最近の研究から

オートファジーの始動を制御する複合体の立体構造

(公財)微生物化学研究会 微生物化学研究所 藤岡優子, 野田展生

Yuko FUJIOKA and Nobuo N. NODA: Structural Basis of Starvation-induced Assembly of the Autophagy Initiation Complex

Autophagy is an intracellular bulk degradation system conserved from yeast to human. Assembly of the pre-autophagosomal structure (PAS) is one of the most important events in starvation-induced autophagy. Recently, the structures of the autophagy initiating Atg1 complex that constitutes the PAS core have been solved by X-ray crystallography. In this review, we summarize current knowledge regarding the structure and the molecular mechanism of starvation-induced assembly of the Atg1 complex and propose the current model of autophagy initiation.

1. はじめに

細胞内での恒常性維持にはタンパク質などの合成と分解が適切に調節されることが重要である。細胞内での分解経路は大きく分けて2つある。1つはユビキチン-プロテアソーム系, もう1つはオートファジー-リソソーム系である。前者がユビキチンによって標識された分解対象のタンパク質のみをプロテアソームが分解するシステムなのに対し, 後者は分解対象を特定せずにランダムに包み込み, リソソームまで輸送し分解するシステムである。オートファジーが分解する対象はタンパク質だけでなく多岐にわたっており, ミトコンドリアやペルオキシソームなどのオルガネラや, 細胞内に侵入した病原体をも分解対象とする。¹⁾ オートファジーが誘導されると, 新規に膜構造が形成され, 分解対象を包み込みながら伸長していく。この膜は隔離膜と呼ばれ, 最終的に端がつながり二重膜により包まれたオートファゴソームとなる(図1)。²⁾ オートファゴソームは一重の膜ではなく二重膜(脂質二重層が二重になっている)である。ここがほかの細胞内膜動態と比べてオートファジーの膜形成の非常に面白いところであり, 多くの研究者を惹きつけている

が, 脂質の由来や二重膜の形成機構については多くの議論があり, いまだ結論が出ていない。引きつづいてオートファゴソームの外膜が液胞あるいはリソソームと融合し, オートファゴソームの内膜と内容物が消化酵素により分解される。

出芽酵母ではオートファゴソームの形成の過程において18ものオートファジー関連タンパク質(Atgタンパク質)が必須であることがわかっている。²⁾ これらAtgタンパク質は液胞の近傍にあるPAS (pre-autophagosomal structure, 前オートファゴソーム構造体) と呼ばれる構造体に集積する。³⁾ PASは電子顕微鏡でもその姿が捉えられておらず詳細は不明であるが, オートファゴソーム形成過程において構成するタンパク質が変化する, ダイナミックなタンパク質複合体と考えられる。隔離膜はPASから形成されるので, PASの構造および機能を明らかにすることはオートファゴソームの形成の分子機構を知るうえで必要不可欠である。

飢餓によって誘導されるオートファジーではAtg17-Atg29-Atg31複合体がPAS形成における上流の分子である。^{4), 5)} Atg17-Atg29-Atg31複合体は, 栄養条件にかかわらず2:2:2の複合体を形成しているが,⁶⁾ ここに栄養セン

図1 オートファジーの進行モデル。(Schematic model of autophagy.)

図2 TORによるAtg1複合体の制御。(Regulation of the Atg1 complex by TOR.)

サーであるTORの活性の低下により脱リン酸化状態になったAtg13と、さらにAtg13に結合するAtg1が結合することによってAtg1複合体 (Atg1-Atg13-Atg17-Atg29-Atg31複合体, 哺乳類では, ULK1複合体) を構築する。⁵⁾ Atg1複合体は下流のAtg因子群を呼び寄せる足場となり, PASが構築されることでオートファゴソーム形成が進行していく (図2)。これらの相互作用はAtg1のもつキナーゼ活性を上昇させるが, キナーゼ活性もオートファジーの始動において必須であることがわかっている。⁷⁾ しかしながら, これまでAtg13を介したAtg1複合体の形成の構造基盤は明らかにされておらず, これらのタンパク質がどのような相互作用により結合し, それらがリン酸化によりどのように制御されているのかは不明であった。

