

領域融合レビュー, 3, e012 (2014)  
DOI: 10.7875/leading.author.3.e012  
2014年11月7日 公開

## オートファゴソームの形成にかかわるタンパク質の構造と分子機能 Structure and molecular function of autophagosome-forming factors

野田展生<sup>1</sup>・稲垣冬彦<sup>2</sup>

Nobuo N. Noda & Fuyuhiko Inagaki

<sup>1</sup>微生物化学研究会微生物化学研究所 分子構造解析部

<sup>2</sup>北海道大学大学院先端生命科学研究院 次世代ポストゲノム研究センター

### 要約

オートファジーにおける最大のイベントであるオートファゴソームの形成は18種類の主要なAtgタンパク質が担っており、そのうちの5種類が膜の形成の始動にかかわるAtg1複合体を、8種類が膜の伸長において実働部隊として機能するAtg8結合系およびAtg12結合系を構成している。近年、これら主要なAtgタンパク質に関する構造生物学的な研究が飛躍的に進展し、その構造基盤および分子機能の一端が明らかになってきた。このレビューでは、Atg1複合体とAtg8結合系およびAtg12結合系に着目し、これまでの研究により明らかにされた構造基盤および分子機能について最新の知見にもとづき解説するとともに、今後の課題についてふれる。

### はじめに

オートファジーは真核生物に保存された細胞における基本的な分解系であり、老廃物の分解やリサイクルをとおして細胞の恒常性の維持に寄与している<sup>1)</sup>。オートファジーにおけるもっとも特徴的かつ重要なイベントは、二重膜からなる構造体であるオートファゴソームの形成である。オートファジーが誘導されると、突然、細胞質に隔離膜とよばれる膜構造が出現し、それが伸長して閉じることによりオートファゴソームが新生されるが、その過程でタンパク質やオルガネラなどの分解の対象がオートファゴソームの内部に隔離される。つづいて、オートファゴソームはリソソーム（酵母や植物では、液胞）と融合し、内容物は加水分解酵素のはたらきにより一網打尽に分解される。オートファジーを制御するAtgタンパク質はこれまでおもに出芽酵母を用いて同定され、その数は現時点で38種類

に達している<sup>2,3)</sup>。これらのうち主要なAtgタンパク質としてオートファゴソームの形成に関与するものは18種類であり、以下の6つの機能グループ、すなわち、1) Atg1複合体、2) Atg9、3) オートファジー特異的PI3K複合体(PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ)、4) Atg2-Atg18複合体、5) Atg12結合系、6) Atg8結合系、に分類される<sup>3)</sup>(図1)。これら6つの機能グループはPAS(pre-autophagosomal structure, プレオートファゴソーム構造体)に局在し、協働して機能することによりオートファゴソームの形成をひき起こす<sup>4)</sup>。これらの主要なAtgタンパク質および機能グループは進化において広く保存されていることから、オートファゴソームの形成の基本的な分子機構もまた進化において保存されていると考えられる。このレビューでは、オートファゴソームの形成にかかわる主要なAtgタンパク質のうち、近年、構造生物学的な研究がいちじるしく進展したAtg1複合体とAtg8結合系およびAtg12結合系について、その構造と分子機能に関する最新の知見をまとめる。

なお、出芽酵母におけるオートファジーの研究については、荒木保弘・大隅良典、領域融合レビュー, 1, e005, 2012、オートファジーと疾患とのかかわりについては、蔭山俊・小松雅明、領域融合レビュー, 3, e006, 2014を参照されたい。

### 1. Atg1複合体: オートファゴソーム形成の始動装置

オートファジーは飢餓により強く誘導されるが、その際、まずオートファゴソームの形成の場であるPASが構築される<sup>4,5)</sup>。PASはAtgタンパク質が集積して形成される構造体であるが、PASのもっとも中核はAtg1複合体が担うと考えられている<sup>5,6)</sup>。すなわち、Atg1複合体はPASの

構築をととしてオートファゴソーム形成の始動装置として機能する. Atg1 は主要な Atg タンパク質のなかで唯一のキナーゼであり, 飢餓の際に Atg13, Atg17, Atg29, Atg31 と Atg1 複合体を形成する<sup>5,7)</sup>. Atg1 複合体は Atg9 およびオートファジー特異的 PI3K 複合体をリクルートし, さらにこれらが Atg2-Atg18 複合体, Atg8 結合系, Atg12 結合系をリクルートすることにより PAS が完成する<sup>6)</sup>(図 1).

## 2. Atg1 複合体の構成タンパク質の構造

Atg1 は構造的に 3 つの領域, すなわち, N 末端側のキナーゼドメイン, C 末端側の球状のドメイン, そして, 両者をつなぐ天然変性領域に分けられる (図 2a). キナーゼドメインの立体構造は実験的にはまだ決定されていないが, アミノ酸配列の相同性からプロテインキナーゼスーパーファミリーにおいて保存された構造をもつと予想されている. 一方, C 末端側の球状のドメインの構造は, Atg13 の Atg1 結合領域との複合体として X 線結晶解析により決定された<sup>8)</sup> (新着論文レビュー でも掲載). Atg1 の球状

のドメインは 2 つの 3 ヘリックスバンドルがタンデムにつながり, 両者が互いに密接に相互作用することによりひとつの球状構造を形成している. それぞれの 3 ヘリックスバンドルは MIT ドメインと高い構造類似性を示したため, N 末端側から MIT1 および MIT2 と名づけられた<sup>8)</sup>. MIT ドメインは MVB 経路など膜輸送にかかわるタンパク質にしばしばみられるドメインであり, タンパク質どうしをつなぐ結合モジュールとして機能する. 同様に, Atg1 の MIT1 および MIT2 は Atg13 および選択的オートファジーにかかわる Atg11 との結合に関与する<sup>8,9)</sup>. また, Atg1 の MIT1 および MIT2 を含む C 末端側の領域が大きな曲率をもつリポソームと結合することも報告されている<sup>10)</sup>. しかし, その構造には膜の曲率を認識するような構造的な特徴はみられず, 膜との結合の機構に関する詳細は不明である. Atg1 の天然変性領域は約 300 残基からなり, アミノ酸配列から特定の立体構造をとらないことが予測される. Ser に富み, それらのうちいくつかはリン酸化をうけることがわかっているが, その意義は不明である. Atg1 の天然変性領域には Atg8 結合モチーフが含まれ, これを介して Atg8 と直接的に結合する<sup>11,12)</sup>. Atg8 結合モチーフを介した Atg1 と Atg8 とのあいだの相互作用は両者の PAS への局在には不要であるが, Atg1 が隔離膜に局在するために必要である. Atg1 の隔離膜への局在は効率的なオートファジーに必要であることがわかっているが, Atg1 が隔離膜において担う具体的な分子機能についてはわかっていない.

