

# Atg1 複合体の構造基盤とその飢餓依存的形成機構

## Structural basis of starvation-induced assembly of the Atg1 complex

藤岡優子<sup>1</sup>, 野田展生<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>微生物化学研究所, 〒141-0021 東京都品川区上大崎 3-14-23

<sup>2</sup>CREST, JST

Yuko Fujioka<sup>1</sup> and Nobuo N. Noda<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, 141-0021, Japan

<sup>2</sup>CREST, JST, Japan

### 1 はじめに

オートファジーは真核細胞に保存された細胞内の主要な分解系であり、二重膜構造体であるオートファゴソームの新生を通して分解対象をリソソーム/液胞へと輸送することで分解を行う。オートファジーは飢餓により強く誘導され、飢餓時の栄養源確保に寄与するが、高等生物では細胞内浄化という極めて重要な役割を担い、細胞の恒常性維持を通して生体を疾病から守っている。出芽酵母を用いた遺伝学的解析により、オートファゴソーム形成に必須な Atg 因子が 18 種類同定され、それらのうち 5 種類は Atg1 複合体を形成することが明らかとなった。

Atg1 複合体はセリンスレオニンキナーゼである Atg1 およびその制御因子群である Atg13, Atg17, Atg29, Atg31 からなる。富栄養条件下では、Atg13 が栄養センサーである TOR キナーゼにより高度にリン酸化され、Atg13 は Atg1 および Atg17 と結合できない状態に在るが、飢餓になり TOR の活性が抑制されると、Atg13 は速やかに脱リン酸化し、Atg1 および Atg17 と結合することで Atg1-Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体 (Atg1 複合体) を形成し、オートファゴソーム形成を始動すると考えられている。これまでに Atg17-Atg29-Atg31 複合体および Atg13 の部分構造は報告されていたが、Atg1 の構造および Atg13 を介した Atg1 複合体の構築基盤については構造情報が完全に欠落していた。飢餓依存的な Atg1 複合体形成の構造基盤を明らかにする為、Atg1-Atg13 複合体および Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶化および構造解析を行った[1]。

### 2 実験

Atg13 は約 470 残基に及ぶ天然変性領域を持ち、その領域を介して Atg1 および Atg17 と結合する。Atg13 の切り詰め実験を行い、Atg1 および Atg17 それぞれと結合する最少領域を同定した[1]。同定した最少領域を用いて、Atg1-Atg13 複合体および Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶化スクリーニングを行った結果、前者についてはポリエチレングリコール 3350 を、後者についてはポリエチレングリコールモノメチルエーテル 5000 を沈殿剤として用いることで、それぞれ単結晶の調製に成功した。得ら

れた結晶について回折能の判定を行い、良質な回折像を与えた結晶についてデータ収集を行った。また Atg1-Atg13 複合体については分子置換法に供せる座標が存在しなかったため、セレンメチオニン誘導体結晶を調製し、セレンの MAD データを収集した。

### 3 結果および考察

Atg1-Atg13 複合体についてはセレンを用いた MAD 法により初期位相を決定した。プログラム Phenix によるモデル構築ののち、ネイティブデータに移行して分解能 2.2 Å で最終的なモデル精密化を行った。一方 Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体については Atg17-Atg29-Atg31 複合体構造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 3.2 Å で精密化した。

Atg1 の Atg13 結合領域は 2 本のヘリックスからなる MIT ドメインがタンデムに 2 つつながり、両者が密接に相互作用することで一つの球状構造を取っていた (図 1)。Atg13 の Atg1 結合領域は 2 本のヘリックスがループでつながれた伸びた構造を取っており、Atg1 の 2 つの MIT ドメインを取り囲むように結合していた[1]。

