

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	出芽酵母におけるオートファジー関連E3酵素複合体のオートファゴソーム前駆体への局在化機構の研究
Title(English)	
著者(和文)	原田久美
Author(English)	Kumi Harada
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11216号, 授与年月日:2019年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中戸川 仁,太田 啓之,岩崎 博史,中村 信大,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11216号, Conferred date:2019/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 30 年度

博士論文

出芽酵母におけるオートファジー関連 E3 酵素複合体の
オートファゴソーム前駆体への局在化機構の研究

東京工業大学 大学院生命理工学研究科

生体システム専攻

原田 久美

指導教員：中戸川 仁 准教授

目次

要旨.....	1
第 1 章 序論	3
オートファジーの概要.....	3
オートファジー関連タンパク質とオートファゴソーム形成の分子機構.....	3
Atg16 複合体の形成と機能.....	8
Atg16 複合体のオートファゴソーム形成部位への局在化機構.....	9
第 2 章 結果	10
第 1 節 Atg1 複合体との相互作用を介した Atg16 複合体の新規 PAS 局在化機構の発見	10
Harada K**, Kotani T** (these authors contributed equally to this work), Kirisako H, Sakoh- Nakatogawa M, Oikawa Y, Kimura Y, Hirano H, Yamamoto H, Ohsumi Y, Nakatogawa H (2019) Two distinct mechanisms target the autophagy-related E3 complex to the pre-autophagosomal structure. eLife 8, e43088	
Atg16 複合体の PAS への局在化には Atg12 依存的な新規のメカニズムが存在する	10
Atg16 複合体と相互作用する因子の探索.....	10
Atg16 複合体と相互作用する候補タンパク質の解析	11
Atg16 複合体はオートファジーの誘導に応じて Atg1 複合体と相互作用する.....	12
Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用には Atg12 の N 末端領域が重要である	14
Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用は Atg16 複合体の PAS への局在化に関与する	15
Atg16 複合体を PAS に局在化させる Atg1 複合体依存的経路と PI3P 依存的経路の関係	15

Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用は Atg1 複合体による PAS の足場形成を促進する	17
第 2 節 Atg16 複合体と Atg2-Atg18 複合体の相互作用	18
Atg16 複合体は Atg2-Atg18 複合体と相互作用する	18
Atg16 複合体との相互作用が低下する Atg18 変異体の取得	18
第 3 章 考察	20
出芽酵母における Atg16 複合体の PAS 局在化機構	20
Atg1 複合体との相互作用を介した Atg16 複合体の PAS 局在化の意義	21
哺乳類細胞におけるメカニズムとの比較	22
Atg16 複合体と Atg2-Atg18 複合体との相互作用について	23
第 4 章 材料と方法	24
酵母株および培養	24
酵母株の作製	24
プラスミドの作製	25
蛍光顕微鏡観察	25
イムノブロットイング	26
GFP プロセッシングアッセイ	27
免疫沈降・質量分析	27
酵母ツーハイブリッド解析	28
Atg8-PE 解析	28
ALP アッセイ	28

参考文献.....	30
表	40
表 1 質量分析によって同定された主な Atg16 複合体結合タンパク質	40
表 2 本研究に用いたオリゴ DNA.....	42
表 3 本研究に用いた出芽酵母株.....	44
表 4 本研究に用いたプラスミド	46
表 5 本研究に用いた抗体.....	47
図	48
図 1 出芽酵母におけるオートファジーのモデル図	48
図 2 オートファゴソームの形成機構.....	49
図 3 Atg12 結合反応系、Atg8 結合反応系のモデル図.....	50
図 4 Atg16 複合体の PAS 局在には PI3P 依存的な経路と Atg12 依存的な経路がある.....	51
図 5 質量分析による Atg16 複合体と相互作用するタンパク質同定の戦略.....	53
図 6 Atg16 複合体の相互作用候補の GFP-Atg8 プロセッシングアッセイ.....	54
図 7 Atg16 複合体は Atg1 複合体と相互作用する.....	55
図 8 Atg16 複合体は Atg12 の N 末端を介して Atg1 複合体と相互作用する.....	57
図 9 Atg16 複合体と Atg1 複合体は Atg1 複合体の PAS の足場形成を促進する.....	59
図 10 Atg16 複合体は Atg2-Atg18 複合体と相互作用する.....	60
図 11 Atg18 は Atg5-GFP の PAS 局在に影響しない.....	61
図 12 Atg18 変異体の作製.....	62
図 13 Atg18 変異体のオートファジー活性への影響.....	64
図 14 オートファゴソーム形成における Atg16 複合体の PAS への局在モデル.....	66

本研究に関連する結果.....	67
図 S1 Atg17 は Atg12 と相互作用する.....	67
図 S2 Atg12 の N 末端は Atg12-Atg5 結合体の E3 酵素様活性には必要ない.....	69
図 S3 Atg12N 末端欠損による Atg8-PE への影響.....	70
謝辞.....	71