Atg13 は構造的に 2 つの領域, すなわち, N 末端側の球状のドメインと C 末端側の天然変性領域とに分けられる (図 2b). Atg13 の球状ドメインの構造は X 線結晶解析により決定された<sup>13)</sup>. 骨格の部分は 5 本のストランドからなる  $\beta$  シートとその片面にならんだ 4 本の  $\alpha$  ヘリックスからなり, その C 末端側に 3 本のストランドからなる  $\beta$  シートが付加された構造をとる. 骨格の部分の構造は HORMA ドメインと同じトポロジーをもつことから, Atg13 の球状のドメインは HORMA と命名された<sup>13)</sup>. Atg13 の HORMA はオートファジー特異的 PI3K 複合体が PAS に局在するため必要であるが, 両者のあいだの直接的な結合は確認されていない<sup>13)</sup>. HORMA ドメインをもつ Mad2 の構造生物学的な研究により, Mad2 は開いた構造と閉じた構造の 2 つの主要なコンホメーションの平衡状態にあり, リガンドの結合によりその平衡が閉じた構造へとかたよることがわかっている<sup>14)</sup>. Atg13 の HORMA の結晶構造は閉じた構造に類似した構造をとるが, これまで, 開いた構造に類似した構造は報告されていない. Atg13 の HORMA が同様の構造変化を示すのか, また, 直接の結合相手が何であるのかは, 今後, 明らかにしなければならない課題である. Atg13 の HORMA 以外の約 470 残基は天然変性領域であると予測されている. Atg13 の天然変性領域は Ser および Thr に富み, それらの多くがリ

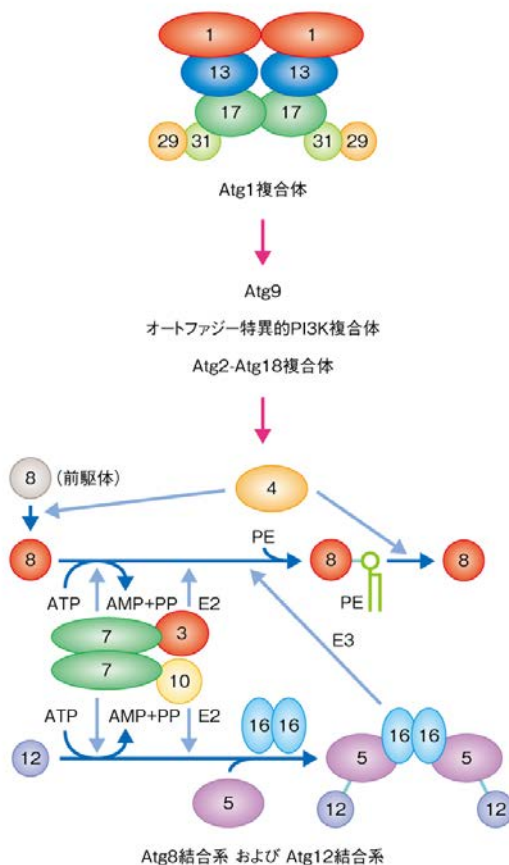


図 1 オートファゴソームの形成にかかわる主要な Atg タンパク質

数字は Atg タンパク質の番号を示す. E1: ユビキチン活性化酵素様の酵素, E2: ユビキチン結合酵素様の酵素, E3: ユビキチン転移酵素様の酵素, PE: ホスファチジルエタノールアミン.

ン酸化をうけることがわかっている<sup>8)</sup>。また、天然変性領域の約 60 残基の領域を用いて Atg1 と、13 残基からなる短い領域を用いて Atg17 と、直接に結合する<sup>8)</sup>。

Atg17, Atg29, Atg31 は栄養条件にかかわらず恒常的に安定な複合体を形成し、*in vitro*において 2 分子ずつのストイキオメトリーであることが示されている<sup>15)</sup>。

Atg17-Atg29-Atg31 複合体の構造は X 線結晶解析および電子顕微鏡を用いた単粒子解析により決定された<sup>9,10,16)</sup>

(図 2c)。Atg17 のプロトマーは 4 本の  $\alpha$  ヘリックスからなる特徴的な三日月状の構造をとり、C 末端側でホモ二量体化することにより全体として S 字状の構造をとる。Atg31 は 8 本のストランドからなる  $\beta$  サンドイッチ構造をもつが、そのうちの 1 本は Atg29 に由来することから、Atg31 がその立体構造を保持するには Atg29 が必須と考えられる。 $\beta$  サンドイッチ構造にくわえ、Atg31 は C 末端に 1 本の  $\alpha$  ヘリックスをもち、それを介して Atg17 の 3 本の  $\alpha$  ヘリックスと 4 ヘリックスバンドルを形成することにより Atg17 の凹面に強固に結合する。Atg29 は N 末端側に Atg31 の  $\beta$  サンドイッチに組み込まれるストランド、つづいて、3 ヘリックスバンドル構造をもち、さらに、C 末端側には天然変性領域をもつ。Atg29 の天然変性領域もまた Ser および Thr に富み、それらのうちいくつかは飢餓に依存してリン酸化される<sup>9)</sup>。Atg29 の天然変性領域はオートファジーの活性には不要であり、むしろ、オートファジーを抑制する活性をもつ<sup>9)</sup>。天然変性領域のリン酸化により Atg29 の阻害効果が解除されオートファジーが促進されるというモデルが提示されているが<sup>9)</sup>、その分子機構の詳細は不明である。また、Atg29 の天然変性領域は Atg11 と直接的に結合するが<sup>9)</sup>、今後、その意義についても明らかにしていく必要がある。

