

新規 Atg8 結合モチーフ Helical AIM の同定 Identification of helical AIMs as a novel type of Atg8-interacting motif

山崎章徳, 野田展生*

公益財団法人微生物化学研究会, 〒141-0021 東京都品川区上大崎 3-14-23

Akinori Yamasaki and Nobuo N. Noda*

Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, 141-0021, Japan

1 はじめに

マクロオートファジーとは、オートファゴソームと呼ばれる小胞を介しカーゴをリソソームへ輸送・分解するプロセスである。オートファゴソーム形成に必須なユビキチン様蛋白質 Atg8 は、オートファゴソーム前駆体である隔離膜上の脂質ホスファチジルエタノールアミン(PE)に C 末端のグリシンを介して共有結合する極めてユニークな蛋白質である。Atg8 は、オートファゴソーム形成に必要なだけに留まらず、選択的オートファジー受容体を始めとした Atg8 結合蛋白質をオートファゴソームに局在化させる機能を持つ。これまで報告されている 40 種以上の Atg8 結合蛋白質のほとんどは 4 残基からなる W-X-X-L 様の共通したモチーフ(AIM/LIR)を有する。Atg8 は真核生物において、遺伝子およびオートファジー機能の両面で進化的に保存されている。一方で、PE 化を受けない、あるいはオートファジー経路とは独立した Atg8 の機能についてはほとんど報告されていなかった。

我々は分裂酵母 (Sp) Atg8 を用いた結合蛋白質スクリーニングから同定した、液胞膜蛋白質 SpHfl1 が Atg8 と結合すること、両者の結合がストレス刺激下の液胞形態の維持に寄与していることを見出した。Hfl1 は出芽酵母にも保存されており (ScHfl1)、SpHfl1 と同様に Atg8 に結合する。しかしながら SpHfl1 および ScHfl1 の Atg8 結合領域(Hfl1-AIM)には Canonical AIM は含まれていなかったことから、Atg8 との相互作用様式は不明であった。そこで今回 ScHfl1-AIM と Atg8 との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

ScHfl1 における Atg8 の結合領域を *in vitro* での結合実験により決定した。この領域を Atg8 の N 末端に付加した融合蛋白質を作製し、結晶化スクリーニングを行った。その結果、6% ポリエチレングリコール 6000、pH 5.0 の沈殿剤を用いることで単結晶を得た。これら結晶を用いて回折データの収集を行った。

3 結果および考察

波長 1.1 Å で分解能 2.35 Å までの回折データを収集し、プログラム HKL2000 を用いてデータ処理を行った。プログラム Phenix を用い、Atg8 の結晶構

造 (PDBID: 2ZPN) をモデルとして分子置換法により初期位相を決定し、分解能 2.35 Å で構造精密化した (図 1)。

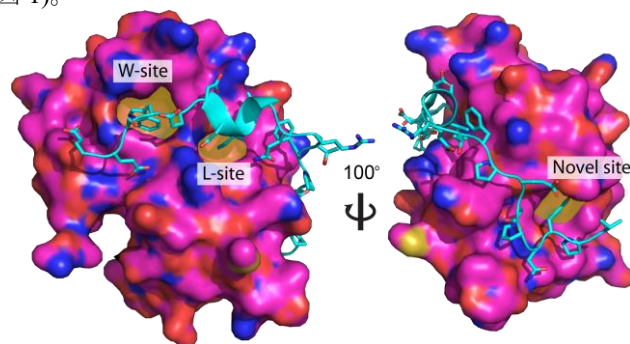


図 1: ScHfl1-Atg8 複合体構造

Atg8 結合蛋白質は WXXL 様の配列の AIM を介して、WXXL の一残基目の芳香族アミノ酸、四残基目の疎水性アミノ酸がそれぞれ Atg8 の W-site, L-site と呼ばれるポケットに結合するとともに、Atg8 の $\beta 2$ と分子間 β -シートを形成することで結合する。本研究により明らかとなった Hfl1 の構造は、Atg8 の W-site と L-site を利用して結合しているものの、既知の AIM とは異なり WXXXI という 5 残基で結合していた。また Hfl1 は Atg8 と分子間 β -シートを形成しておらず、L-site 残基を中心としてヘリックスを形成していた。我々は、L-site 残基を中心にしてヘリックスを形成して Atg8 と結合する様式を Helical AIM と命名した。さらに ScHfl1-AIM は C 末端領域の Y387 が Atg8 の $\alpha 3$ と $\beta 3$ によって形成される新規ポケットに結合していた。

4 まとめ

本研究により Hfl1 は既知の AIM とは異なる様式で Atg8 と結合することを明らかにし、その結合配列を Helical AIM と命名した。今後は Atg8 を用いた更なる解析を通して、「オートファジー非依存的な Atg8 の機能と Atg8 新規結合様式 Helical AIM」の関係性を明らかにし、「Helical AIM のコンセンサス配列を定義し、Helical AIM を有する蛋白質の同定」を行いたい。

* nn@bikaken.or.jp