本稿では, 筆者らが行ったAtg1-Atg13複合体およびAtg13-Atg17-Atg29-Atg31複合体のX線結晶構造解析を中心に, Atg1複合体に関する最新の構造生物学的知見について解説する。また, 質量分析法により網羅的に同定したAtg13の飢餓依存的脱リン酸化部位の情報, および得られた立体構造情報に基づいて行った*in vivo* と*in vitro*における変異体解析についても解説し, Atg13の脱リン酸化がどのようにAtg1およびAtg17との結合を制御し, PASの構築をひき起こすのかを構造生物学的観点から紹介したい。

2. Atg17-Atg29-Atg31複合体の構造

2012年, RagusaらによってAtg17-Atg29-Atg31複合体のX線結晶構造が明らかになった。⁸⁾ Ragusaらは当初, 出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*に由来する遺伝子を用いてタンパク質の結晶化を行ったが失敗に終わり, 次に近縁の酵母である*Kluyveromyces lactis*に由来する遺伝子を用いた結果, 結晶を得ることに成功したものの, 構造解析に耐えるデータは得られなかった。そこで最終的に耐熱性の酵母*Lachancea thermotolerans*に由来する遺伝子を用い, 良好な結晶を得て分解能3.05 Åの結晶

図3 Atg17複合体の結晶構造。(Crystal structure of Atg17 complex.) A: Atg17-Atg29-Atg31複合体の結晶構造 (PDB 4HPQ)。B: Atg29-Atg31部分の拡大図。C: Atg17-Atg13^{17BR}間相互作用の拡大図 (PDB 4P1W)。

構造を得た。⁸⁾ 実は筆者らも同様な経緯で別の耐熱性酵母*Kluyveromyces marxianus*に由来する遺伝子を用いてタンパク質の結晶化を行っていたが結晶は得られていなかった。結晶構造解析にはより多くの種を試すのが非常に重要であると改めて痛感した出来事であった。

Atg17は4本の α ヘリックスからなる弓形の構造をとっており, C末端でホモ2量体化し特徴的なS字構造を形成していた (図3A)。この構造は弓型の構造を用いて膜と結合するBARドメインとの類似性を暗示するものであったが, 膜と結合すると考えられる凹面にはAtg29-Atg31が結合していた。Atg31はC末端に1本の α ヘリックスをもち, この α ヘリックスでAtg17の3本の α ヘリックスと4ヘリックスバンドルを形成していた。Atg29はN末端に1本の β ストランドをもち, Atg31の7本の β ストランドとともに β サンドイッチ構造を形成していた (図3B)。つまりAtg17-Atg29-Atg31複合体は互いにその構造を安定しあう強固な複合体を形成していた。Atg29の β ストランドのC末端側には3ヘリックスバンドルが形成されており, 残りは天然変性領域であった。この天然変性領域はオートファジーには不要であり, むしろ阻害的な働きをしているという報告があるが,⁹⁾ その詳細は明らかとなっていない。

Atg17-Atg29-Atg31複合体は電子顕微鏡による単粒子解析によってもその構造が解析されている。^{9), 10)} 電子顕微鏡像でもAtg17-Atg29-Atg31複合体はX線結晶構造と同じ2量体化によるS字構造をとるが, Atg17単独ではS字構造以外の形状をとる頻度が上昇する。Atg29-Atg31は, 意義は不明であるが, Atg17に結合することでAtg17をS字構造に固定する役割を担っているようである。S字構造の意義については, 2つの凹領域にオートファゴソームの最初の原料と考えられているAtg9小胞 (膜タンパク質Atg9が組み込まれた膜小胞) を2つ結合