### 3. Atg13 を介した Atg1 複合体の構築の基盤

Atg13 の天然変性領域のうち、Atg1 および Atg17 との結合に必要な十分な短い領域をそれぞれ用いることにより、Atg1-Atg13 複合体および Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造が決定された<sup>8)</sup> (図 3 a,b)。Atg13 の Atg1 結合領域は天然変性領域に存在し、Atg1 の非存在下においては特定の立体構造をもたない<sup>8)</sup>。Atg1 との結合に際し、Atg1 結合領域はヘリクス-ループ-ヘリクス構造をとり、N 末端側のヘリクスを用いて Atg1 の MIT2 と、C 末端側のヘリクスを用いて Atg1 の MIT1 と結合する (図 3a)。これらの相互作用は一般的な MIT ドメインと MIT 結合モチーフ (MIT-interacting motif: MIM) とのあいだにみられる相互作用と類似していたことから、N 末端側のヘリクス領域は MIM(N)、C 末端側のヘリクス領域は MIM(C) と命名された<sup>8)</sup>。Atg1 と Atg13 とのあいだの親和性はおもに MIM(N) と MIT2 とのあいだの相互作用が担い、MIM(C) と MIT1 とのあいだの相互作用はそれを補強する役割を担う。Atg13 の Atg17 結合領域は

天然変性領域の 13 残基にまでしばられており、この短い領域を介して Atg17 の N 末端の付近にある溝と結合する

(図 3b)。疎水的な相互作用にくわえ、Atg13 の Ser428 および Ser429 が Atg17 の Asp247 と水素結合を形成しており (以下、残基番号は基本的に発芽酵母の場合)、これらの水素結合は Atg13 と Atg17 とのあいだの相互作用に必須である<sup>8)</sup>。

### 4. Atg13 の飢餓に依存的な脱リン酸化を介した Atg1 複合体の形成の機構

オートファジーは飢餓により強く誘導されるが、その制御には栄養センサーである TOR 複合体 1 が関わっている<sup>17)</sup>。富栄養条件において、TOR 複合体 1 は Atg13 の天然変性領域に含まれる多数の Ser および Thr を直接的にリン酸化する<sup>18)</sup>。リン酸化される Ser は Atg1 との結合にもっとも重要な MIM(N) には含まれず、相互作用を補強する役割をもつ MIM(C) に複数が存在し、その結果、リン酸化は Atg1 と Atg13 とのあいだの親和性のある程度まで減弱させる<sup>8)</sup>。一方、Atg13 の Atg17 結合領域には、リン酸化をうける Ser として Atg17 の Asp247 との水素結合にかかわる Ser428 および Ser429 が含まれる。これらがリン酸化をうけることにより水素結合が破壊され、さらに負電荷の反発も生じることにより、Atg13 と Atg17 との結合は完全に失われる<sup>8)</sup>。飢餓になると TOR 複合体 1 の活性が低下することにより Atg13 はすみやかに脱リン

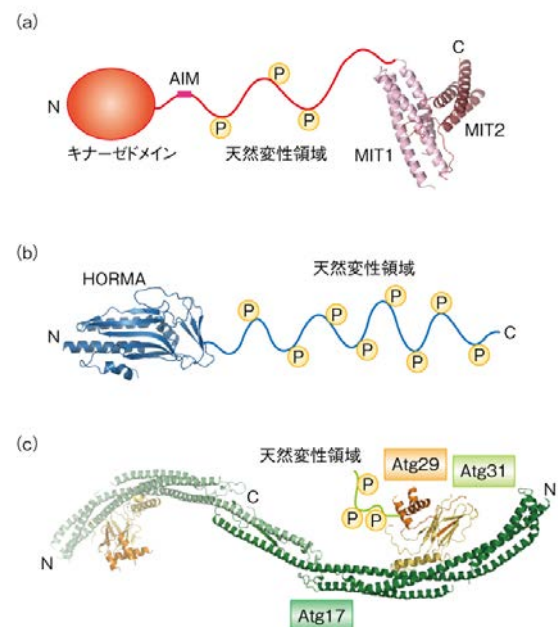


図 2 Atg1 複合体を構成するタンパク質の構造

(a) Atg1 の構造 (PDB ID : 4P1N)。AIM : Atg8 結合モチーフ。

(b) Atg13 の構造 (PDB ID : 4J2G)。

(c) Atg17-Atg29-Atg31 複合体の構造 (PDB ID : 4P1W)。

P はリン酸化をうける部位を示す。





Atg8 結合モチーフに対する特異的な認識能をあたえている。膜の凝集能の詳細な分子機構はまだわかっていないが、異なる膜に存在する Atg8-ホスファチジルエタノールアミン結合体どうしが相互作用することにより膜がつなぎとめられるというモデルが提示されている<sup>29)</sup>。Atg8 結合モチーフに対する特異的な認識能は、特徴的な  $\alpha$  ヘリックスとユビキチン骨格とのあいだに形成された疎水性のポケットである W 部位、ユビキチン骨格に形成された疎水性のポケットである L 部位、2 番目の  $\beta$  ストランドにより担われており、Atg8 結合モチーフの典型的な配列である Trp-X-X-Leu 配列 (X は任意のアミノ酸残基) の Trp を W 部位において、Leu を L 部位において、また、主鎖を 2 番目の  $\beta$  ストランドが分子間  $\beta$  シートを形成することにより認識する<sup>27,30,31)</sup> (図 4a)。Atg8 結合モチーフの典型的な配列のうち、Trp は Tyr あるいは Phe, Leu は Ile あるいは Val にも代えられることがわかっている。Atg8 結合モチーフは哺乳類のオートファジー関連タンパク質においても多く見出されており、それらは LC3 結合領域とよばれている<sup>27,32)</sup>。Atg8 結合モチーフあるいは LC3 結合領域は選択的オートファジーにおいて基質の認識を担う多くの受容体に見出されており、Atg8-ホスファチジルエタノールアミン結合体は基質の認識における膜での足場として機能する<sup>27)</sup>。一方、Atg12 については Atg8 と比べその機能の解明は遅れている。Atg12 において、ユビキチン骨格の構造は保存されているが<sup>33)</sup>、その N 末端側には種によりさまざまな長さの配列が付加され、その役割はわかっていない。唯一、示唆されている機能はユビキチン結合酵素様の酵素 Atg3 の認識であり、Atg12-Atg5-Atg16 複合体がユビキチン転移酵素様の酵素として機能するためにはたらくと考えられている<sup>34)</sup>。哺乳類の Atg12 は Atg3 に含まれる特定の配列をユビキチン骨格により認識するが<sup>35)</sup> (図 4b)、この相互作用は酵母においては保存されておらず、さらなる解析が必要である。