要旨

オートファジーは、酵母から哺乳類までの真核生物に保存された細胞内分解システムである。オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる扁平状の膜小胞が形成され、これが細胞質成分を取り囲むようにして伸張し、球状となって閉じ、オートファゴソームと呼ばれる二重膜胞を形成する。オートファゴソームは液胞（酵母、植物）あるいはリソソーム（哺乳類）と融合し、これらのオルガネラ内の加水分解酵素によってオートファゴソームの内容物が分解される。分解産物は、液胞／リソソームから細胞質に排出されて新たな栄養源として再利用され、飢餓時の細胞の生存を支える。近年では、オートファジーは栄養飢餓応答に限らず、細胞内タンパク質の品質管理、病原体排除、抗原提示、発生といった多様な生命現象にも関わり、神経変性疾患やがんといった疾患との関連にも注目が置かれている。

これまで、オートファゴソーム形成に必要な因子として、約 20 のオートファジー関連 (autophagy-related, Atg) タンパク質が同定されてきた。Atg タンパク質は、いくつかの機能ユニットに分類される。オートファジーの誘導に伴い、これらの Atg タンパク質が機能ユニットごとに階層性を持って集積することで、液胞近傍に pre-autophagosomal structure (PAS) と呼ばれる構造体を構築し、オートファゴソームの形成を媒介する。オートファジーの分子機構に関する研究が精力的に進められてきたが、オートファゴソーム形成における基本的な膜動態を含め、未だその全貌は明らかにされていない。ユビキチン様タンパク質である Atg12 は、ユビキチン様の反応系を経て Atg5 のリジン残基に結合し、Atg5 と Atg16 との相互作用を介して Atg12-Atg5-Atg16 複合体 (Atg16 複合体) を形成する。PAS に局在化した Atg16 複合体は、同じくユビキチン様タンパク質である Atg8 の結合反応において E3 酵素として機能し、Atg8 とホスファチジルエタノールアミン (PE) との結合を促進する。Atg8-PE 結合体は、PAS および隔離膜上で、隔離膜の伸張を駆動する他、特定のタンパク質やオルガネラをオートファゴソームに選択的に取り込む際のアダプターとしても機能する。すなわち、Atg8-PE 形成の時空間的な制御を担う Atg16 複合体は、オートファジーにおい

て極めて重要な役割を果たしている。以前から、ホスファチジルイノシトール (PI) 3-キナーゼ複合体 I による PAS における PI 3-リン酸 (PI3P) の産生が Atg16 複合体の PAS への局在化に重要であることが知られていた。また最近、PI3P 結合タンパク質である Atg21 が Atg16 と直接相互作用することで、PI3P に依存して Atg16 複合体を PAS に局在化させることが報告された。しかしながら、*ATG21* 欠失株においても Atg16 複合体の PAS への局在およびオートファジーの活性は完全に消失しないことから、Atg16 複合体を PAS に局在化させる未知のメカニズムの存在が示唆されていた。本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、Atg16 複合体の PAS 局在化機構を解明することを目的とした。

オートファジーを誘導した酵母細胞より Atg5 を免疫沈降して質量分析を行い、Atg16 複合体と相互作用する候補因子として、PAS の足場を形成する Atg1 複合体のサブユニットを複数同定した。共免疫沈降解析によってこの複合体間相互作用を確認し、この相互作用は、(i) オートファジーの誘導に依存して起こること、(ii) 両複合体の形成を必要とすること、(iii) 複数の Atg1 複合体が集まって形成する高次会合体を必要とすることなどを明らかにした。また、この相互作用が Atg12 のユビキチン様ドメインの N 末端側領域を介して起こることを見いだした。さらに、この Atg1 複合体-Atg12 間相互作用は、PI3P-Atg21-Atg16 間相互作用を介する経路と協働的に Atg16 複合体の PAS への局在化を媒介することを明らかにした。これらの経路のいずれか一方を欠損させても、Atg16 複合体の PAS 局在およびオートファジー活性は部分的に低下するに留まるが、両経路を同時に破壊させると、Atg16 複合体の PAS 局在およびオートファジー活性は完全に失われた。また、Atg1 複合体-Atg12 間相互作用を介して局在化する Atg16 複合体には、Atg8-PE の形成する E3 酵素としての働きに加えて、Atg1 複合体による PAS の足場形成を促進する新たな役割があることも発見した。以上のように、本研究は、Atg16 複合体を PAS に局在化させる新たなメカニズムと Atg16 複合体の新たな機能を解明し、オートファゴソーム形成における核形成 (nucleation) のステップの分子機構の理解を大きく前進させた。

第1章 序論

オートファジーの概要

オートファジーは、ベルギーの医師であった Christian de Duve によって 1963 年に提唱された細胞内現象であり (de Duve and Wattiaux, 2003)、自身を (auto) を食す (phagy) という意味を持つギリシャ語に由来する、真核生物に保存された細胞内成分の分解機構である。オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる扁平な膜小胞が形成され、これが伸張する過程で細胞内の成分を囲い込み、最終的に球状の二重膜胞である“オートファゴソーム”となる (図 1)。オートファゴソームは、細胞内の消化器官である液胞 (酵母, 植物)/リソソーム (哺乳類) に運ばれ、これらオルガネラ内の複数の分解酵素によって分解される。オートファジーの生理的役割は主に 2 つある。1 つ目は、異常タンパク質や不要オルガネラ、細胞に侵入した細菌といった、細胞にとって有害な物質を選択的に分解することで、細胞内の品質管理および細胞の恒常性維持に寄与する役割である。2 つ目は、外部からの栄養供給が絶たれた際に、非選択的に細胞内成分を分解し、分解産物を栄養源として供給する飢餓応答機構としての役割である。その他にも、オートファジーの破綻によって、発生、分化、免疫といった様々な生命現象に異常が生じ、神経変性疾患、腫瘍形成と病気に繋がるということが明らかにされつつある (Bento et al., 2016; Dikic and Elazar, 2018; Mizushima, 2018)。オートファジーは、細胞内での異常物質の蓄積等によって起こる内因性ストレスから、栄養飢餓や低酸素状態等による外因性ストレスなど、幅広い細胞ストレスによって引き起こされる。

