

出芽酵母のオートファゴソーム形成に関わる Atg タンパク質局在の可視化

Visualization of autophagy-related proteins during autophagosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*

(日本細胞生物学会推薦)

代表研究者 東京大学 鈴木邦律 The University of Tokyo Kuninori SUZUKI

Macroautophagy (autophagy) is a highly conserved cellular recycling process involved in degradation of eukaryotic cellular components. During autophagy, macromolecules and organelles are sequestered into the double-membrane autophagosome and degraded in the vacuole/lysosome. Autophagy-related 8 (Atg8), a core Atg protein essential for autophagosome formation, is a marker of several autophagic structures: the pre-autophagosomal structure (PAS), isolation membrane (IM), and autophagosome. Atg8 is conjugated to a phospholipid phosphatidylethanolamine (PE) through a ubiquitin-like conjugation system to yield Atg8-PE; this reaction is called Atg8 lipidation. Although the mechanisms of Atg8 lipidation have been well studied *in vitro*, the cellular locale of Atg8 lipidation remains enigmatic. Atg3 is an E2-like enzyme that catalyzes the conjugation reaction between Atg8 and PE. Therefore, I hypothesized that the localization of Atg3 would provide insights about the site of the lipidation reaction. To explore this idea, we constructed functional GFP-tagged Atg3 (Atg3-GFP). During autophagy, Atg3-GFP transiently formed a single dot per cell on the vacuolar membrane. This Atg3-GFP dot colocalized with 2×mCherry-tagged Atg8, demonstrating that Atg3 is localized to the IM by fine-localization analysis. The localization of Atg3 suggests that Atg3 plays an important role in autophagosome formation at the IM.

研究目的

真核細胞の中では、細胞周期や環境条件に応じてオルガネラが崩壊し、再構成される現象が頻繁に見られる。真核細胞が栄養飢餓にさらされると、生存維持に必要な栄養分を確保するために細胞質成分を大規模に分解する、オートファジーと呼ばれるシステムが誘導される。オートファジーは分解システムとしての側面に加え、オートファゴソーム(以下 AP)という二重膜オルガネラを新規に生合成するシステムとしての側面を持つ。合成と分解の両方を追うことのできるオルガネラはあまり知られていないが、オートファジーによる被分解物の輸送を担うオルガネラである AP は新規合成から分解までを追跡することのできる数少ないオルガネラである。本研究では、AP の形成メカニズムを解析することを通じて、オルガネラの新規合成時に作動するタンパク質がど

のような分子機構でオルガネラの膜構造を構築していくのかを解明することを目的とする。

AP 形成は、細胞質に出現した小さな袋状の膜が伸展して隔離膜(以下 IM)となり、伸展した IM の末端が閉じることによって被分解物を内包する AP が形成されるという極めてダイナミックなプロセスである。これまでに発芽酵母を用いて AP 形成不能の表現型を指標に ATG (autophagy-related) 遺伝子が同定・解析されてきたが、どの遺伝子を破壊しても AP 形成ができないという表現型が出るのみで Atg タンパク質がどのような作用機序を介して IM を形成しているのかは全く不明であった。

我々は蛍光顕微鏡を用いてオートファジーに関わる構造体を可視化することによってこのような閉塞状況を打ち破ってきた。Atg タンパク質を緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) と融合す

ることにより可視化することで、Atg タンパク質が液胞上の限定された pre-autophagosomal structure (PAS) と呼ばれる領域に集積することで、AP 形成が行われることを明らかにした (Suzuki *et al.* (2001) *EMBO J.*)。また、PAS の遺伝学的階層構造を解析することで、Atg タンパク質の機能が、飢餓シグナルの受容と他のタンパク質の集積に関わる「足場タンパク質」と、足場タンパク質の上で AP 形成に直接関わる「実働タンパク質」に分けられることを示した (Suzuki *et al.* (2007) *Genes Cells*)。実働タンパク質は AP 形成に直接関わっていることから、AP 形成の中間構造体である隔離膜上で働くことが予想された。最近になって、我々は、Atg1 を含めて 8 つの Atg タンパク質が IM 上に局在することを報告した (Suzuki *et al.* (2013) *J. Cell Sci.*)。