## 7. 脱結合酵素 Atg4 の構造と活性の発現の機構

Atg4 および Atg4-Atg8 複合体の構造生物学的な研究は、哺乳類の Atg4 オートソログである Atg4B および Atg8 オートソログである LC3 を用いて行われた<sup>36-38)</sup>。Atg4 は翻訳ののちの Atg8 のプロセッシングと Atg8-ホスファチジルエタノールアミン結合体の脱結合の両方を担うシステインプロテアーゼであり、パパインと類似した構造をもつ。単体の Atg4 は活性部位を制御ループ、Trp (ヒトの Atg4B の場合、Trp142)、N 末端テイルにより自己阻害する構造をとる。Atg8 が結合するとそれらに大規模な構造変化が起こり、Atg8 の C 末端の Gly は Atg4 の活性 Cys の近傍に結合する (図 5)。Atg8 ファミリーは C 末端に芳香族アミノ酸残基-Gly 配列を保存しており、この配列が Atg4 の自己阻害の構造を解除するために必要である<sup>36)</sup>。すなわち、自己阻害の構造は Atg4 の基質特異性を担保する機構のひとつと考えられる。Atg4 はオートファゴソームの形成に機能している Atg8-ホスファチジルエタノールアミン結合体は切断しないことが示唆されているが、その活性の制御機構についてはわかっていない。

## 8. ユビキチン様の結合反応系をつかさどる酵素の構造

Atg8 および Atg12 に共通するユビキチン活性化酵素様の酵素 Atg7 は、ATP のエネルギーを使うことにより両者の C 末端の Gly を活性化し、それらと Atg7 自体の活性 Cys とのあいだでチオエステル結合を形成したのち、Atg8 とそのユビキチン結合酵素様の酵素である Atg3、あるいは、Atg12 とそのユビキチン結合酵素様の酵素である Atg10 とのあいだにチオエステル結合を形成する反応を担う。Atg7 は 2 つの球状ドメインである N 末端ドメインおよび C 末端ドメインが短いリンカーでつながれた構造をもつ<sup>39-41)</sup>。C 末端ドメインはさらにアデニル化ドメインおよび最 C 末端ドメインに分けられ、アデニル化ドメインを介してホモ二量体を形成する (図 6a)。したがって、

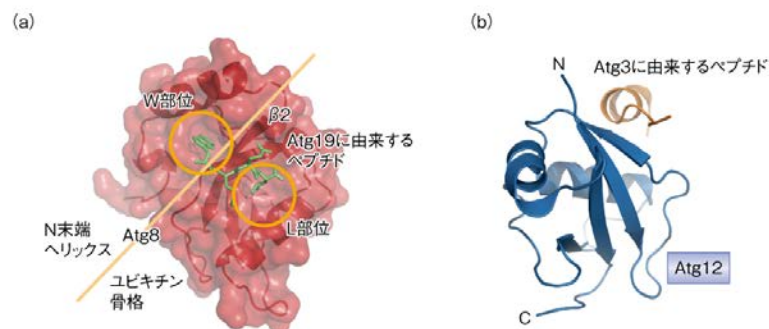


図 4 Atg8 および Atg12 の構造

(a) Atg8 と Atg19 に由来する Atg8 結合モチーフとの複合体の構造 (PDB ID : 2ZPN)。オレンジ色の線の左上側が N 末端側に特徴的な 2 つの  $\alpha$  ヘリックス、右下側がユビキチン骨格に相当する。 $\beta 2$  : 2 番目の  $\beta$  ストランド。

(b) ヒトの Atg12 と Atg3 に由来するペプチドとの複合体の構造 (PDB ID : 4NAW)。

Atg7はすべてのドメインおよび活性部位を2つずつもつ。一般的なユビキチン活性化酵素はホモ二量体を形成せず、活性部位や同一のドメインは1つずつしか保持しないこととは対照的である。アデニル化ドメインはすべてのユビキチン活性化酵素において保存されているのに対し、N末端ドメインおよび最C末端ドメインはAtg7に固有のドメインである。一方、一般的なユビキチン活性化酵素に保存された活性Cysドメインおよびユビキチン様ドメインはAtg7には存在しない。Atg7の活性Cysはアデニル化ドメインに挿入されたループに存在する。

Atg8のユビキチン結合酵素様の酵素であるAtg3およびAtg12のユビキチン結合酵素様の酵素であるAtg10は、互いに類似したユビキチン結合酵素のコア構造をもち、一般的なユビキチン結合酵素とはやや異なりC末端側の $\alpha$ ヘリックス2つを欠いている<sup>42-44</sup> (図6b,c)。それにくわえ、Atg10はコア構造から飛び出した特徴的な $\beta$ ヘアピン構造をもち、それを用いてAtg12の結合相手であるAtg5を直接的に認識する<sup>43</sup> (図6b)。一方、Atg3は2つのユニークな挿入領域であるハンドル領域およびフレキシブル領域をもつ<sup>42</sup> (図6c)。ハンドル領域はコア構造から飛び出した1本の長い $\alpha$ ヘリックスおよびループ領域からなり、ループ領域にあるAtg8結合モチーフによりAtg8と直接的に結合する<sup>45</sup>。フレキシブル領域は約80アミノ酸残基からなり、そのほとんどが天然変性状態をとるが、唯一、短い $\alpha$ ヘリックスをとる領域がAtg7のN末端ドメ