させることで、Atg9小胞同士をつなぎとめる可能性が議論されている。⁸⁾しかしながらそのためにはAtg29-Atg31が何かのシグナルに応じて凹領域から離れる必要があるが、そのような現象は確認されておらず、さらにAtg17の膜への結合自体が確認できていない。Atg17の特徴的なS字構造の分子機能解明には、さらなる研究が必要である。

3. Atg1-Atg13複合体の構造とそのオートファジーにおける役割

Atg13はN末端にHORMAドメインをもつが、¹¹⁾それ以外の約450残基は天然変性領域 (Intrinsically disordered region, IDR) と予測される天然変性タンパク質である。Atg1との結合領域を同定した結果、IDRにある62残基 (残基番号460～521, 本稿における残基番号およびアミノ酸の種類は、すべて出芽酵母の場合) がAtg1との結合において必要十分であり、この領域が実際に天然変性状態であることが円偏光二色性スペクトル測定により確認された。¹²⁾Atg1はN末端側にキナーゼドメインをもち、C末端側には保存されたAtg13結合領域が存在する。Atg1のAtg13結合領域とAtg13のAtg1結合領域は、どちらも単独で大腸菌内で発現させるには不安定であった。

そこで大腸菌内で共発現させることでタンパク質を安定化させ、複合体を精製することに成功した。Atg17-Atg29-Atg31複合体の項でもあったが、当初はこれも出芽酵母に由来する遺伝子を用いてタンパク質の結晶化を行ったが失敗に終わり、次にタンパク質の立体構造がより安定であると考えた耐熱性酵母 *K. marxianus* に由来する遺伝子を用いてタンパク質の結晶化を行った。その結果、良好な結晶の調製に成功し、それぞれの結合領域のみの小型化したAtg1-Atg13複合体の結晶構造を分解能2.2 Åで決定することができた (図4)。¹²⁾ Atg1のC末端領域は6本の α ヘリックスからなっており、これらは互によく似ている2つの逆平行3-ヘリックスバンドルを形成していた。そして3-ヘリックスバンドル同士

が密接に相互作用することにより、1つの球状構造を形成していた。最近、Atg1のC末端領域が膜に結合し、膜の局率を感知するという報告がなされたが、⁸⁾この結晶構造は少なくともBARドメインなど、膜の局率を感知する既知のドメインとの相同性はなかった。興味深いことに、Atg1の2つの3-ヘリックスバンドル構造は、どちらも多胞体経路に参与するタンパク質に見られるMIT (microtubule interacting and transport) ドメインに相同性があったことから、N末端側からそれぞれMIT1およびMIT2と命名した。一方、Atg13は2本の α ヘリックスがループでつながれた構造をとっており、N末端側の α ヘリックスはMIT2と、C末端側の α ヘリックスはMIT1と結合していた。Atg1とAtg13の結合の様式は、上述の多胞体経路に参与するESCRT (endosomal sorting complex required for transport) タンパク質などにおいて、タンパク質間相互作用に用いられるMITドメインとMIM (MIT-interacting motif) 領域との結合の様式と類似していた。そこで、Atg13のAtg1結合領域全体をMIM、そのN末端側をMIM(N)、C末端側をMIM(C)と命名した。一方、Atg1のAtg13結合領域全体 (MIT1+MIT2) はtandem MIT (tMIT) と命名した。Atg1^{tMIT}とAtg13^{MIM}の相互作用はおもに疎水性相互作用であり、MIT1あるいはMIT2それぞれの表面にできた疎水性の溝にそってAtg13^{MIM}のもつ2つの α ヘリックスが結合していた。Atg1^{tMIT}はAtg1のヒトホモログであるULK1にも保存されているが、ULK1の2つのMITドメインはヒトのAtg13のIDRにある約60残基の領域と安定な複合体を形成することを確認した。このことから、Atg1^{tMIT}とAtg13^{MIM}との相互作用の様式が進化において保存されていることが示唆された。