動物細胞では、IM が小胞体膜と物理的に接続していることが示されている (Hayashi-Nishino *et al.* (2009) *Nat. Cell Biol.*)。さらに我々は、出芽酵母において隔離膜と小胞体の局在を三次元的に可視化することによって、隔離膜が COPII 小胞形成に関わる機能領域である ER exit site を介して小胞体と接していることを見いだした (Suzuki *et al.* (2013) *J. Cell Sci.*)。これらの事実を組み合わせて考えると、AP 形成時には ER exit site を経由して IM と小胞体膜が接続されているという結論が導き出される。COP II 小胞は小胞体からゴルジ体への物質輸送を担う小胞であることから、小胞体からの小胞輸送が AP 形成に重要であると想像される。では、ER exit site が COP II 小胞形成を介して AP 形成に関わっているのだろうか？ それにしてはこれまでの丹念な電子顕微鏡観察の過程で隔離膜周辺に COP II 小胞らしきものが観察されたことがない。それとも、小胞体膜が ER exit site を介して隔離膜に脂質を供給しているのだろうか？ 我々の研究結果によれば、小胞体に局在するタンパク質は隔離膜に移行しない (Suzuki *et al.* (2013) *J. Cell Sci.*) ことから、後者の可能性を考えた場合、隔離膜と小胞体の接続されている領域には、脂質のみを通過させタンパク質の通過を排除するふり機能具备了脂質の輸送装置が備わっている可能性がある。

このように、隔離膜と小胞体は近接しており、小胞体側には ER exit site が存在する。では、隔離膜が小胞体と接する部位には特定のマーカとなるようなタンパク質はあるのだろうか？ 我々の解析によ

り、Atg2-Atg18 複合体が隔離膜の縁において ER exit site と接していることが明らかとなった (Suzuki *et al.* (2013) *J. Cell Sci.*)。

このように IM と小胞体とが機能的に関連していることが明らかとなってきたが、IM と小胞体との橋渡しをする分子装置の存在は未だ解明されていない。本研究では、局在未知の Atg タンパク質を可視化することで、IM 伸展に関わる分子装置の実体を解明することを目標とした。

研究経過

IM のマーカータンパク質として一般的に使用されるのがユビキチン様タンパク質である Atg8 である。Atg8 は新規に合成されるとプロテアーゼである Atg4 による末端のアルギニン残基の切断を受け、116 番目のグリシンが露出する。この切断を受けた Atg8 を Atg8(G116)と呼ぶ。続いて Atg8(G116)はユビキチン結合系の E1 様酵素である Atg7 によって活性化され、E2 様酵素である Atg3 に渡され、リン脂質ホスファチジルエタノールアミン (以下 PE) と結合し、Atg8-PE となる。Atg8-PE 生成不能株は AP 形成も不能となることから、Atg8-PE は IM 伸展に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、Atg8-PE が AP 形成の過程において、いつどの場所で形成されるのかは全く不明のままであった。本研究ではまず Atg8-PE 生成の最終段階を担う酵素である Atg3 を可視化することにより、AP 形成のメカニズムに新たな知見を得ることを試みた。

我々は、C 末端に GFP を融合したときに活性を保持している一連の Atg タンパク質を可視化してきた (Suzuki *et al.* (2013) *J. Cell Sci.*)。Atg3 は N 末端および C 末端のどちらに GFP を融合しても活性が見られないことから、この論文では記載されていない。しかし、Atg8-PE 化の時空間的制御機構を理解するためには、Atg3 の可視化解析には大きな意義がある。

出芽酵母の Atg3 は結晶解析の報告がなされていることから (Yamada *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.*)、我々はその結晶構造に基づき、酵母 Atg3 に特徴的な α -helix である Handle region 直後の領域に注目し、その部位に GFP を導入することで Atg3 の可視化を試みた。我々は Asp265 と Gly266, Asp269 と Trp270、Asp276 と Ile277 の三カ所に制限酵素サイトを導入し、GFP を挿入した。こうして作製した Atg3-GFP プラスミドを *atg3* 欠損株に導入し、Atg3-GFP の活性を

調べたところ、野生型 Atg3 をプラスミドで導入した場合と比べてほぼ同等な活性が見られた (Ngu *et al.* (2015) *J. Biol. Chem.*)。

続いて Atg3-GFP の局在を観察したところ、オートファジーの誘導に伴って液胞近傍に集積してることが分かった。この局在は PAS に類似していることから、PAS マーカーである Atg8 との共局在を観察した。すると、Atg3-GFP の局在と Atg8 の局在はよく一致することが分かった。

さらに、Atg3 の IM 局在を観察した。我々が開発した手法を用いて IM を可視化したところ、Atg3-GFP は IM に局在していることが明らかとなった。この結果から、Atg3 は IM 上で機能している可能性が示唆された。これらの結果をまとめて論文として報告した (Ngu *et al.* (2015) *J. Biol. Chem.*)。