インと結合する<sup>40,42</sup>。Atg3のN末端の約20残基は結晶において電子密度が観測されなかったが、アミノ酸配列から両親媒性ヘリックス構造をとることが予測されており、曲率の大きな膜の認識に関与することが報告されている<sup>46,47</sup>。

Atg8のユビキチン転移酵素様の酵素であるAtg12-Atg5-Atg16複合体は、Atg16がホモ二量体を形成することによりおのおののタンパク質を2つずつ含む構造をとる<sup>48</sup>。Atg5は2つのユビキチン様ドメインとLys149を含むヘリックスに富むドメインからなり、これら3つのドメインが互いに相互作用することにより1つの球状の構造をとる<sup>49</sup> (図6b,d)。Atg16は平行するホモ二量体を形成するコイルドコイルドメインと、Atg5との結合にかかわる $\alpha$ ヘリックスとが、フレキシブルなリンカーによりつながれた構造をとる<sup>48</sup> (図6d)。Atg12はさきに述べたとおりユビキチン骨格からなり、Atg5とイソペプチド結合によりつながれた構造においては、非共有結合性の相互作用も形成することによりAtg5の骨格に固定される<sup>50,51</sup> (図4b, 図6d)。その結果、Atg12-Atg5-Atg16複合体の全体構造は6つのユビキチン様ドメインがコイルドコイル二量体の一端に集まった構造となり、ほかのユビキチン転移酵素の構造とはいじりしく異なる (図6d)。