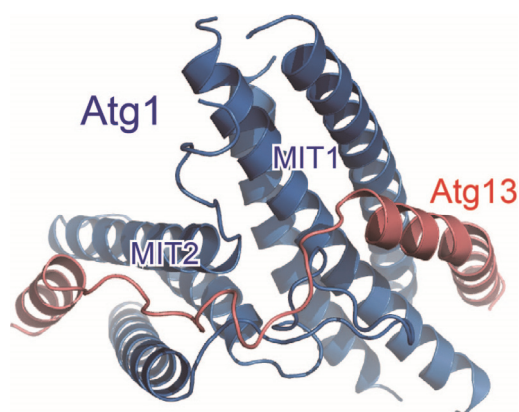


図 1 : Atg1-Atg13 複合体の結晶構造

Atg17 は 4 本のヘリックスからなる弓状構造を持ち、C 末端側で二量体化することで互いに凹面が逆を向いた特徴的な構造を取っていた。凹面には Atg29-Atg31 複合体が、N 末端近傍の疎水性ポケットには Atg13 の紐状構造が結合していた (図 2) [1]。

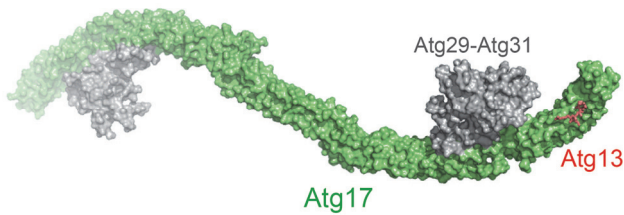


図 2 : Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造

Atg13 のどちらの領域にもリン酸化を受けるセリン残基が存在しており、変異体解析の結果これらのリン酸化により Atg1 および Atg17 との結合が顕著に低下することが明らかとなった。これら Atg13 のセリン残基は飢餓依存的に脱リン酸化することから、飢餓時には脱リン酸化を通して Atg13 が Atg1 および Atg17 両方との高い親和性を獲得し、その結果 Atg1 複合体が形成するというモデルが考えられた (図 3) [1]。

#### 4 まとめ

今回の構造解析により、Atg1-Atg13 間および Atg13-Atg17 間の相互作用の詳細が明らかとなった。今後は Atg1 キナーゼの活性制御機構を明らかにするため、キナーゼドメインを含めた Atg1 複合体の全体構造解析を進めていく必要がある。

#### 参考文献

- [1] Y. Fujioka *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 513 (2014).

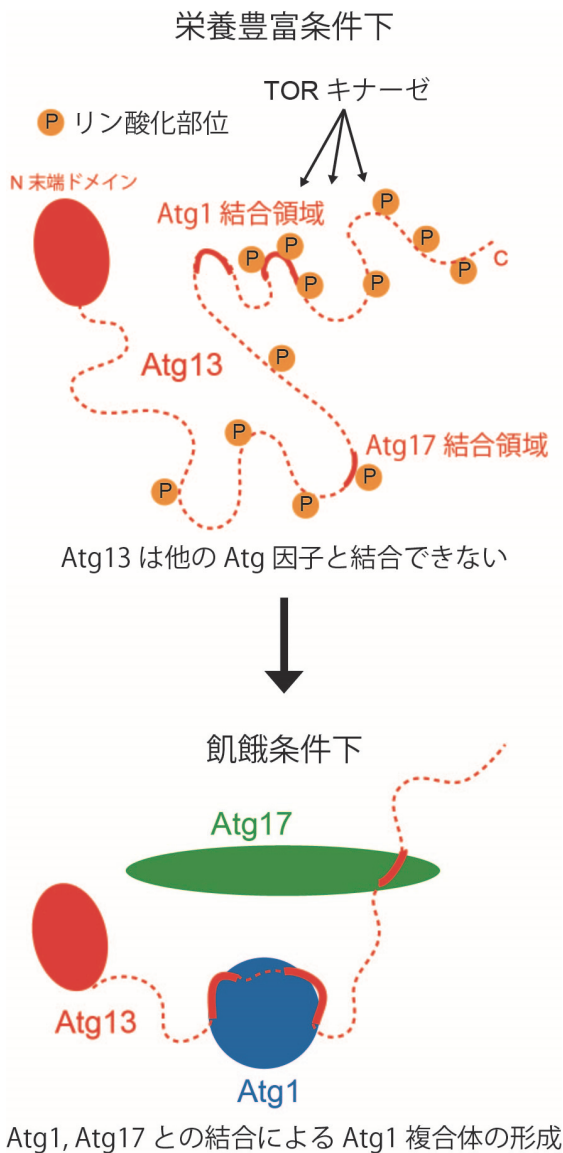


図 3 : 飢餓依存的な Atg1 複合体形成モデル