得られたAtg1^{tMIT}-Atg13^{MIM}複合体の結晶構造をもとに欠損変異体の解析を行った。等温滴定型熱量測定により解離定数を求めたところ、Atg13^{MIM(N)}はAtg1^{tMIT}に対し解離定数が2.5 μ Mの結合を示したのに対し、Atg13^{MIM(C)}は同じ条件では結合を示さなかった。つまり、Atg1^{tMIT}とAtg13^{MIM}との相互作用は主にAtg13^{MIM(N)}により担われていることが明らかになった。しかし、Atg13^{MIM}とAtg1^{tMIT}の解離定数は0.36 μ Mで、Atg13^{MIM(N)}より7倍強い結合を示したことから、Atg13^{MIM(C)}が補助的にはたらくことでAtg13^{MIM(N)}とAtg1^{tMIT}との結合を強固なものにしていると考えられた。この結果と一致して、*in vivo*の免疫沈降実験でもAtg13^{MIM(C)}の欠損でAtg1^{tMIT}との結合が弱くなり、Atg13^{MIM(N)}の欠損ではAtg1^{tMIT}との結合は完全に失われた。つまり、Atg13^{MIM(N)}はAtg1^{tMIT}に対して基底レベルの結合を維持する一方、Atg13^{MIM(C)}を用いてより強固な結合を作り出すという作用機序が考えられた。

結晶構造においてAtg1^{tMIT}の疎水性のポケットにつ

図4 Atg1-Atg13複合体の結晶構造。(Crystal structure of Atg1-Atg13 complex.) PDB 4P1N.

きささっていた Atg13^{MIM(N)} の Phe468 あるいは Leu472 を Ala に置換した変異体を用いて等温滴定型熱量測定により解離定数を求めたところ, Atg13^{MIM} (F468A) は Atg1^{MIT} に対し解離定数が 34 μ M と野生型と比べて約 100 倍の値 (結合の低下) が得られた. また, Atg13^{MIM} (F468A L472A) は同じ条件では結合を示さなかった. このことから, 結晶中で見られた Atg13^{MIM(N)} と Atg1^{MIT} との疎水性相互作用は実際にこれらの結合において重要であることが明らかとなった.

次に, Atg1^{MIT} と Atg13^{MIM} 間の結合のオートファジーにおける意義について出芽酵母を用いて調べた. この変異体を発現した株では, Atg13^{MIM} 欠損変異体を発現した株と同様に, 飢餓条件においても PAS の形成が起こらず, オートファジー活性も示さなかった. また, Atg1 の活性化の指標である Atg1 の自己リン酸化もこの変異体を発現した株では起こらなかった. これらのことから, 得られた Atg1^{MIT}-Atg13^{MIM} 複合体の結晶構造は妥当なものであり, Atg1^{MIT} と Atg13^{MIM} との結合がオートファジーにおいて必須であることが明らかになった.

4. Atg13-Atg17 間相互作用の構造基盤とそのオートファジーにおける役割

Atg13 における Atg17 結合領域を *in vitro* プルダウン実験により探索した結果, Atg13 の IDR に存在するわずか 13 残基の領域 (残基番号 424 ~ 436) が Atg17 との結合に十分であることがわかった. そこでこの領域を Atg17 binding region (17BR) と命名した. 上述した *L. thermotolerans* に由来する Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造⁸⁾を参考にして大腸菌における共発現系を構築した. 複合体のタンパク質を発現精製した後, 相同性の解析から同定した *L. thermotolerans* に由来する Atg13^{17BR} を共結晶化し, Atg13^{17BR}-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造を分解能 3.2 Å で決定した (図 3C).¹²⁾ Atg17-Atg29-Atg31 複合体部分の構造は, 上述した三者複合体の構造とほぼ同等であった. Atg13^{17BR} は Atg17 の N 末端付近にある疎水性ポケットに 2 つの疎水性残基 Phe430 および Ile433 をつきさして結合しており, さらに Ser428 および Ser429 により Atg17 の Asp247 と水素結合を形成していた.