## 9. Atg タンパク質の結合反応の分子機構

まず、Atg7が最C末端ドメインにあるフレキシブルな

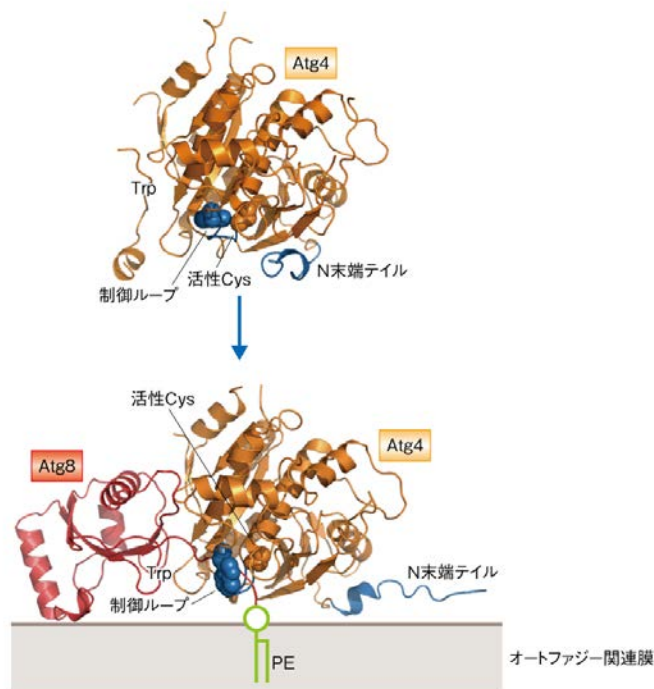


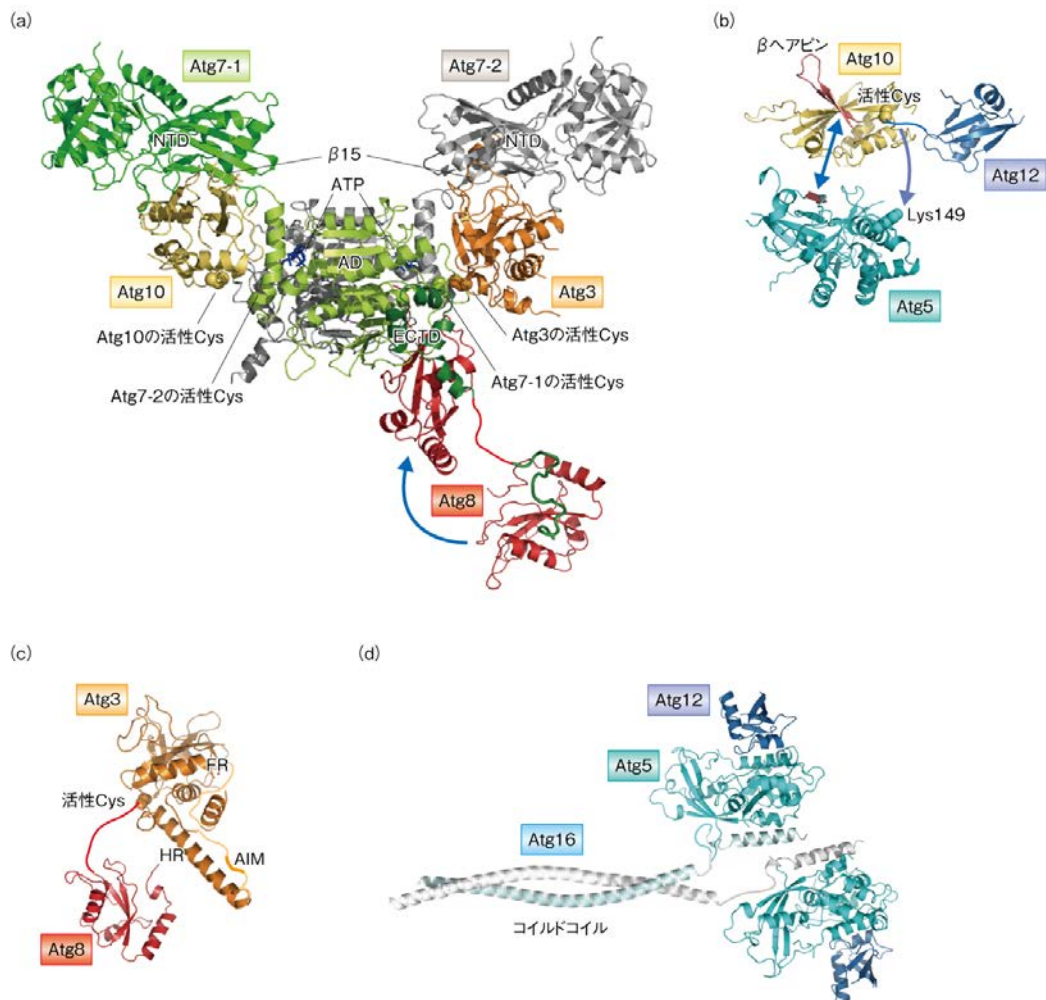
図5 Atg4の構造とAtg8の認識のモデル

上はAtg4単体の構造 (PDB ID: 2CY7), 下はAtg8との複合体の構造 (PDB ID: 2ZZP)。複合体の形成により構造変化を生じるAtg4の領域を青色で、Atg4の活性Cys側鎖を球状モデルで示す。オートファジー関連膜としては、隔離膜やその前駆体となる膜、オートファゴソーム膜などが含まれる。PE: ホスファチジルエタノールアミン。



領域で Atg8 を補足したのち, Atg8 をアデニル化ドメインへと配置換えする<sup>41)</sup> (図 6a, 図 7). つぎに, Atg8 の C 末端の Gly が Atg7 に結合した ATP と反応することでアデニル化され, つづいて, Atg7 の活性 Cys が Atg8 の C 末端の Gly とチオエステル結合を形成する. この過程において, 活性 Cys を含むループ領域が構造変化を起こすことが予想されるが, ほかのユビキチン活性化酵素においてみられるようなドメインどうしの大規模な配置転換は必要としない. Atg7 は Atg12 も類似の様式で認識し活性化すると思われるが, Atg7-Atg12 複合体の構造的な研究はこれまでなされていない. Atg7 とチオエステル結合を形成した Atg8 および Atg12 は, つづいて, それぞれのユビキチン結合酵素様の酵素である Atg3 および Atg10

とチオエステル結合を形成する. この際, どちらのユビキチン結合酵素様の酵素も Atg7 の N 末端ドメインの 15 番目の  $\beta$  ストランドの付近に類似の様式で結合するが (図 6a), ユビキチン様ドメインを用いる一般的なユビキチン活性化酵素とユビキチン結合酵素とのあいだの相互作用とはまったく異なる<sup>52,53)</sup>. Atg7 はホモ二量体を形成するため, 2 分子のユビキチン結合酵素様の酵素が結合することが可能である. したがって, Atg7 の活性 Cys によりつながれた Atg8 および Atg12 は, 同じ Atg7 分子に結合したユビキチン結合酵素様の酵素と, ホモ二量体を形成したもう 1 分子の Atg7 に結合したユビキチン結合酵素様の酵素の, どちらの活性 Cys にも転移される可能性があるが, 実際には, 後者のみ選択的に転移される<sup>40,41)</sup>. Atg7-1



**図 6 Atg タンパク質の結合反応の構造基盤**

(a) Atg7 の構造と Atg8 およびユビキチン結合酵素様の酵素の認識の基盤 (PDB ID : 4GSL, 4GSK, 3VH4, 2LI5). ATP をスティックモデルで, 活性 Cys 側鎖を球状モデルで示す. NTD : N 末端ドメイン, AD : アデニル化ドメイン, ECTD : 最 C 末端ドメイン,  $\beta$  15 : 15 番目の  $\beta$  ストランド.

(b) Atg10 の構造と Atg5 の認識の機構 (PDB ID : 2LPU, 2DYO). 活性 Cys 側鎖を球状モデルで示す.

(c) Atg3 の構造 (PDB ID : 2DYT). 活性 Cys 側鎖を球状モデルで示す. HR : ハンドル領域, FR : フレキシブル領域.

(d) Atg12-Atg5-Atg16 複合体の構造 (PDB ID : 3W1S, 3A7P).