オートファジー関連タンパク質とオートファゴソーム形成の分子機構

オートファジーの研究は、この 30 年で飛躍的な進展を見せているが、その発端となったのは、1993 年に大隅良典博士が出芽酵母にてオートファジー不能株のスクリーニングを行い (Tsukada and Ohsumi, 1993)、その原因遺伝子の特定によりオートファジーに関連する 15 の遺伝子を同定したことである。これらはオートファジー関連 (AuTophaGy-related, *ATG* / *Atg*)

遺伝子/タンパク質と呼ばれ、現在では 40 以上の *ATG* 遺伝子が同定されている。その中でも、19 の *Atg* タンパク質は、飢餓に応じたオートファゴソームの形成に重要な“コア因子”であり (Nakatogawa et al., 2009; Ohsumi, 2014; Yang and Klionsky, 2010)、以下の 6 つの機能ユニットに分類される：i) *Atg1* タンパク質キナーゼ複合体、ii) *Atg9* 小胞、iii) ホスファチジルイノシトール (PI) 3-キナーゼ (PI3K) 複合体 I、iv) *Atg2-Atg18* 複合体、v) *Atg12* 結合系、vi) *Atg8* 結合系。オートファジーが誘導されると、各ユニットが協調的に働き、液胞近傍に集積する (図 2)。この *Atg* タンパク質の集積体は、pre-autophagosomal structure (PAS) とよばれている。以下、各ユニットの機能と PAS への集積を含めた、オートファゴソーム形成機構について、現在得られている知見を概説する。

酵母において、細胞の栄養状態（主に細胞内のアミノ酸レベル）の感知とそれに応じた細胞の増殖及び機能制御には *Tor* (target of rapamycin) というタンパク質キナーゼが中心的な役割を担っている (Heitman et al., 1991)。*Tor* キナーゼは、*Tor complex 1* (TORC1) と *Tor complex 2* (TORC2) という 2 つの異なる複合体を形成し、主に TORC1 がオートファジーを制御する (Loewith et al., 2002)。細胞が富栄養状態にあると、TORC1 は活性化状態にあり、*Atg13* をリン酸化する。一方、細胞が飢餓状態になると、TORC1 の活性が低下し、*Atg13* は脱リン酸化される。脱リン酸化された *Atg13* は、MIM (MIT-interacting motif) を介してセリン/スレオニンキナーゼである *Atg1* と結合する。*Atg13* はさらに *Atg17-Atg29-Atg31* 複合体とも結合し、*Atg1*, *Atg13*, *Atg17*, *Atg29* および *Atg31* の 5 者から成る *Atg1* 複合体が形成される (Kabeya et al., 2009; Kamada et al., 2000)。*Atg13* は 2 つの異なる *Atg17* 結合部位を持ち、2 つの *Atg1* 複合体を架橋する。このようにして、*Atg1* 複合体は高次会合体を形成し、これを足場として他の *Atg* タンパク質が PAS へと集積する (Yamamoto et al., 2016)。高次会合体が形成されることで、他分子間の自己リン酸化を介して、*Atg1* のキナーゼ活性が上昇する。*Atg1* のキナーゼ活性はオートファジーに必須である (Matsuura et al., 1997)。また、*Atg13* は HORMA (*Hop1*, *Rev7* and *Mad2*) ドメインを介して *Atg9* と相互作用し、*Atg9* 小胞を PAS へとリクルートする (Suzuki et al., 2015; Yamamoto et al., 2012)。

Atg9 は、ゴルジ体由来の膜小胞に局在する 6 回膜貫通型膜タンパク質であり、この小胞 (Atg9 小胞) はオートファゴソーム形成における膜の供給源と考えられてきた (Noda et al., 2000; Reggiori and Klionsky, 2006; van der Vaart et al., 2010)。しかし、その後の解析により、Atg9 小胞の直径は 30-60 nm であり、オートファゴソーム形成時に PAS に局在化する Atg9 小胞は 3-5 個であることが示され、オートファゴソーム (直径 300-900 nm) の形成において主要な脂質供給源とはなりえないと考えられている (Takeshige et al., 1992; Yamamoto et al., 2012)。一方、Atg9 は隔離膜やオートファゴソーム膜にも存在することが示されたため、Atg9 小胞はオートファゴソーム形成を開始するための“核”となると考えられている (Yamamoto et al., 2012)。