得られた Atg13^{17BR}-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造をもとに変異体の解析を行った. 等温滴定型熱量測定の結果, 野生型 Atg17 と Atg13^{17BR} との解離定数は 1.2 μ M という値を示したが, Asp247 を Ala に置換した Atg17 変異体では Atg13^{17BR} との結合は観測されなかった. 相互作用にかかわるほかの残基の重要性についても, *in vitro* プルダウン実験や免疫沈降実験により確認した. また, 出芽酵母を用いた解析の結果, Asp247 を Ala に置換した Atg17 変異体を発現した株は飢餓条件に

においても PAS の形成が起こらず, オートファジー活性も示さなかった. 以上の結果から, 得られた Atg13^{17BR}-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造は妥当なものであり, Atg13^{17BR} と Atg17 との結合が PAS の形成およびオートファジーにおいて必須であることが明らかになった.

5. Atg1 複合体の形成制御機構

5.1 Atg13^{MIM(C)} の脱リン酸化が Atg1 との結合を増強する

Atg13 と Atg1, Atg17 の相互作用についての構造基盤を明らかにすることができたので, 次にこれらの相互作用がどのように制御されているのかを明らかにすることにした. これまでの報告から, Atg13 の主に TOR によるリン酸化レベルが栄養条件によって変化し, それが複合体形成のスイッチの ON/OFF を制御していると想定されたので,⁷⁾ 質量分析法により Atg13 のリン酸化の状態を調べた. 具体的には, TOR の阻害剤であるラパマイシンを処理した出芽酵母から精製した Atg13 と未処理の出芽酵母から精製した Atg13 とを比べることにより, ラパマイシンの処理によりリン酸化のレベルが低下する 51 の残基を同定した.¹²⁾ ラパマイシン依存的に脱リン酸化された残基は Atg13^{MIM(N)} には含まれず Atg13^{MIM(C)} に含まれていたことから, Atg13^{MIM(C)} に存在する 5 残基の Ser を Asp に置換することでリン酸化をミミックした変異体 (5SD) を作製した. 免疫沈降実験において, この変異体はラパマイシンを処理しても Atg1 との結合はほとんど見られなくなった. 等温滴定型熱量測定により解離定数を求めたところ, Atg1^{MIT} と Atg13^{MIM} の 5SD 変異体との解離定数は 1.2 μ M という値を示した. この値は Atg1^{MIT} と野生型 Atg13^{MIM} との解離定数の約 3 倍であったことから, Atg13^{MIM(C)} は Atg13^{MIM(N)} と Atg1^{MIT} との結合をリン酸化により十分には増強できず, その結果, 生体における Atg1-Atg13 複合体の量は大きく減少すると考えられた. そこで Atg13 の 5SD 変異体を出芽酵母に発現させると, 変異体を発現した株では野生型を発現した株に比べオートファジー活性が顕著に低下していたが, そのレベルは Atg13^{MIM(C)} 欠損変異体を発現した株と同程度であった. すなわち Atg13^{MIM(C)} のリン酸化は, Atg1 との結合を完全に阻害するのではなく, 複合体の形成量を減少させていると考えられた.

5.2 Atg13^{17BR} の脱リン酸化が Atg17 との結合を誘導する

Atg13 と Atg17 との結合も Atg13 のリン酸化が制御の鍵をにぎっていると考えられたので, 前述の質量分析法によって同定されたリン酸化残基について Atg13^{17BR} に注目したところ, Ser428 および Ser429 が含まれていた. Atg13^{17BR}-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造解析の項で述べたように, Atg13 の Ser428 および Ser429 は

Atg17のAsp247と水素結合を形成しており、Atg13^{17BR}とAtg17との結合に必須であった。このSerがリン酸化されることはAsp247との水素結合を破壊するだけでなく、電荷的な反発も引き起こす。実際に、Ser429をAspに置換したAtg13変異体はAtg17との結合を示さなかった。また、この変異体を発現した株ではPASの形成がまったく見られず、オートファジー活性もほとんど示さなかった。