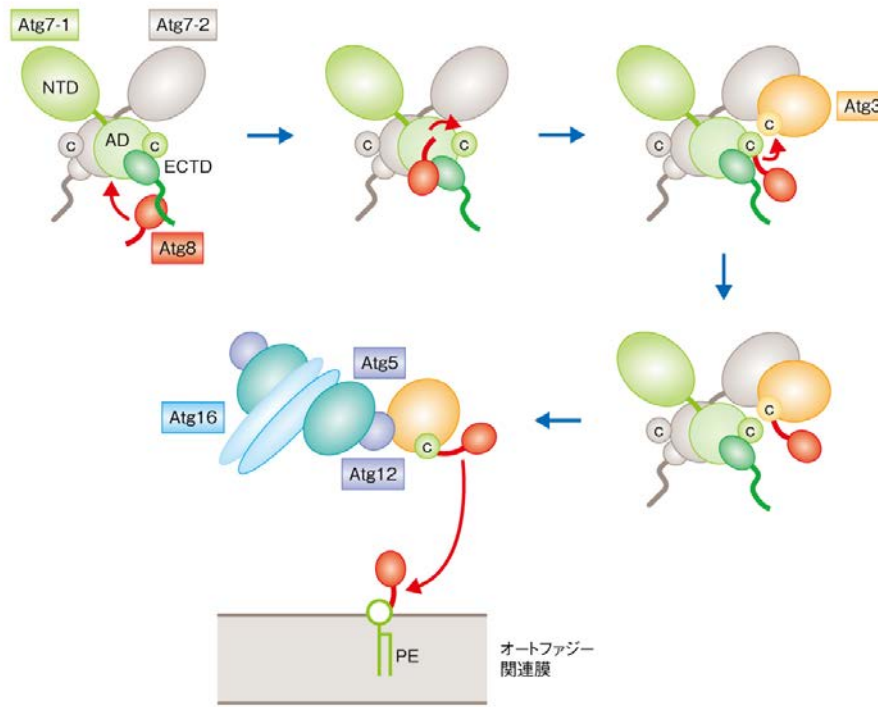


図7 Atg8-ホスファチジルエタノールアミン結合体の形成反応のモデル

Cは活性 Cys を示す。オートファジー関連膜としては、隔離膜やその前駆体となる膜、オートファゴソーム膜などが含まれる。

NTD: N 末端ドメイン, AD: アデニル化ドメイン, ECTD: 最 C 末端ドメイン, PE: ホスファチジルエタノールアミン。

の活性 Cys につながれた Atg8 は, Atg7-2 に結合した Atg3 へと転移される (図 6a, 図 7)。これは, ほかのユビキチン活性化酵素にはみられない Atg7 に固有の機構であり, Atg7 がホモ二量体を形成する理由のひとつと考えられる。生体においては, Atg8 は Atg3 のみと, Atg12 は Atg10 のみとチオエステル結合を形成すると考えられているが, *in vitro* では, Atg3 は Atg12 と, Atg10 は Atg8 ともチオエステル結合を形成する<sup>52)</sup>。この特異性の問題は, 今後, 明らかにしなければならない課題である。

Atg10 とチオエステル結合を形成した Atg12 は, 最後に, Atg5 の Lys149 と結合する。Atg10 は固有の  $\beta$ -ヘアピン構造を用いて Atg5 のユビキチン様ドメインにある  $\beta$  ストランドと相互作用することにより, ユビキチン転移酵素様の酵素の助けなしに結合反応を担うと考えられる<sup>43)</sup>

(図 6b)。一方, Atg3 とチオエステル結合を形成した Atg8 は, ユビキチン転移酵素様の酵素である Atg12-Atg5-Atg16 複合体の助けを借りることによりホスファチジルエタノールアミンと結合する (図 7)。Atg3 の活性部位の構造は単独では低活性の状態であり, Atg12-Atg5-Atg16 複合体と相互作用することにより高活性の状態に変換されることが生化学的手法により強く示唆されている<sup>54)</sup>。また, Atg12-Atg5-Atg16 複合体は Atg3 を適切な膜へとリクルートすることにより, Atg8 の結合相手であるホスファチジルエタノールアミンと Atg8 とを会わせる機能も担うと考えられている<sup>34)</sup>。しかし, これらの分子機構に関する理解は不十分であり, 全容の解

明のためにはさらなる構造生物学的な研究が必須である。

## おわりに

オートファゴソームの形成にかかわる主要な Atg タンパク質のうち, Atg1 複合体と Atg8 結合系および Atg12 結合系については, 近年, 構造生物学的な研究が急速に進展し, これらがはたす分子機能についてその一端が明らかにされた。しかしながら, たとえば, Atg17 のとる S 字状の構造は何をしているのかなど, 構造がわかることによりさらなる謎もつぎつぎと生じている。また, Atg1 複合体と Atg8 結合系および Atg12 結合系とを橋渡しする Atg タンパク質の構造生物学的な研究はほとんど進展していないのが現状である。構造生物学的な研究と構造情報を活用した機能の研究を並行して進めることが, オートファジーにおける謎をひとつひとつ解明していくためにきわめて重要である。

## 文献

- 1) Mizushima, N. & Komatsu, M.: Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147, 728-741 (2011)
- 2) Araki, Y., Ku, W. C., Akioka, M. et al.: Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J. Cell Biol.*, 203, 299-313 (2013)



- 3) Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y.: The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27, 107-132 (2011)
- 4) Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y. et al.: The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of *APG* genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.*, 20, 5971-5981 (2001)
- 5) Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y. et al.: Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell*, 19, 2039-2050 (2008)
- 6) Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T. et al.: Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*, 12, 209-218 (2007)
- 7) Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T. et al.: Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.*, 150, 1507-1513 (2000)
- 8) Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Yamamoto, H. et al.: Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 21, 513-521 (2014) [新着論文レビュー]
- 9) Mao, K., Chew, L. H., Inoue-Aono, Y. et al.: Atg29 phosphorylation regulates coordination of the Atg17-Atg31-Atg29 complex with the Atg11 scaffold during autophagy initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, E2875-E2884 (2013)
- 10) Ragusa, M. J., Stanley, R. E. & Hurley, J. H.: Architecture of the Atg17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis. *Cell*, 151, 1501-1512 (2012)
- 11) Kraft, C., Kijanska, M., Kalie, E. et al.: Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO J.*, 31, 3691-3703 (2012)
- 12) Nakatogawa, H., Ohbayashi, S., Sakoh-Nakatogawa, M. et al.: The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation. *J. Biol. Chem.*, 287, 28503-28507 (2012)
- 13) Jao, C. C., Ragusa, M. J., Stanley, R. E. et al.: A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 5486-5491 (2013)
- 14) Luo, X. & Yu, H.: Protein metamorphosis: the two-state behavior of Mad2. *Structure*, 16, 1616-1625 (2008)
- 15) Kabeya, Y., Noda, N. N., Fujioka, Y. et al.: Characterization of the Atg17-Atg29-Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389, 612-615 (2009)
- 16) Chew, L. H., Setiawati, D., Klionsky, D. J. et al.: Structural characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* autophagy regulatory complex Atg17-Atg31-Atg29. *Autophagy*, 9, 1467-1474 (2013)
- 17) Noda, T. & Ohsumi, Y.: Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, 273, 3963-3966 (1998)
- 18) Kamada, Y., Yoshino, K., Kondo, C. et al.: Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol. Cell Biol.*, 30, 1049-1058 (2010)
- 19) Lynch-Day, M. A. & Klionsky, D. J.: The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett.*, 584, 1359-1366 (2010)
- 20) Ohsumi, Y.: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 211-216 (2001)
- 21) Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T. et al.: A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-398 (1998)
- 22) Mizushima, N., Noda, T. & Ohsumi, Y.: Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.*, 18, 3888-3896 (1999)
- 23) Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T. et al.: A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408, 488-492 (2000)
- 24) Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H. et al.: 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)
- 25) Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y. et al.: The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.*, 282, 37298-37302 (2007)
- 26) Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C. et al.: Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 126, 2534-2544 (2013)
- 27) Noda, N. N., Ohsumi, Y. & Inagaki, F.: Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett.*, 584, 1379-1385 (2010)
- 28) Sugawara, K., Suzuki, N. N., Fujioka, Y. et al.: The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells*, 9, 611-618

