

オートファジーの主役である脂質化 Atg8 の立体構造と分子機能の解明

Maruyama, T., Alam, J. M., Fukuda, T., Kageyama, S., Kirisako, H., Ishii, Y., Shimada, I., Ohsumi, Y., Komatsu, M., Kanki, T., Nakatogawa, H. and *Noda, N. N. Membrane perturbation by lipidated Atg8 underlies autophagosome biogenesis. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 28, 583-593 (2021).

<研究の背景と経緯>

オートファジーでは、オートファゴソームと呼ばれる脂質膜の袋を新たに作り出し、分解対象を包み込んでリソソームへと運び、分解します。オートファゴソームの新生はオートファジーにおける最も特徴的かつ基本的な過程であり、多くの Atg タンパク質が担っています。中でも、脂質化 Atg8 はオートファゴソームやその前駆体である隔離膜に豊富に存在することから、オートファジーを担う中心的なタンパク質として最も盛んに研究が行われ、またオートファジーの指標分子として広く用いられてきました。しかし、脂質化 Atg8 が脂質膜に対して持つ活性や、その活性がオートファゴソーム形成に果たす役割などはよく分かっていませんでした。

脂質化 Atg8 が作られる過程において、Atg8 は他のいくつかの Atg タンパク質が触媒する酵素反応を受けて、膜を構成するリン脂質のうちの1つと共有結合を形成します。この Atg8 の脂質化反応は人工脂質膜を用いて試験管内において再構成することが可能であり、これまでに数多くの研究グループが試験管内で脂質化 Atg8 の機能を調べてきました。しかし、脂質化 Atg8 が脂質膜に対してどのような活性を持ち、それがどのようにオートファゴソーム形成に使われているのか、その仕組みは依然として謎に満ちていました。

<研究の内容>

これまでの試験管内での Atg8 の脂質化反応には一般的な球状の人工脂質膜が使われてきましたが、オートファゴソーム前駆体である隔離膜は非球状で形が異なるため、Atg8 の機能を調べるには適さないと考えられました。そこで我々は、隔離膜に形状に近い扁長の巨大人工脂質膜を調製し、それに対し Atg8 の脂質化反応を行い、膜の形態へ及ぼす影響を調べました。その結果、脂質化 Atg8 の形成に伴って、扁長の脂質膜がくびれて、互いに連結した2つの球状の脂質膜へと変形することを見いだしました。このことから、脂質化 Atg8 は膜の形態を変える活性を持っていることが明らかになりました（図 1a）。

そこでマイクロピペットを用いて脂質化反応時の脂質膜の膜面積の変化を測定したところ、脂質化 Atg8 の形成に伴って膜面積が増えました（図 1b）。この実験系では脂質化 Atg8 は脂質二重層の外層のみに作られることから、脂質化 Atg8 によって内層に対する外層の膜面積が増えた結果、上述したような膜の形態変化が生じたと考えられます（図 1c）。

次に脂質化 Atg8 の脂質膜上における立体構造を調べるため、溶液 NMR 法を用いて解析しました。その結果、脂質化 Atg8 は脂質膜に対して特定の配向を取ること、脂質化 Atg8 の芳香族アミノ酸が脂質膜面と相互作用することが明らかになりました（図 2）。また、その芳香族アミノ酸を別のアミノ酸に変異したところ、膜の形態変化および面積の増大が抑制されたことから、脂質化 Atg8 は芳香族アミノ酸を用いて脂質膜と相互作用することで、膜変形の活性を発揮することが分かりました。

さらに、酵母と哺乳類細胞を用いて Atg8 の芳香族アミノ酸の重要性を解析しました。

Atg8 の芳香族アミノ酸への変異導入によって、酵母におけるオートファゴソームの形成効率が著しく低下することが分かりました。さらに同様の変異を哺乳類 Atg8 に導入したところ、哺乳類細胞のオートファジー活性も低下することも分かりました。

以上の結果から、脂質化 Atg8 の膜の形態を変える活性がオートファゴソームの効率的な形成を可能にしていること、その活性において Atg8 の芳香族アミノ酸の重要性はヒトを含む生物種間で共通していることが明らかになりました。

＜今後の展開＞

オートファゴソームの形成は、脂質化 Atg8 を含む多数の Atg タンパク質と脂質膜の相互作用によって達成されます。本研究では、扁平人工脂質膜とマイクロピペットを用いた技術を試験管内の再構成実験に新たに適用することで、脂質化 Atg8 の未知の活性を見いだすことに成功しました。このように新たな実験系の開発と応用をうまく組み合わせることで、個々の Atg タンパク質が持つ活性とそれらの機能連携を明らかにすることが可能となり、オートファゴソーム形成の分子機構の完全理解につながることを期待されます。

オートファゴソーム形成はオートファジーの最も基本的かつ重要な過程であり、その理解を深めることは、オートファジーを人工的に高度に制御するためには不可欠です。本研究で確立した試験管内での活性測定系は、オートファジー制御化合物の活性評価に応用可能であり、オートファジーに関連したさまざまな疾病の治療や予防法の開発研究の促進にも寄与することが期待されます。本研究は、東京工業大学 生命理工学院の中戸川 仁 准教授および東京工業大学 科学技術創成研究院の大隅 良典 栄誉教授、新潟大学 大学院医歯学総合研究科の神吉 智丈 教授、順天堂大学 大学院医学研究科の小松 雅明 教授、理化学研究所 生命機能科学研究センターの嶋田 一夫 チームリーダーらと共同で行いました。