リン酸化Ser428, Ser429を含むAtg13の断片を合成し、それを抗原に用いることでこれらリン酸化Ser特異的に認識する抗体を作製し、生体におけるリン酸化の状態を確認したところ、富栄養条件においてはリン酸化が検出されたが、ラパマイシン処理あるいは飢餓条件においてリン酸化はほとんど見られなくなった。すなわち、Atg13のSer428およびSer429は富栄養条件においてリン酸化されており、飢餓により脱リン酸化することが示された。以上のことから、Atg13とAtg17との結合はAtg13のSer428およびSer429のリン酸化によって負に制御されていることが明らかになった。

6. 複合体形成には関与しない領域の構造

これまでに紹介した構造解析により、Atg1複合体を構築する相互作用の全貌が明らかとなった。しかしAtg1およびAtg13に関してはその一部の領域しか複合体形成に直接関与せず、したがって大部分の領域は複合体の構造解析に含まれていない。Atg1はC末端側のtMIT以外に、N末端側にキナーゼドメイン(KD)を、またKDとtMITを繋ぐ領域に約250アミノ酸からなるIDRをもつ。一方、Atg13は上述のように大部分がIDRであるが、N末端側に唯一硬い構造を取ったHORMAドメインをもつ。Atg1のヒトホモログであるULK1のKDおよび耐熱性酵母*L. thermotolerans*のAtg13のHORMAについて、それぞれの結晶構造が最近報告された。^{11), 13)}

6.1 ヒトULK1のKDの結晶構造

ヒトULK1のKDの結晶構造は、阻害剤との複合体として分解能1.56 Åという高分解能で決定された。¹³⁾ 一般的にキナーゼドメインは大腸菌から発現、精製することは難しいが、この著者らはプロテインホスファターゼとの共発現などさまざまな工夫を行うことで、大腸菌からのULK1 KDの発現、精製に成功した。さらに良好な結晶を得るために阻害剤をスクリーニングし、Aurora-Bキナーゼ阻害剤などに代表されるピラゾール-アミノキナゾリン誘導体を共結晶化に用いることで良質な結晶を得ることに成功した。

ULK1のKDの全体構造は、図5Aに示すように標準的なキナーゼフォールド、すなわちN-lobeとC-lobeの2つのサブドメインからなり、N-lobeは6本のβ-ストランドからなるβ-シート1つと1本のα-ヘリックスから

図5 ULK1 KDとAtg13 HORMAの構造 (Crystal structures of ULK1 KD and Atg13 HORMA) A: ULK1 KDの結晶構造 (PDB 4WNO). B: Atg13 HORMAの結晶構造 (PDB 4J2G).

構成され、C-lobeは主にα-ヘリックスから構成されていた。ATP結合部位は通常このlobeの間の溝に位置するが、共結晶化した阻害剤はまさにこの溝に入り込んで結合していた。ULK1のKDは2つのlobeの間に特徴的な長いループをもつが、配列上はAtg1のほうがより長いループをもつ。ULK1のキナーゼ活性の活性化のためにはC-lobeに挿入された活性化ループ中のThr180がリン酸化を受けることが重要であるが、大腸菌から調製したULK1はThr180が自己リン酸化を受けていた。結晶構造中で、リン酸化されたThr180は保存された2つのArgと塩橋をつくることにより活性化ループの構造を固定し、KDの構造を活性型に保っていた。ULK1のThr180はAtg1ではThr226に相当し、実際に出芽酵母内でリン酸化されていることが確認されている。また、Atg1においてもこの残基のリン酸化はAtg1のキナーゼ活性の上昇やオートファジーの誘導に必須である。ULK1のKDの表面電荷を見ると、ATP結合部位の裏側に大きな塩基性の領域が確認された。この領域はオートファゴソームや隔離膜などの膜構造、もしくはULK1のtMITドメインなどと結合する可能性が議論されたが、¹³⁾ 実験的な知見はない。Atg13はAtg1に結合することでAtg1のキナーゼ活性を上昇させる。筆者らが決定したAtg1^{tMIT}-Atg13^{MIM}複合体構造には広い酸性面が存在することから、この酸性面がAtg1のKDの塩基性面に結合することによってKD内になんらかのコンフォメーション変化を誘起し、その結果キナーゼ活性が上昇するというのがもっともらしい仮説となるが、その検証のためにはKDを含めたAtg1-Atg13複合体の立体構造の決定など今後の研究の進展が期待される。