PI3K は、PI のイノシトール環の D3 位のヒドロキシ基をリン酸化して PI3P を産生する (Schu et al., 1993; Stack and Emr, 1994)。Vps34 は、出芽酵母の唯一の PI3K として、エンドサイトーシスや液胞タンパク質輸送、そしてオートファジーといった幅広い膜輸送系に関わることが知られており、酵母から哺乳類にまで保存されている (Brown et al., 1995; Kihara et al., 2001; Munn and Riezman, 1994; Robinson et al., 1998; Schu et al., 1993)。Vps34 は、Vps34, Vps15, Vps30/Atg6, Atg14, Atg38 から成る PI3K 複合体 I と、Vps34, Vps15, Vps30/Atg6, Vps38 から成る PI3K 複合体 II の 2 つの異なる複合体を形成する。Vps15 および Vps30/Atg6 は両複合体に共通のサブユニットである。Vps30/Atg6 は、液胞の加水分解酵素であるカルボペプチダーゼ (CPY) の輸送に必要な因子として同定され、その後、オートファジーにも必須であることが明らかとなった (Kametaka et al., 1998; Seaman et al., 1997)。Vps15 はセリン/スレオニンキナーゼであり、そのキナーゼ活性に依存して、Vps34 が活性化される (Stack et al., 1993, 1995)。Atg14 と Vps38 はそれぞれ PI3K 複合体 I、PI3K 複合体 II に特異的なサブユニットであり、各複合体の局在を決定する。Atg14 によって PI3K 複合体 I は PAS へ、Vps38 によって PI3K 複合体 II はエンドソーム膜へと局在化される (Kihara et al., 2001; Obara et al., 2006)。また、Atg38 は PI3K 複合体 I のみに含まれ、構成因子を架橋することで複合体を安定化させる (Araki et al., 2013)。

Atg2-Atg18 複合体は、PI3K 複合体 I が産生する PI3P に Atg18 を介して結合し、PAS に局在化する (Obara et al., 2008; Suzuki et al., 2007)。Atg18 は、40 アミノ酸残基の短いモチーフを繰り返す WD リピートを有しており、5 番目の β -propeller 内の FRRG モチーフを介して PI3P および PI(3,5)P₂ と結合し、Atg2 との複合体は PAS に、Fab1, Vac7, Vac14 および Fig4 との複合体はエンドソームおよび液胞に局在化する (Barth et al., 2001; Dove et al., 2004; Krick et al., 2006, 2008; Nair et al., 2010; Obara et al., 2008; Strømhaug et al., 2004)。Atg2 の C 末端領域に存在する両親媒性 α -ヘリックスは膜結合能を有し、Atg2 自身の膜結合に加え、Atg18 と PI3P との結合を促進して Atg2-Atg18 複合体の PAS への局在化に重要な役割を担う (Kotani et al., 2018)。また、Atg2 の N 末端領域にも膜結合能があり、PAS に局在化した Atg2-Atg18 複合体と小胞体との結合に関与し、隔離膜の伸張に働くと考えられている (Kotani et al., 2018)。

コア Atg タンパク質の約半数は、ユビキチン様の結合反応に関わる。ユビキチン結合反応は、ユビキチン活性化酵素 (E1) , ユビキチン結合酵素 (E2) , ユビキチンリガーゼ (E3) の 3 つによって、ATP 依存的に進行するタンパク質修飾反応である。まず、ユビキチンの C 末端グリシン残基と E1 酵素のシステイン残基とがチオエステル結合を形成し、ユビキチンは E2 酵素のシステイン残基に渡される (Ciechanover et al., 1982; Haas et al., 1982)。続いて、ユビキチンは E3 酵素の働きによって、標的タンパク質のリジン残基とイソペプチド結合を形成する (Bartel et al., 1990; Hershko, 1983; Peters et al., 1996; Scheffner and Al., 1993; Scheffner et al., 1995; Zachariae et al., 1996)。ユビキチン様タンパク質である Atg12 は、その C 末端のグリシン残基が Atg7 (E1) および Atg10 (E2) の活性中心のシステイン残基とのチオエステル結合を経て、最終的に Atg5 の 149 番目のリジン残基とイソペプチド結合を形成する (図 3)。Atg12 と Atg5 の結合反応を促進する E3 酵素は見つかっていない。Atg12-Atg5 結合体は Atg16 と結合して二量体を形成し、PAS に局在化する (Kuma et al., 2002; Mizushima et al., 1998; Shintani et al., 1999; Suzuki et al., 2007; Tanida et al., 1999)。Atg12-Atg5-Atg16 複合体 (Atg16 複合体) は、もう 1 つのユビキチン様タンパク質である Atg8 の結合

反応における E3 酵素として働く。Atg8 は合成された後、システインプロテアーゼである Atg4 によって C 末端のアルギニン残基が切断され、グリシン残基が露出する (Kirisako et al., 2000)。その後、このグリシン残基が Atg12 結合系の E1 酵素でもある Atg7 によって活性化され、E2 酵素である Atg3 と結合する。続いて、Atg16 複合体が E3 酵素として Atg3 を活性化し、Atg8 は Atg3 からリン脂質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を形成する (Hanada et al., 2007; Ichimura et al., 2000; Sakoh-Nakatogawa et al., 2013)。ユビキチン様の反応において、結合の対象がタンパク質ではなく脂質という点が Atg8 結合系の非常にユニークな点である。Atg8-PE 複合体は、2 枚の脂質膜をつなぎ合わせ、ヘミフュージョン (脂質二重層の外葉のみの融合) させる機能を持ち、この機能は隔離膜の伸張に重要であることが報告されている (Nakatogawa et al., 2007)。また、Atg8-PE は、“選択的オートファジー”において特定のタンパク質やオルガネラをオートファゴソームに選択的に取り込む際にも重要な役割も果たす。Atg8-PE は最終的にオートファゴソーム膜の内外に存在するため、オートファゴソーム内膜の Atg8-PE は液胞に運ばれ分解される。また、オートファゴソーム外膜の Atg8-PE はオートファゴソームと液胞の融合に伴い、液胞膜に移行し、Atg4 によって PE との間のアミド結合が切断されて未修飾の Atg8 となり、再利用される (Kirisako et al., 1999, 2000)。

