選択的積荷であるAms1の立体構造の特徴を明らかにし、続いて受容体Atg34によるAms1の認識の詳細を明らかにした。

2. 方法

全長のAms1 (1083残基)はメタノール資化酵母*Pichia pastoris*の系を用いてヘキサヒスチジンタグ融合蛋白質として発現し、精製を行った(7)。Atg34 ABDはグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質として大腸菌で発現させ、精製を行った。精製過程でヘキサヒスチジンタグおよびGSTはプロテアーゼを用いて切除した。結晶化はすべてシッティングドロップ蒸気拡散法により20°Cで行った。Ams1結晶の位相決定はプラチナ誘導体結晶を用いた多波長異常分散(MAD)法により行った。Ams1-Atg34 ABD複合体結晶の構造解析は分子置換法により行った。

3. 結果

3-1. Ams1の結晶構造

Ams1全長の結晶構造を2.3 Å分解能で決定した。Ams1は一次配列上、糖質加水分解酵素ファミリー38 (GH38) に属しており、Ams1の一分子の構造は既知のGH38の構造とよく似ていたが、N末端領域に他のGH38には保存されていないドメインが存在していた。Ams1の全体構造は222対称を持った四量体を形成しており、Ams1の四量体の形成にはこのN末端ドメインが主に寄与していた。

3-2. Ams1-Atg34 ABD複合体の結晶構造

Ams1-Atg34 ABD複合体の結晶構造を3.0 Å分解能で決定した。Ams1一分子につきAtg34 ABD一分子、すなわちAms1四量体に対してAtg34 ABDが四分子結合していた。その結果、Atg34 ABDはAms1の四量体構造上に分散して存在した。Atg34 ABDは自身の免疫グロブリンフォールドの側面を用いて

Atg34に結合していた。そして主要な相互作用は免疫グロブリンフォールドの β シート構造の両側に存在するループを介して行われていた。Atg34のAms1との結合に直接関与しているアミノ酸残基 (E257, D258, H296, W307, F309)をAlaに置換し、Ams1とのin vitro pull-down assayを行なった。その結果、これらのアミノ酸残基はAms1との結合に関与しており、溶液中でも結晶構造で見られる結合様式で結合していることを示した。Atg19においても同様の実験を行なったところ、概ねAtg34の場合と似た結果が得られた。以上の結果から、Atg19 ABD, Atg34 ABDは自身の免疫グロブリンフォールドの側面方向から、両側のループを用いてAms1を認識することを示した。

3-3. in vivo機能解析

ABDのAms1認識に関与しているアミノ酸残基が実際にオートファジーによるAms1の液胞輸送にも関与しているのか検証するため、atg19, atg34遺伝子二重破壊株にAms1-GFP及びAms1との結合能を欠いた変異体Atg19F323AまたはAtg34F309Aを発現させ、オートファジーによるAms1-GFPの液胞輸送能を調べた。正常にAms1-GFPが液胞へ輸送された場合は液胞酵素によりGFPが切り出され、遊離したGFPが検出される。Atg19F323AまたはAtg34F309Aを発現させた場合、遊離したGFPが検出されなかった。また、Atg19の変異によるApe1の液胞輸送への影響は無かった。以上の結果から、Ams1の認識に必要なAtg19, Atg34のPhe残基は実際にAms1のオートファジーによる液胞輸送に関与していることを示した。

4. 考察

選択的積荷であるAms1は、高度に対称性を持ったホモ四量体構造を持っていた。他のGH38ファミリーの蛋白質群はこれまで単量体のものと二量体のもののみ報告されている。Ams1は他のメンバーには保存されていない固有の領域を持つことで、四量体形成能を獲得したと考えられる。また、GH38ファミリーのうち、オートファジーにより選択的に輸送されるものはAms1しか報告されていない。このことは、Ams1のみが四量体構造を持つことと関係があるように思われる。オートファゴソームにより効率的に囲い込まれるためには、ある程度の会合状態が必要である可能性が示唆される。Ams1-Atg34 ABD複合体の結晶構造から、Ams1は複数個所であつ多方面から受容体により認識されることが明らかとなった。この特徴は、選択的積荷となるための必要条件である可能性がある。今後、Ams1の会合状態を変えた場合や、受容体により認識できる箇所を変えることで、Ams1の液胞輸送にどのような影響を与えるのか明らかにすることで、選択的積荷の一般的な必要要件が明確になることが期待される。

5. 発表論文、参考文献

1. Mizuhima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y. (2011) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107-132
2. Komatsu, M., Ichimura, Y. (2010) *Genes Cells* 15, 923-933
3. Watanabe, Y., Noda, N. N. (2012) *Biochemistry*, Deniz E. (Ed.), 386-396, InTech
4. Scott, S. V., Guan, J., Hutchins, M. U., Kim, J., Klionsky, D. J. (2001) *Mol. Cell* 7, 1131-1141
5. Suzuki, K., Kondo, C., Morimoto, M., Ohsumi, Y. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 30019-30025
6. Watanabe, Y., Noda, N. N., Kumeta, H., Suzuki, K., Ohsumi, Y., Inagaki, F. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 30026-30033
7. Watanabe, Y., Noda, N. N., Honbou, K., Suzuki, K., Sakai, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F. (2009) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65, 571-573