6.2 Atg13のHORMAドメインの結晶構造

Atg13のHORMAドメインの結晶構造は、単体で分解能2.3 Åで決定された(図5B)。¹¹⁾ Atg13のHORMAは5本鎖の逆平行β-シートを中心としたα/βフォールドをとっており、4本のα-ヘリックスがβ-シートの片面に配置していた。このトポロジーはスピンドルチェックポイント

の関連タンパク質である Mad2 などに見られる HORMA ドメインによく似ていたことから、それまで単に N 末端ドメインと呼ばれていたこの領域は HORMA と命名された。Mad2 はオープンとクローズの互いにトポロジーの異なる 2 つの安定なコンフォメーションをとるとされているが、Atg13 HORMA は Mad2 のクローズ構造に類似していた。Atg13 は上述の α/β フォールド以外に、ほかの HORMA タンパク質には見られない固有の短い 3 本鎖の逆平行 β -シート構造をもち、それが帽子のように HORMA フォールドに被さっていた (図 5B)。Mad2 との構造の類似性から、Atg13 HORMA も 2 つのコンフォメーションの存在が議論されているが、Atg13 固有の帽子がクローズ構造を固定しているように見えること、オープン構造をもつという実験データはこれまで報告されていないことから、今後のさらなる検証が必要である。Atg13 HORMA は下流因子の PAS へのリクルートに必要であることが示されたが、直接の結合相手はわかっていない。

7. オートファジーの始動モデル

以上述べてきた知見から考えられるオートファジーの始動モデルは次のようなものである (図 6)。富栄養条件下において Atg13 の IDR は TOR により高リン酸化されており、そのうち Atg13^{MIM(C)} のリン酸化が Atg1 との結合を減弱し、また Atg13^{17BR} のリン酸化が Atg17 との結合を強く阻害している。飢餓により Atg13 が脱リン酸化されると、Atg13^{MIM(C)} が Atg1 との結合に加わることで Atg1 と Atg13 との親和性が増強され、また Atg13^{17BR} が Atg17 と強く結合することで Atg1 複合体 (Atg1-Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体) が完成する。Atg1 複合体は PAS 形成の足場として働き、Atg13 の HORMA などを通して下流因子のリクルートを行うとともに、活性化した Atg1 の KD がさまざまな因子をリン酸化することで下流にシグ

図 6 Atg1 複合体の全体モデル。(Schematic model of the Atg1 complex.) 天然変性領域は線で示した。数字は残基番号を示す。

ナルを伝え、オートファジーが始動する。

8. おわりに

この総説では筆者らが最近報告した、出芽酵母における Atg1 複合体の形成機構を中心に紹介したが、哺乳類では ULK1, Atg13, FIP200, Atg101 のつくる ULK1 複合体がオートファジーの始動について同様の役割をはたすことが知られている。⁹⁾ ULK1 には Atg1 の MIT ドメインが保存されていることから、Atg13 との相互作用は MIT ドメインと MIM 領域との相互作用と考えられる。