酵母の Atg タンパク質が同定され、分子機構の解明が進んだことで、哺乳類を中心に他の生物におけるホモログの解析も進んだ。哺乳類では、Atg1 複合体は ULK1 複合体と呼ばれており、ULK1, ATG13, FIP200, ATG101 の 4 つのサブユニットで構成されている (Chan et al., 2007; Hara et al., 2008; Hosokawa et al., 2009; Young, 2006)。哺乳類の場合、Atg タンパク質の集積は小胞体上で起こる (Itakura and Mizushima, 2010)。ULK1 複合体と ATG9 は独立してオートファゴソーム形成の場を集積し、続いて PI3K 複合体 I (VPS34-VPS15-BECN1-ATG14L-NRBF-2) がここに集積する (Itakura et al., 2012; Orsi et al., 2012)。その後、オメガソームと呼ばれる PI3P が高濃度に存在するリング状のサブドメインが小胞体上に形成され、ATG2-WIPI4 (Atg18 ホモログ) 複合体および ATG12-ATG5-ATG16L 複合体がリクルー

トされる。最終的に Atg8 のホモログである LC3/GABARAP ファミリータンパク質が集積し、オメガソームのリング内の膜が隔離膜として突き出すように伸張するモデルが提唱されている (Axe et al., 2008; Fujita et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009; Velikkakath et al., 2012)。このように、酵母と哺乳類細胞におけるオートファゴソーム形成機構にはいくつかの相違点（未検証の問題も含む）が見られるが、多くのメカニズムが類似していることが明らかとなっている。

Atg16 複合体の形成と機能

前述したように、Atg12 は、Atg7 と Atg10 が触媒するユビキチン様の反応を経て、Atg5 のリジン残基と共有結合を形成する (Mizushima et al., 1998; Shintani et al., 1999; Tanida et al., 1999) (図 3)。186 アミノ酸からなる Atg12 は、ユビキチンおよび他のユビキチン様タンパク質と一次配列上の相同性を持たないが、C 末端領域がユビキチン様の構造をとることが X 線結晶構造解析によって明らかにされた (Suzuki et al., 2005)。ユビキチン結合反応系と異なり、Atg12 と Atg5 の結合反応は E3 酵素を必要としない。また、ユビキチンには脱ユビキチン化酵素が存在し、ユビキチンと標的タンパク質との結合が可逆的であるのに対して、Atg12 結合系にはそのような酵素は存在せず、不可逆であると考えられている (Mizushima et al., 1998)。Atg12-Atg5 複合体は Atg5 を介して Atg16 と結合する。Atg16 は、150 アミノ酸から成り、Atg16 の C 末端領域 (58-123 残基) が形成するコイルドコイルによって、Atg12-Atg5-Atg16 は二量体となる (Mizushima et al., 1999)。前述の通り、この Atg16 複合体は、別のユビキチン様タンパク質である Atg8 の結合反応において E3 酵素として機能する (図 3)。Atg8-PE は、オートファゴソーム形成における膜伸張や選択的オートファジーにおける標的認識などオートファジーにおいて複数の重要な役割を果たす。したがって、Atg8-PE 形成の時空間的制御を担う Atg16 複合体の機能や細胞内動態の解明は、オートファゴソーム形成のメカニズムの理解において重要な課題である。

Atg16 複合体のオートファゴソーム形成部位への局在化機構

Atg16 複合体は、Atg1 複合体により PAS の形成が開始され、PI3K 複合体 I によって PI3P 産生されると PAS にリクルートされる (Suzuki et al., 2007)。哺乳類においても、ATG16L 複合体は、酵母と同じく PI3P に依存してオートファゴソーム形成の場にリクルートされる (Itakura and Mizushima, 2010)。しかしながら、Atg16/ATG16L 複合体には PI3P 結合能はない。PROPPIN ファミリーという PI3P に結合するタンパク質群がある (Dove et al., 2009)。酵母の Hsv2 の構造解析によって、PROPPIN ファミリータンパク質は、7つの β -propeller 内に保存された FRRG モチーフを介して PI3P に結合することが明らかとなっている (Baskaran et al., 2012; Krick et al., 2012; Watanabe et al., 2012)。出芽酵母では Atg18, Atg21, Hsv2 が、哺乳類では WIPI1~WIPI4 がこのファミリーに属する。これまで、アミノ酸配列のホモロジーに基づき、WIPI2 が Atg18 のホモログと考えられてきたが、最近の機能解析の結果を踏まえると、WIPI4 が Atg18 のホモログであり、WIPI2 が Atg21 のホモログであると考えられる。以前より、出芽酵母において、Atg21 は Atg16 複合体の PAS への局在化に重要であることが示されていたが (Strømhaug et al., 2004)、近年、哺乳類細胞において、WIPI2 が ATG16L に結合し、ATG16L 複合体をオメガソームへとリクルートすることが報告された (Dooley et al., 2014)。また、最近、出芽酵母においても、Atg21 が Atg16 および Atg8 と相互作用することで両者を PAS に局在化させ、Atg8-PE の形成を効率的に促進することが報告された (Juris et al., 2015)。しかし、*ATG21* を欠失させても、Atg16 複合体の PAS 局在およびオートファジー活性は完全に消失しない (Meiling-Wesse et al., 2004; Nair et al., 2010; Strømhaug et al., 2004)。これらのことは、Atg16 複合体の PAS への局在化には、PI3P-Atg21 を介した局在化機構とは別のメカニズムが存在する可能性を示している。本研究では、この未知の Atg16 複合体の PAS への局在化機構を解明することを目的とした。

