

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「オートファジーの膜動態解明を志向した
構造生命科学」

研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

研究代表者：野田 展生
((公財)微生物化学研究会微生物化学
研究所、部長)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

複雑な膜動態を伴うオートファジーの分子メカニズムを解明するため、オートファジーを制御する Atg 因子群の相互作用ネットワークの全貌およびその役割の解明を進めた。野田グループはオートファジー始動に関わる因子群の相互作用基盤の解明を進め、栄養飢餓によって天然変性タンパク質 Atg13 の脱リン酸化が生じ、その結果 Atg1 および Atg17 と結合することで Atg1 複合体が形成されること、加えて Atg13 が Atg17 同士を架橋することで Atg1 複合体の高次会合体が形成され、それがオートファゴソーム形成場の構築に働くことを明らかにした。さらに Atg1 複合体は液-液相分離を引き起こすことで液体状の会合体(液滴)を形成すること、それがオートファゴソーム形成場の実体であることを突き止めた。また Atg2 の N 末端領域に関する構造解析および生化学的解析を進め、Atg2 にはリン脂質を収容する疎水性のポケットがあること、そのポケットを利用してリポソーム間での脂質の輸送を行うことを見出した。野田・中戸川グループで協力して変異体解析を行った結果、Atg2 は小胞体と隔離膜との間の繫留因子として働くとともに、小胞体から隔離膜への脂質輸送に働くことを明らかにした。オートファゴソーム形成および基質選択に重要な役割を担う Atg8 に関して、様々な因子との相互作用解析を進めた。野田グループは、高等生物において複数ある Atg8 ホモログにはオープン型とクローズ型の2種類の構造型があり、それが機能分担に重要であることを明らかにした。さらに Atg8 に結合する新規モチーフを同定し、それらが従来知られている α ストランド型のモチーフと異なりヘリックス構造をとって Atg8 に結合することを見出した。稲垣グループは NMR 法を用いて Atg8 の脂質化を担う E2-E3 酵素の相互作用基盤を明らかにし、E3 酵素 Atg12-Atg5 結合体による E2 酵素 Atg3 の活性化機構を明らかにした。さらに Atg8 の脱脂質化を担う Atg4 の Atg8 認識機構も明らかにした。また野田・稲垣グループで協力して脂質化 Atg8 をナノディスクに効率的に組込む手法を確立し、NMR による解析から膜上の Atg8 が特定の配向を取ること、その際疎水性残基を脂質膜に埋めこむことで膜の表面積を増大させる活性があることを見出した。さらに野田グループによる巨大リポソームを用いた解析により、Atg8 が結合するとリポソームの構造変化が誘起され、表面が嵌入して閉じる直前の隔離膜と同様の膜形態になることが明らかとなった。すなわち Atg8 は膜との直接的な相互作用により膜の形態変化を促進する活性があることが初めて明らかとなった。中戸川グループは出芽酵母を用いて新規 Atg8 結合因子の探索を行い Atg39 および Atg40 を同定し、さらにこれらが受容体として機能することで核および小胞体がオートファジーにより選択的に分解されることを見出した。さらに野田・中戸川グループで協力して Atg39 および Atg40 が Atg8 とどのように相互作用するのかを明らかにした。また Atg8 の脂質化を担う E3 酵素複合体 (Atg16 複合体) が Atg1 複合体と相互作用をすることを見だし、この相互作用が Atg16 複合体のオートファゴソーム形成場への局在化の一端を担うことを明らかにした。また野田、稲垣、中戸川グループ合同でアミノペプチダーゼ I (Ape1) の会合体の選択的オートファジーの解析を進め、Ape1 の会合体形成機構およびその表面選択的な受容体 Atg19 の結合メカニズムを明らかにした。さらに野田グループは Ape1 選択的オートファジーの試験管内再構成に取り組み、従来凝集体と考えられてきた Ape1 会合体が、実は液-液相分離により形成された液滴であることを見出した。Atg19 のドメイン解析を行った結果、Atg19 は Ape1 液滴に強い親和性を持つドメインと不溶性のドメインの両方を持つこと、その結果 Atg19 は水溶液と Ape1 液滴の両方に親和性を持つ“両親媒性”を獲得していることを見出した。Atg19 はその両親媒性により、細胞質と Ape1 液滴の界面に集まり、その結果 Ape1 液滴の表面を覆うように結合する。一方選択的オートファジーが不能になる Ape1 の変異体では、Ape1 は液滴ではない凝集体を形成し、Atg19 はその表面選択的結合を示さなかったことから、Atg19 は液滴特異的な受容体として働くと考えられる。さらに脂質化 Atg8 を組み込んだ巨大リポソームと Atg19, Ape1 液滴の混合実験を行った結果、Ape1 液滴は巨大リポソームに繫留されたのち、リポソームの形状変化を引き起こし、最終的にリポソーム内へ嵌入した。以上の結果から、隔離膜による液滴選択的な隔離過程は、脂質化 Atg8 と両親

媒性受容体の二者だけで引き起こせることが明らかとなった。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 概要: オートファジーの始動を担う Atg1 複合体に関する構造生命科学研究を進め、Atg1 複合体を構築する相互作用および Atg1 複合体が集積してオートファジー始動装置を形成する分子基盤を詳細に明らかにするとともに、酵母におけるオートファジー始動の分子メカニズムを明らかにした。さらに哺乳類にも研究を展開し、高等生物固有の因子 Atg101 が哺乳類のオートファジー始動に果たす役割も明らかにした。以上の研究は完全に世界をリードして行われた。

