

氏 名 大岡 杏子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1253 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 **Studies on the ubiquitin-like conjugation reaction of
Atg8 required for autophagosome formation**

論文審査委員 主 査 教授 西村 幹夫
教授 大隅 良典
教授 野田 昌晴
教授 諸橋 憲一郎（九州大学）

論文内容の要旨

Autophagy is a major self-degradative process in eukaryotic cells that plays fundamental roles in cellular and organismal homeostasis, and is involved in many physiological and pathological situations. When autophagy is induced, cytoplasmic materials and organelles are sequestered into newly emerging double-membrane vesicles called autophagosomes, and delivered to the lysosome or the vacuole for degradation.

In the past decade, many ATG (autophagy-related) genes have been identified by genetic approaches using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Atg8, a ubiquitin-like protein (Ubl), is one of the proteins essential for autophagosome formation. The cysteine protease Atg4 first removes the C-terminal arginine of Atg8 to expose the glycine as the new terminus. This glycine forms a thioester bond with Atg7, an activating enzyme (E1), and transfers to and also forms a thioester bond with Atg3, a conjugation enzyme (E2). Atg8 is eventually conjugated to the amino group in the hydrophilic head of phosphatidylethanolamine (PE). Atg8 is anchored to isolation membrane and autophagosomal membranes probably as this lipid-modified form, and thought to directly participate in the formation of these membranes. Atg4 also catalyzes the deconjugation of Atg8-PE after it has fulfilled its role in autophagosome formation, thus Atg8 is reused. Because the details of this sequential reaction of Atg8 lipidation are unclear, I focus on the mechanism of Atg8 lipidation, in this study.

The Atg8 conjugation system was reconstituted using purified proteins expressed in *Escherichia coli* and PE-containing liposomes in vitro. First, I successfully capture authentic thioester intermediates, Atg8-Atg7 and Atg8-Atg3, which can not have been detected because of their lability. This allows me to analyze the sequential reaction of Atg8 lipidation.

It was shown that Atg8 could be conjugated with phosphatidylserine (PS) as efficiently as PE in vitro. However, PE was identified as the sole lipid conjugated to the C-terminal glycine of Atg8 in vivo. It suggests that there exists a mechanism that directs Atg8 conjugation preferentially to PE in the cell. In this study, I show that, in contrast to PE conjugation, the PS conjugation of Atg8 is markedly suppressed at physiological (neutral) pH. Then, I show that both of the Atg8-Atg7 and the Atg8-Atg3 intermediates are formed in the presence of PS liposomes as rapidly as in the presence of PE liposomes, and transfer of Atg8 from Atg3 to PS is specifically retarded at neutral pH. Furthermore, the addition of acidic phospholipids to liposomes is also suggested to result in the preferential formation of the Atg8-PE conjugate. I also show that the acidic phospholipids specifically promote the recruitment of the Atg8-Atg7 and the Atg8-Atg3 thioester intermediates to the membrane. Furthermore, it was reported that the Atg12-Atg5 conjugate, which is formed by ubiquitin-like conjugation reaction, is indispensable for Atg8-PE production in vivo, and that recombinant Atg12-Atg5 indeed

stimulates Atg8-PE and Atg8-PS production in vitro.

The preferential formation of Atg8-PE can be achieved by combination of neutral pH, acidic phospholipids, and the Atg12-Atg5 conjugate. Furthermore, I show that PS is not essential for autophagosome formation even if Atg8 is conjugated to PS in vivo, because the autophagic activity of cells deficient for the PS synthesis enzyme-deficient (*pss1Δ*) cells was normal. However, in vitro, the less efficient but significant production of Atg8-PS was still observed, suggesting that the exclusive formation of Atg8-PE requires precise in vivo settings for these factors and/or other factor(s). Alternatively, this result may imply the production of Atg8-PS in vivo, although its amount should be much less than the PE conjugate. Previously, PE was detected as the sole lipid conjugated to Atg8 and its mammalian homolog LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) in vivo. However, lipidated Atg8 and LC3 were forced to accumulate by mutation or treatment with lysosomal inhibitors under nutrient-replete conditions. Therefore, there also remains an alternative possibility that Atg8-PS is formed in starved cells undergoing autophagy, so, I try to purify lipidated Atg8 from the cells under starvation conditions for detailed analysis of lipids conjugated to Atg8 by LC-MS/MS.