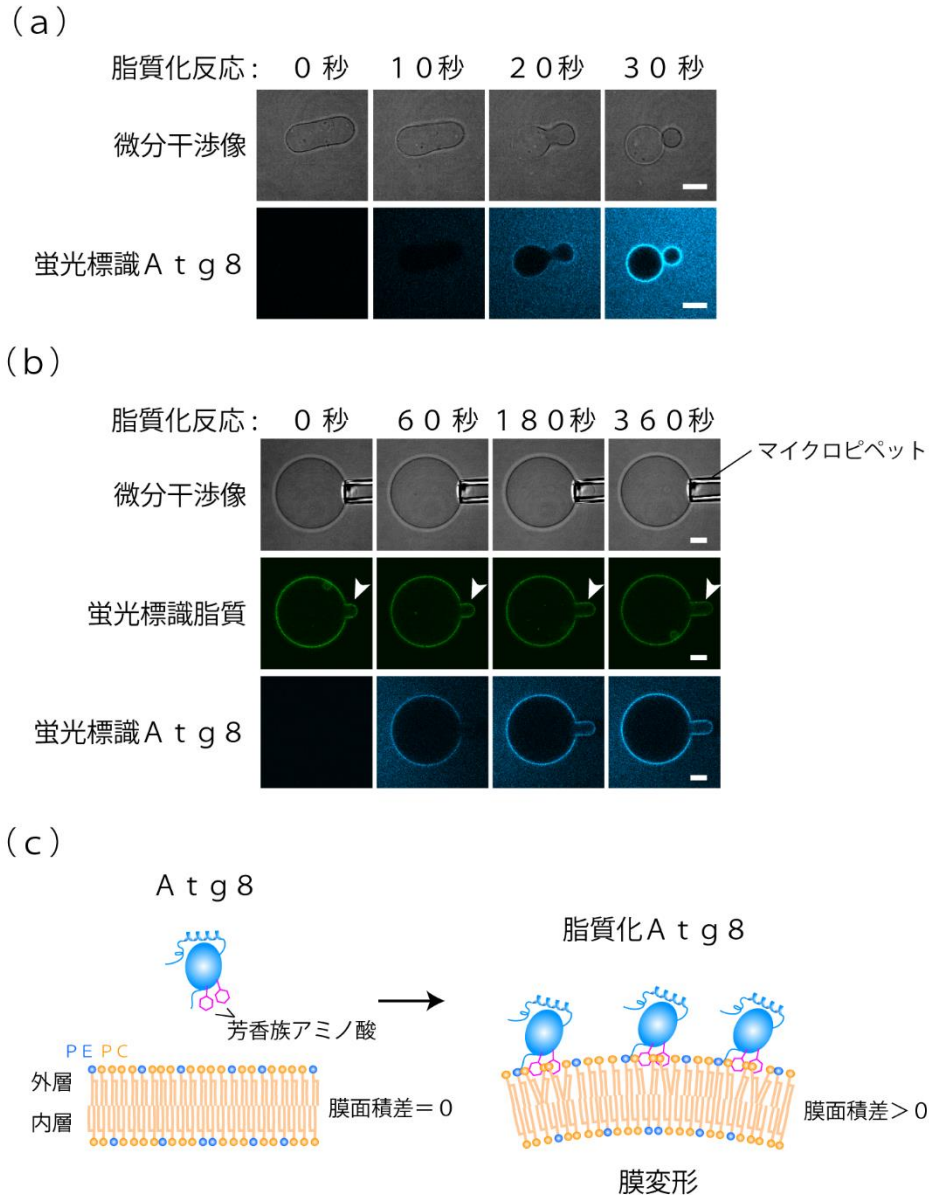


図 1 脂質化 Atg8 の膜変形活性

- (a) Atg8 の脂質化に伴って、扁長の脂質膜が、連結した 2 つの球状の脂質膜に変形する。(スケールバー：10 マイクロメートル)
- (b) Atg8 の脂質化に伴って、脂質膜のマイクロピペット内の部分（白い矢頭）が増大している。(スケールバー：10 マイクロメートル)
- (c) 脂質化 Atg8 の芳香族アミノ酸が脂質膜の外層と相互作用することで、内層に対して膜面積差が増えて、膜変形が生じる。(PC：ホスファチジルコリン、PE：ホスファチジルエタノールアミン)

脂質化 A t g 8

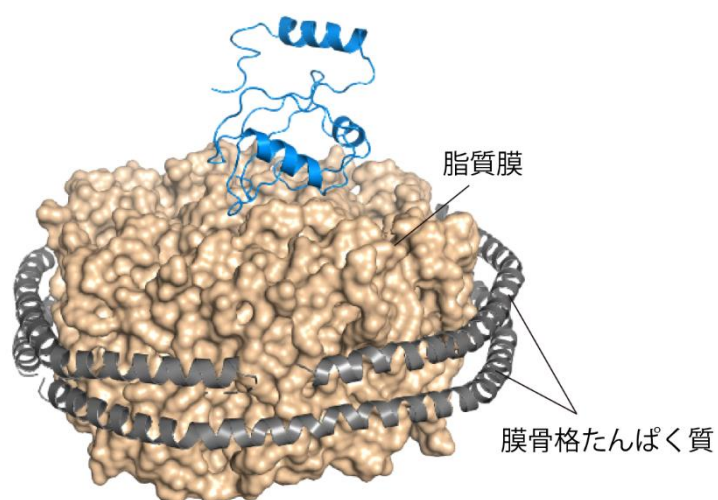


図2 脂質化 Atg8 の立体構造

膜骨格タンパク質を利用して脂質膜を可溶化し、そこに脂質化 Atg8 を再構成することで、溶液 NMR 法による解析を可能にした。その結果、脂質化 Atg8 は膜上において図のような配向を取り、脂質膜表面と相互作用することが明らかとなった。脂質化 Atg8 および膜骨格タンパク質をリボン図、脂質膜を表面表示でそれぞれ示した。