こうして我々は Atg3 の可視化に成功したが、未だ可視化解析のなされていないタンパク質として Atg4 がある。上述のように Atg4 は Atg8 の C 末端のアルギニンを切断することで Atg8(G116)を形成させる。この反応は Atg8 が PAS に局在するのに必要である (Suzuki *et al.* (2007) *Genes Cells*)。Atg4 は新規合成後の Atg8 を切断するのみならず、Atg8-PE を切断する活性も持っている。以後前者の反応を Atg4 の第一反応、後者の反応を第二反応と呼ぶ。これまでの研究では、Atg4 の第二反応が AP 形成に重要な役割を果たしていることが報告されている (Kirisako *et al.* (2000) *J. Cell Biol.*; Nakatogawa *et al.* (2012) *Autophagy*)。しかしながら、Atg4 の第二反応が関わるステップについては依然不明なままであった。そこで我々は、Atg4 の活性中心に変異を導入することで、Atg4 の第一反応と第二反応が AP 形成にどのように関わっているのかを調べた。

まず、Western blotting により、Atg8-PE の生成を確認し、GFP-Atg8 の局在の結果と突き合わせることで第一反応の役割を調べた。その結果、先行研究と同様に、第一反応は Atg8-PE の生成を介して Atg8 の PAS 局在化に必要であることが分かった。

続いて、Atg8(G116)を発現させることにより第一反応を迂回させた株において変異 Atg4 を発現させた。Atg8-PE が蓄積している株は Atg8-PE の切断活性が低下している株である。Atg8-PE の蓄積を調べたところ、Atg4 変異体の中には第二反応特異的な欠損を示す株の存在が示唆された (未発表データ)。また、GFP-Atg8(G116)の局在を観察したところ、Atg4

の第二反応は PAS 形成以降の IM の伸展に必要であることが示唆された (未発表データ)。現在この Atg4-GFP の可視化を進め、Atg4 の局在情報を得た (未発表データ)。上記の結果と合わせて Atg4 の機能について詳細な解析を進めている。

考察

我々はこれまでオートファジーに関わる構造体の可視化に取り組んできた。そうした解析の過程で、AP の選択的積荷タンパク質を過剰発現することにより、これまで点状にしか確認できなかった AP 形成の中間構造体、IM をカップ状構造として蛍光顕微鏡下に可視化することに成功した (Suzuki *et al.* (2013) *J. Cell Sci.*)。本技術を利用して、Atg タンパク質が IM のどの領域に局在するかを調べることで、それらのタンパク質の作用している部位を明らかにしている。

今回局在を明らかにした Atg3 は Atg8-PE の生成を介して AP 形成に関わるタンパク質である。Atg3 は IM に局在し、AP 形成が完了すると膜から遊離して細胞質に戻される。Atg3 の膜結合に関する情報はほとんどないことから、Atg3 が AP 膜に結合し、再度外れるメカニズムは大きな謎である。Atg4 は IM に結合した Atg8-PE を切断することによって Atg3 の局在制御に関わっている可能性がある。こうした視点からも Atg4 の役割は大変に興味深いものである。今後は Atg3 の局在制御に Atg4 がどのように関わっているのかに注目して Atg3 と Atg4 の機能的関連を解析していく予定である。

参考文献

1. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.*, 151, 263-276 (2000)
2. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.*, 11, 1433-1437 (2009)
3. Nakatogawa H, Ishii J, Asai E, Ohsumi Y. Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote

autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 8, 177-186 (2012)

4. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of *APG* genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.*, 20, 5971-5981 (2001)
5. Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*, 12, 209-218 (2007)
6. Suzuki K, Akioka M, Kondo-Kakuta C, Yamamoto H, Ohsumi Y. Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 126, 2534-2544 (2013)
7. Yamada Y, Suzuki NN, Hanada T, Ichimura Y, Kumeta H, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. The crystal structure of Atg3, an autophagy-related ubiquitin carrier protein (E2) enzyme that mediates Atg8 lipidation. *J. Biol. Chem.*, 282, 8036-8043 (2007)

研究の発表

口頭発表

1. 鈴木邦律・オートファゴソーム積荷タンパク質の網羅的解析・第66回日本細胞生物学会大会・2014年6月11日(水)・東大寺総合文化センター
2. 鈴木邦律・可視化によるオートファゴソーム形成分子機構の解析・第14回日本タンパク質科学会年会・2014年6月25日(水)・ワークピア横浜(招待講演)

誌上発表(下線は報告者、*は責任著者)

1. Ngu M, Hirata E, Suzuki K*. Visualization of Atg3 during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 290, 8146-8153 (2015)
2. Suzuki K*, Nakamura S, Morimoto M, Fujii K, Noda NN, Inagaki F, Ohsumi Y. Proteomic profiling of autophagosome cargo in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 9, e91651 (2014)