(2004)

- 29) Nakatogawa, H., Ichimura, Y. & Ohsumi, Y.: Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 130, 165-178 (2007)
- 30) Noda, N. N., Kumeta, H., Nakatogawa, H. et al.: Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells*, 13, 1211-1218 (2008)
- 31) Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y. S. et al.: Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem.*, 283, 22847-22857 (2008)
- 32) Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T. et al.: p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.*, 282, 24131-24145 (2007)
- 33) Suzuki, N. N., Yoshimoto, K., Fujioka, Y. et al.: The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy*, 1, 119-126 (2005)
- 34) Fujita, N., Itoh, T., Omori, H. et al.: The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell*, 19, 2092-2100 (2008)
- 35) Metlagel, Z., Otomo, C., Takaesu, G. et al.: Structural basis of ATG3 recognition by the autophagic ubiquitin-like protein ATG12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 18844-18849 (2013)
- 36) Satoo, K., Noda, N. N., Kumeta, H. et al.: The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO J.*, 28, 1341-1350 (2009)
- 37) Kumanomidou, T., Mizushima, T., Komatsu, M. et al.: The crystal structure of human Atg4b, a processing and de-conjugating enzyme for autophagosome-forming modifiers. *J. Mol. Biol.*, 355, 612-618 (2006)
- 38) Sugawara, K., Suzuki, N. N., Fujioka, Y. et al.: Structural basis for the specificity and catalysis of human Atg4B responsible for mammalian autophagy. *J. Biol. Chem.*, 280, 40058-40065 (2005)
- 39) Hong, S. B., Kim, B. W., Lee, K. E. et al.: Insights into noncanonical E1 enzyme activation from the structure of autophagic E1 Atg7 with Atg8. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 1323-1330 (2011)
- 40) Taherhoy, A. M., Tait, S. W., Kaiser, S. E. et al.: Atg8 transfer from Atg7 to Atg3: a distinctive E1-E2 architecture and mechanism in the autophagy pathway. *Mol. Cell*, 44, 451-461 (2011)
- 41) Noda, N. N., Satoo, K., Fujioka, Y. et al.: Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. *Mol. Cell*, 44, 462-475 (2011) [新着論文レビュー]
- 42) Yamada, Y., Suzuki, N. N., Hanada, T. et al.: The crystal structure of Atg3, an autophagy-related ubiquitin carrier protein (E2) enzyme that mediates Atg8 lipidation. *J. Biol. Chem.*, 282, 8036-8043 (2007)
- 43) Yamaguchi, M., Noda, N. N., Yamamoto, H. et al.: Structural insights into Atg10-mediated formation of the autophagy-essential Atg12-Atg5 conjugate. *Structure*, 20, 1244-1254 (2012)
- 44) Hong, S. B., Kim, B. W., Kim, J. H. et al.: Structure of the autophagic E2 enzyme Atg10. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 68, 1409-1417 (2012)
- 45) Yamaguchi, M., Noda, N. N., Nakatogawa, H. et al.: Autophagy-related protein 8 (Atg8) family interacting motif in Atg3 mediates the Atg3-Atg8 interaction and is crucial for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *J. Biol. Chem.*, 285, 29599-29607 (2010)
- 46) Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V. et al.: Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat. Cell Biol.*, 16, 415-424 (2014)
- 47) Hanada, T., Satomi, Y., Takao, T. et al.: The amino-terminal region of Atg3 is essential for association with phosphatidylethanolamine in Atg8 lipidation. *FEBS Lett.*, 583, 1078-1083 (2009)
- 48) Fujioka, Y., Noda, N. N., Nakatogawa, H. et al.: Dimeric coiled-coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and its functional significance in autophagy. *J. Biol. Chem.*, 285, 1508-1515 (2010)
- 49) Matsushita, M., Suzuki, N. N., Obara, K. et al.: Structure of Atg5·Atg16, a complex essential for autophagy. *J. Biol. Chem.*, 282, 6763-6772 (2007)
- 50) Noda, N. N., Fujioka, Y., Hanada, T. et al.: Structure of the Atg12-Atg5 conjugate reveals a platform for stimulating Atg8-PE conjugation. *EMBO Rep.*, 14, 206-211 (2013)
- 51) Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G. et al.: Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20, 59-66 (2013)
- 52) Yamaguchi, M., Matoba, K., Sawada, R. et al.: Noncanonical recognition and UBL loading of distinct E2s by autophagy-essential Atg7. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 1250-1256 (2012) [新着論文レビュー]
- 53) Kaiser, S. E., Mao, K., Taherhoy, A. M. et al.: Noncanonical E2 recruitment by the autophagy E1 revealed by Atg7-Atg3 and Atg7-Atg10 structures. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 1242-1249 (2012)

54) Sakoh-Nakatogawa, M., Matoba, K., Asai, E. et al.: Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. Nat. Struct. Mol. Biol., 20, 433-439 (2013) [新着論文レビュー]

## 著者プロフィール

**野田 展生** (Nobuo N. Noda)

**略歴**: 2001年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程 修了, 同年 北海道大学大学院薬学研究科 博士研究員, 同 助

教, 同講師を経て, 2011年より微生物化学研究会微生物化学研究所 主席研究員.

**研究テーマ**: オートファジーの分子機構.

**関心事**: オートキャンブ.

**稲垣 冬彦** (Fuyuhiko Inagaki)

北海道大学大学院先端生命科学研究院 特任教授.

**研究テーマ**: 核磁気共鳴, 構造生物学, シグナル伝達, オートファジー.

© 2014 野田展生・稲垣冬彦 Licensed under a Creative Commons 表示 2.1 日本 License