第2章 結果

第1節 Atg1 複合体との相互作用を介した Atg16 複合体の新規 PAS 局在化機構の発見

Atg16 複合体の PAS への局在化には Atg12 依存的な新規のメカニズムが存在する

Atg16 複合体の PAS への局在化機構を明らかにするために、異なる Atg タンパク質を欠損させた場合の Atg16 複合体の PAS 局在を蛍光顕微鏡にて観察した。既存のモデルにおいては、Atg5 と Atg16 が協働して Atg16 複合体を PAS に局在化させ、Atg12 はこの過程には必要ないとされていた (Suzuki et al., 2007)。また、Atg14 を含む PI3K 複合体 I が生成する PI3P も Atg16 複合体の PAS への局在化に必須であると考えられていた (Suzuki et al., 2007)。Atg21 が PI3P および Atg16 と結合し、Atg16 複合体の PAS へのターゲティングを媒介するという報告もあった (Juris et al., 2015)。PAS のマーカーとして用いられる Atg17 に mCherry を付加し (Suzuki et al., 2007)、Atg5 に GFP を融合して Atg16 複合体の PAS 局在を解析した。これまでの報告と合致して、*ATG16* 欠損株 (*atg16Δ*) では Atg5 の PAS への局在はほぼ見られず、*ATG14* あるいは *ATG21* を欠失させた場合も Atg5 の PAS 局在頻度は顕著に減少した (図 4)。しかし、*ATG14* 欠損株および *ATG21* 欠損株において、Atg5 の PAS 局在頻度の低下は野生株の 50%程度に留まった。また、*ATG12* 欠損株では、Atg5 は PAS に異常に蓄積するが、PAS への局在頻度は減少することが明らかとなった。さらに、*ATG14* と *ATG12* の二重欠損株および *ATG21* と *ATG12* の二重欠損株においては、Atg5 の PAS への局在はほとんど見られなかった。以上の結果から、Atg16 複合体の PAS への局在化には、既知の PI3P-Atg21 経路に加え、PI3P に依存せず Atg12 に依存する新たな経路が存在することが示唆された。

Atg16 複合体と相互作用する因子の探索

Atg16 複合体の PAS への局在化を担う PI3P 非依存的なメカニズムを明らかにするため、Atg16 複合体と相互作用する因子の同定を試みた。Atg12 と Atg5 は共有結合を介して結合し、この結合体が Atg16 と結合することで、Atg16 複合体を形成する。Atg12-Atg5 結合体

のみでは PAS に局在化できない (図 5A)。Atg16 複合体とは相互作用し、Atg12-Atg5 複合体とは相互作用しない因子が Atg16 複合体の PAS への局在化に関与すると推測した。Atg5 の C 末端に FLAG タグを融合したタンパク質 (Atg5-FLAG) を発現する酵母株とその *ATG16* 欠失株を作製した。オートファジーの誘導には、ラパマイシンと呼ばれる薬剤を用いた。ラパマイシンは細胞内の栄養状態 (特にアミノ酸レベル) の認識に関わる Tor キナーゼ複合体 1 の阻害剤であり、富栄養条件であってもオートファジーを誘導する (Noda and Ohsumi, 1998)。酵母細胞をラパマイシンで処理後、細胞破砕液を調整して抗 FLAG 抗体を結合させた磁性ビーズを加え、Atg5-FLAG を免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE によって分離し、タンパク質染色試薬 SYPRO Ruby によって染色した (図 5B)。Atg5 に FLAG タグを付加していない細胞を用いた場合の免疫沈降産物と比較し、Atg5-FLAG の免疫沈降産物に特異的なバンドが多数検出された。*ATG16* を欠失させても SDS-PAGE のゲル上では免疫沈降物に顕著な変化は見られなかった。これらの免疫沈降産物に含まれるタンパク質を質量分析 (LC-MS/MS) により網羅的に同定した (質量分析は、横浜市立大学の平野久教授・木村弥生准教授のグループに依頼した)。候補因子を検討したところ、8 つの Atg タンパク質と 28 の候補因子が挙げられた (表 1)。これらのタンパク質について解析を進めた。