しかし、出芽酵母において Atg1 との結合の制御にはたっている Atg13^{MIM(C)} のもつ Ser は哺乳類の Atg13 において保存されておらず、実際に、ULK1 複合体は栄養状態にかかわらず常に Atg13 と結合していると報告されている。一方、Atg17 と FIP200 との配列相同性は低いが、Atg17 と同様に FIP200 もコイルドコイルタンパク質と予測されること、また、機能的にも類似していることから、FIP200 は Atg17 の機能ホモログと考えられている。¹⁴⁾ 哺乳類の場合、FIP200 もまた恒常的に ULK1 と複合体を形成していると報告されている。¹⁴⁾ しかしながら、Atg13-Atg17 間結合のリン酸化による厳密な制御を目のあたりにすると、哺乳類における Atg13 と FIP200 との結合もまたリン酸化により何らかの制御を受けていると思わざるを得ない。実際、哺乳類 Atg13 も mTOR によるリン酸化の制御を受けている。例えば、ULK1 複合体の状態を保ったまま、構成タンパク質のドメイン間結合の組み替わりなどが、脱リン酸化により引き起こされないだろうか。酵母 Atg1 複合体と並行して、哺乳類 ULK1 複合体の構造研究も進めていくことで、両者に共通する普遍的なメカニズムを明らかにできると期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、東京工業大学の大隅良典博士、横浜市立大学の平野久博士らのグループとの共同研究で行われました。深く感謝いたします。回折実験は、SPRING-8 (課題番号 2013A1001, 2013B1005) および高エネルギー加速器研究機構 (課題番号 2013G543, 2013R-42, 2009G143) で行いました。本研究は、科学研究費補助金新学術領域研究、日本学術振興会特別研究員奨励費および JST CREST の支援を受けました。

文 献

- 1) N. Mizushima and M. Komatsu: *Cell* **147**, 728 (2011).
- 2) N. Mizushima, T. Yoshimori and Y. Ohsumi: *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **27**, 107 (2011).
- 3) K. Suzuki, T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda and Y. Ohsumi: *EMBO J.* **20**, 5971 (2001).
- 4) K. Suzuki, Y. Kubota, T. Sekito and Y. Ohsumi: *Genes Cells* **12**, 209 (2007).

- 5) T. Kawamata, Y. Kamada, Y. Kabeya, T. Sekito and Y. Ohsumi: *Mol. Biol. Cell* **19**, 2039 (2008).
- 6) Y. Kabeya, N. N. Noda, Y. Fujioka, K. Suzuki, F. Inagaki and Y. Ohsumi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**, 612 (2009).
- 7) Y. Kamada, T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi and Y. Ohsumi: *J. Cell Biol.* **150**, 1507 (2000).
- 8) M. J. Ragusa, R. E. Stanley and J. H. Hurley: *Cell* **151**, 1501 (2012).
- 9) K. Mao, L. H. Chew, Y. Inoue-Aono, H. Cheong, U. Nair, H. Popelka, C. K. Yip and D. J. Klionsky: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E2875 (2013).
- 10) L. H. Chew, D. Setiawati, D. J. Klionsky and C. K. Yip: *Autophagy* **9**, 1467 (2013).
- 11) C. C. Jao, M. J. Ragusa, R. E. Stanley and J. H. Hurley: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 5486 (2013).
- 12) Y. Fujioka, S. W. Suzuki, H. Yamamoto, C. Kondo-Kakuta, Y. Kimura, H. Hirano, R. Akada, F. Inagaki, Y. Ohsumi and N. N. Noda: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 513 (2014).
- 13) M. B. Lazarus, C. J. Novotny and K. M. Shokat: *ACS Chem. Biol.* **10**, 257 (2015).
- 14) T. Hara, A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J. L. Guan and N. Mizushima: *J. Cell Biol.* **181**, 497 (2008).

プロフィール

藤岡優子 Yuko FUJIOKA
 (公財)微生物化学研究会 微生物化学研究所
 Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN), Tokyo
 〒141-0021 東京都品川区上大崎 3-14-23
 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021,
 Japan
 e-mail: fujioka@bikaken.or.jp
 最終学歴：博士(薬学)
 専門分野：構造生物学
 現在の研究テーマ：オートファジーの構造生物学

野田展生 Nobuo N. Noda
 (公財)微生物化学研究会 微生物化学研究所
 Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN), Tokyo
 〒141-0021 東京都品川区上大崎 3-14-23
 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021,
 Japan
 e-mail: nn@bikaken.or.jp
 最終学歴：博士(薬学)
 専門分野：構造生物学
 現在の研究テーマ：オートファジーの構造生物学
 趣味：オートキャンプ