Next, I perform gel filtration chromatography to know the interaction of the components in the Atg8 conjugation reaction in vitro. Atg3 interacts with Atg7 as it shown, and Atg3 also interacts with the Atg8-Atg7 thioester intermediate. Furthermore, I find the Atg8-Atg3 thioester intermediate releases from Atg7. It is reasonable because Atg7 is reused rapidly for the next cycle of the reaction. Furthermore, I show that Atg3 and Atg7 are interacted via the disulfide bond between active center cysteines in Atg3 and Atg7. I show the model of the sequential reaction of Atg8 lipidation.

論文の審査結果の要旨

オートファジーにおける最も重要なステップは、分解すべき細胞質成分を膜で取り囲む過程である。細胞質に扁平な膜構造が現れ、これが伸張して隔離膜と呼ばれる膜嚢になり、二重膜構造、オートファゴソームが形成される。この過程に必須な因子として 18 個の Atg たんぱく質が同定されている。本研究はこの中の Atg8 の脂質化反応系に焦点をあてて解析をおこなったものである。Atg8 はユビキチン様蛋白質であり、E1 酵素である Atg7、E2 酵素である Atg3 とチオエステル結合中間体を経て、リン脂質分子であるホスファチジルエタノールアミン(PE)の親水性頭部のアミノ基とアミド結合する。Atg8 の脂質化反応の *in vitro* 再構成系を用いて、反応に関わるたんぱく質 Atg8, 7, 3 の相互作用に関する解析と Atg8 の脂質化反応の基質特異性を決める要因を解析した。この過程で Atg8-Atg7、Atg8-Atg3 チオエステル中間体を、定量的に検出することに成功した。

蛋白質間相互作用については、これまで Atg7 と Atg3 が直接相互作用していることが示されていたが、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、Atg3 は Atg8-7 中間体が形成されるまでは Atg7 と相互作用しているが、Atg8 が転移すると Atg8-3 中間体として Atg7 から遊離することを示した。この機構により Atg7 を次の反応に速やかにリサイクルし、反応の効率を上げていると結論した。

細胞内では PE のみが Atg8 と結合する脂質として検出されたのに対し、*in vitro* では Atg8 はホスファチジルセリン(PS)とも結合する。しかし、PS も PE と同様、細胞内の様々な膜に普遍的な脂質なので細胞内には Atg8 が PE と特異的に結合すると考えられる。大岡杏子氏は、*in vitro* での再構成系で、反応液の pH を反応性が高い 8.0 から細胞質の pH に近い 7.0 にすると、Atg8 は PE とは反応効率が低下するものの結合するのに対し、PS とはほとんどお結合しなくなることを見いだした。さらに、Atg8 の脂質化反応の律速段階は、Atg3 から脂質への転移反応であること、また反応液の pH を下げると、特異的にこの段階が遅延することを明らかにした。この転移反応率の低下は、PE 化より PS 化に対して顕著であり、結果として、中性付近の pH では Atg8 は PS と結合しない。また、これまでに、酸性リン脂質をリポソームに加えると、Atg8 の PE 化が顕著に促進されることを報告されていたが、PS 化にはこのような効果が認められないことも示した。PS が脂質化反応の基質であるのと同時に酸性リン脂質でもあるためと考えている。さらに、PE を含むリポソームに酸性リン脂質が含まれると、チオエステル中間体のリポソームへの親和性が特異的に上昇することも明らかにした。以上のような結果から、細胞内の pH と膜に酸性リン脂質が含まれているという 2 つの環境的要因が、細胞内での Atg8 の脂質化の基質選択に関わる可能性を示した。

生化学的手法でオートファジーに必須なユビキチン様の反応による脂質化反応に新しい知見をもたらした。今後細胞内での解析を進める上で意義のある成果である。実験の進め方、得られた明瞭な結果など、博士論文として十分な新規性が認められると審査員全員一致で結論した。