Atg16 複合体と相互作用する候補タンパク質の解析

まず、候補として挙げられた Atg タンパク質以外のタンパク質に関して、酵母遺伝子ノックアウトライブラリーから遺伝子欠失株を取得できた 21 株について GFP-Atg8 プロセッシングアッセイを行い、オートファジーの活性を調べた。このアッセイでは、オートファゴソーム膜に局在し、液胞に輸送される Atg8 に GFP を融合し、液胞内で GFP-Atg8 が分解されて生じる GFP 断片を GFP 抗体を用いたイムノブロットティングにより検出する (Klionsky et al., 2007)。GFP 断片と GFP-Atg8 のバンド強度を定量し、その和に対する GFP 断片の割合を算出して比較した結果、*ERV14* 欠失株と *SFT2* 欠失株においてオートファジー活性の低下が見られた (図 6)。これらの結果から、*ERV14* と *SFT2* がオートファジーに関与している可

能性が示唆された。しかしながら、本研究では、以下に記すように Atg1 複合体との相互作用に着目したため、これらの解析はこれ以上進めなかった。

Atg16 複合体はオートファジーの誘導に応じて Atg1 複合体と相互作用する

候補に挙がった 8 つの Atg タンパク質の内、4 つのタンパク質 (Atg1, Atg13, Atg17, Atg29) が Atg1 複合体の構成因子であった (図 7A)。Atg1 複合体が Atg16 複合体と相互作用するか調べるため、Atg5-FLAG 発現酵母株を用いて共免疫沈降解析を行った。Atg5-FLAG を免疫沈降したところ、Atg1, Atg17, Atg29 が共沈降した (図 7B)。以降、主に Atg17 を Atg1 複合体の共沈降の指標とした。ATG12 欠失株および ATG16 欠失株において、Atg17 の Atg5-FLAG との共免疫沈降は大きく減少した (図 7C)。また、Atg12 と Atg5 との結合に必須の ATG10 を欠失した場合も Atg17 の共沈降は顕著に減少した (図 7C)。FLAG タグを付加した Atg16 を発現する株を用いた場合も Atg17 の共免疫沈降が見られたが、ATG5 または ATG12 を欠失させるとこの共沈降は見られなくなった (図 7D)。これらの結果から、Atg1 複合体との相互作用には Atg16 複合体の形成が重要であることが示された。また、Atg1 複合体構成因子を 1 つずつ欠損させた株を作製し、Atg5-FLAG を免疫沈降した。ATG1, ATG13, ATG29 または ATG31 を欠損させた株では Atg17 および Atg1 の共沈降が見られなかった (図 7E)。さらに、Atg1 複合体の形成が欠損する Atg13^{F430A} 変異体を発現する Atg5-FLAG 発現酵母株を用いた場合も、Atg17 の共免疫沈降が顕著に減少した (図 7F)。すなわち、Atg16 複合体-Atg1 複合体間の相互作用には Atg1 複合体の形成も重要であることが示された。なお、ATG14 を欠失させた株を用いて Atg5-FLAG と Atg17 の共免疫沈降を調べたが、ATG14 の欠失による Atg17 の共沈降への影響は見られなかった (図 7G)。Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用が PI3P 非依存的な Atg16 複合体の PAS 局在化に関与するという考えと矛盾しない結果である。

次に、Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用とオートファジーの誘導との関係を調べた。ラパマイシン処理の有無で免疫沈降の結果を比較したところ、Atg5-FLAG と Atg17 と

の共沈降はラパマイシン処理条件でのみ見られた (図 7H)。また、Atg1 複合体と相互作用するが飢餓応答性のオートファジーには必須でない *ATG11* を欠損させても、Atg5-FLAG と Atg17 との共沈降に顕著な変化が見られなかった (図 7H)。これらのことから、Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用は、オートファジーが誘導される飢餓 (TORC1 の不活性化) に依存して起こることが示された。

オートファジーの誘導に応じて、Atg1 複合体は、長い天然変性領域を有する Atg13 が別の Atg1 複合体内の Atg17 と結合することにより、複数の複合体から成る高次会合体を構築する (Fujioka et al., 2014; Yamamoto et al., 2016)。これが PAS 形成の足場となって他の Atg タンパク質の集積が始まる。Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用に Atg1 複合体の高次会合体形成が必要であることを調べた。Atg1 複合体は形成できるが高次会合体形成に欠損を示す Atg13^{F375A} 変異体 (Yamamoto et al., 2016) を発現する Atg5-FLAG 発現酵母株を用いて共免疫沈降解析を行ったところ、Atg17 の共免疫沈降が顕著に減少した (図 7F)。すなわち、Atg1 複合体と Atg16 複合体との相互作用には、Atg1 複合体が高次会合体を形成することが重要であることが示唆された。これらのことから、完全な Atg1 複合体の形成が Atg16 複合体との相互作用に重要であることが示された。

Atg1 複合体が高次会合体を形成すると、Atg1 は分子間での自己リン酸化を介してそのキナーゼ活性が上昇する。キナーゼ活性を持たない Atg1^{D211A} 変異体を発現する細胞においても野生株と大差なく Atg17 が Atg5-FLAG と共沈降された (図 7I)。これらのことから、Atg16 複合体と Atg1 複合体との相互作用には、Atg1 のキナーゼ活性は必要ないことが明らかとなった。