2. 概要: 出芽酵母において、オートファジーにより核および小胞体の一部が選択的に分解されることを見いだした。これらオルガネラをオートファゴソームに積み込む新規レセプター分子としてそれぞれ Atg39 および Atg40 を同定し、これら過程の基本的分子基盤を明らかにした。核の分解は、窒素源飢餓により誘導され、同条件下での細胞の生存に重要であることを明らかにした。小胞体のレセプターである Atg40 はヒトの遺伝性感覚神経障害の原因遺伝子 FAM134B と機能的ホモログの関係にあることが示唆された。

3. 概要: 伸長中の隔離膜先端に局在し、小胞体とも接触することが知られる Atg2 に関する構造生命科学研究を進め、Atg2 がリン脂質を収容する疎水性のポケットを有することを明らかにした。さらに *in vitro*、*in vivo* 両面からの解析をすすめることで、Atg2 は膜間の脂質転送を担う活性を有すること、その活性がオートファゴソーム形成に重要であることを明らかにし、オートファゴソーム膜形成に関して“脂質輸送タンパク質を介した小胞体からの脂質の直接輸送”という全く新しいモデルを提唱することに成功した。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 概要: オートファジーの始動を担う Atg1 複合体の構造およびオートファジー始動機構が詳細に明らかになったことから、オートファジーに高い特異性を持った促進剤および阻害剤の開発が期待される。それら特異的薬剤はオートファジー研究試薬としての応用に加え、ひいては神経変性疾患の治療・予防や癌治療等への応用につながることを期待される

2. 概要: 小胞体の選択的オートファジーは、感覚神経障害との関連が示唆されており、核の選択的オートファジーについても何らかの高次生理機能や病気と関連している可能性が考えられる。酵母で得られた核および小胞体の選択的オートファジーに関する成果を哺乳類での研究に発展させることで、こうした疾患の治療や予防法の開発につながる成果が得られると期待される。

3. 概要: オートファジーの最大の特徴である隔離膜伸長過程を担う Atg2 の構造および脂質輸送活性が明らかになったことから、Atg2 をターゲットとしたオートファジー阻害剤の開発が期待される。Atg2 を介した隔離膜伸長はオートファジーに固有かつ絶対的に必要な過程であることから、高い特異性と強力な阻害活性の両方の特徴を持ったオートファジー阻害剤の取得が期待できる。

< 代表的な論文 >

1. Fujioka Y, Suzuki SW, Yamamoto H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Akada R, Inagaki F, Ohsumi Y, Noda NN, “Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex”, **Nat Struct Mol Biol**, vol. 21, pp513-521, 2014
2. Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, Nakatogawa H, “Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum

- and the nucleus”, **Nature**, vol. 522, No. 7556, pp359-362, 2015
3. Osawa T, Kotani T, Kawaoka T, Hirata E, Suzuki K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Noda NN, “Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation”, **Nat Struct Mol Biol**, vol. 26, pp281-288, 2019

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

① 野田グループ

- ・研究代表者:野田 展生 (微生物化学研究会微生物化学研究所、部長)
- ・研究項目
- ・Atg8と脂質の結合・脱結合反応の構造機能解析
- ・Atg 因子群が形成する相互作用ネットワークの構造機能解析
- ・Atg 結合系と相互作用する新規因子の構造解析

② 中戸川グループ

- ・主たる共同研究者:中戸川 仁 (東京工業大学生命理工学院、准教授)
- ・研究項目
- ・Atg8 に結合する新規タンパク質の同定と解析
- ・Atg 結合系を制御する新規因子の同定と解析

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・東京工業大学の岡田良典准教授のグループと、出芽酵母をモデル生物としたオートファジー研究に関して連携して進めている。
- ・東京大学の水島昇教授のグループと、マウスをモデル生物としたオートファジー研究に関して連携して進めている。
- ・順天堂大学の小松雅明教授のグループと、哺乳類における選択的オートファジー研究に関して連携して進めている。
- ・中国科学院の Hong Zhang 博士および群馬大学の佐藤美由紀博士のグループと、線虫をモデル生物としたオートファジー研究に関して連携して進めている。
- ・中国NIBSの Li-Lin Du 博士のグループと、分裂酵母をモデル生物としたオートファジー研究に関して連携して進めている。
- ・韓国韓南大学の Jin-A Lee 博士のグループと哺乳類オートファジーのプロープ開発で連携して進めている。
- ・京都大学の阪井康能教授のグループと、メタノール資化酵母をモデル生物としたオートファジー研究に関して連携して進めている。
- ・金沢大学の安藤敏夫特任教授のグループと、高速原子間力顕微鏡を用いたオートファジー研究に関して連携して進めている。
- ・東京大学の吉川雅英教授のグループと、低温電子顕微鏡を用いたオートファジー研究に関して連携して進めている。
- ・京都大学の岩田想教授のグループと、オートファジー関連膜タンパク質に関する構造研究に関して連携して進めている。
- ・ドイツゲーテ大学の Ivan Dikic 博士のグループと、小胞体の選択的オートファジーのレセプターの機能解析に関して連携して進めている。
- ・新潟大学の神吉智丈教授および大阪大学の岡本浩二准教授のグループと、マイトファジーの機能解析に関して連携して進めている。
- ・ドイツ Max Planck 研究所の Roland Knorr 博士と、オートファゴソーム形成場に関する研究お

よび Atg8 の膜への結合が膜の形態に与える影響に関して連携して進めている。

- 金沢医科大学の岡崎俊朗教授のグループと、脂質組成がAtg8の脂質化反応に与える影響に関して連携して進めている。

- 微生物化学研究所の五十嵐雅之部長、渡辺匠部長、百瀬功主席研究員、澤竜一上席室長らのグループと連携してオートファジー特異的制御剤開発の研究を進めている。