さらに、当研究室の小谷らは、Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用は各複合体のどの構成因子を介しているのか、酵母ツーハイブリッド法を用いて調べた (James et al., 1996)。この解析は、本研究と深く関わり、1 つの論文 (Harada et al., 2019) に併せて掲載したため、ここで述べることにする。転写因子 Gal4 の転写活性化ドメイン (GAD) を Atg1 複合体の各構成因子に融合し、Gal4 の DNA 結合ドメイン (GBD) を Atg12 に融合させ、これらをア

ッセイ用の酵母株に発現させた。ヒスチジンおよびアデニン欠乏培地での生育が見られたことから、Atg12 が Atg17 および Atg31 と相互作用することが示唆された (図 S1A)。しかしながら、*ATG17* を欠失させると Atg12 と Atg31 との相互作用 (酵母の生育) は見られなくなったことから、Atg31 は Atg17 を介して Atg12 と相互作用していたと考えられた (図 S1B)。一方、Atg12 と Atg17 との相互作用は、*ATG13* と *ATG31* の両者を欠失させても見られた (図 S1C)。Atg17 は、Atg13 を介して Atg1 と、Atg31 を介して Atg29 と相互作用するため (Kabeya et al., 2009; Kamada et al., 2000)、*ATG13 ATG31* 二重欠失株において Atg17 は単独で存在すると考えられる。したがって、Atg17 が Atg12 と直接相互作用していることが示唆された。また、*ATG1*, *ATG13*, *ATG29* および *ATG31* の 4 遺伝子を欠失した株において、Atg12 の C 末端に GFP タグを融合し、Atg17 と共に *ADHI* プロモーターより過剰発現させた。Atg12 の C 末端にタグを付加すると Atg5 と結合体を形成できず、したがって Atg16 とも複合体を形成しないため、Atg12-GFP は単独で存在することになる。Atg12-GFP を免疫沈降したところ、Atg17 の共沈降が見られた (図 S1D)。以上の結果より、Atg16 複合体は、Atg12 と Atg17 との直接的な相互作用を介して、Atg1 複合体と相互作用することが示唆された。

Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用には Atg12 の N 末端領域が重要である

次に、Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用のオートファジーにおける重要性を検証するために、この相互作用が欠損する変異体の取得を試みた。Atg12 は、ユビキチン様ドメインの N 末端側に約 100 アミノ酸残基からなる配列をもっており、N 末端 70 残基を欠失させると、Atg12-Atg5 結合体は形成されるが、オートファジーの活性は野生型の 7 割程度まで低下する (Hanada and Ohsumi, 2005)。また、リコンビナントタンパク質と人工膜小胞を用いて再構成される Atg8-PE 結合反応において、N 末端の 70 アミノ酸残基を欠失した Atg12 と Atg5 の結合体の E3 酵素活性は野生型の結合体と変わらないことが当研究室の酒向-中戸川らによって確認された (図 S2)。すなわち、この Atg12 の N 末端領域の役割は未知であ

った (Hanada and Ohsumi, 2005)。近縁種における Atg12 のアミノ酸配列を比較したところ、N 末端 56 アミノ酸残基の保存性が高く、中でも Ser2 から Glu10 までが特に良く保存されていた (図 8A)。そこで、N 末端 56 アミノ酸残基欠失変異体 (Atg12^{ΔN56}) および Ser2 から Glu10 までのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体 (Atg12^{(2-10)A}) を発現するプラスミドを作製し、ATG12 欠損酵母株に導入し、Atg16 複合体と Atg1 複合体との相互作用を調べた。その結果、どちらの変異体に関しても Atg17 の Atg5-FLAG との共免疫沈降が顕著に減少した (図 8B)。Atg12^{(2-10)A} 変異体に関しては、発現量が野生型より低下していたため明確な結論を導く事ができなかったが、Atg12^{ΔN56} の結果から、Atg12 の N 末端領域は、Atg16 複合体-Atg1 複合体間相互作用に重要であることが明らかとなった。

Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用は Atg16 複合体の PAS への局在化に関与する

次に、Atg12^{ΔN56} を含む Atg16 複合体の PAS への局在を、ATG21 を欠失させて PI3P 依存的な局在化機構を欠損させた状態で調べた。atg21Δ atg12Δ 細胞において、野生型の Atg12 を発現させた場合は、Atg5-GFP の PAS への局在が正常であった。一方、atg12^{ΔN56} 変異体を発現させた場合は、Atg5-GFP の PAS への局在はほとんど観察されなかった (図 8C)。これらの結果より、Atg16 複合体と Atg1 複合体との相互作用は、Atg16 複合体の PAS への局在化に関与することが示された。

Atg16 複合体を PAS に局在化させる Atg1 複合体依存的経路と PI3P 依存的経路の関係

以上の解析により、Atg16 複合体の PAS への局在化には、以前から知られていた PI3P-Atg21-Atg16 間相互作用を介する経路と、本研究で発見した Atg1 複合体と Atg12 との相互作用を介する経路が存在することが明らかとなった。これらの 2 つの経路の関係を調べるために、まず、アルカリホスファターゼ (ALP) アッセイを行い、どちらか 1 つの経路あるいは両経路を欠損させた酵母株のオートファジー活性を評価した。液胞のアルカリホスファターゼである Pho8 の膜貫通領域を欠損させた変異体 (Pho8Δ60) は、不活性型として細胞質に

発現する。Pho8 Δ 60 が細胞質成分としてオートファジーによって液胞に輸送されると、液胞内でプロセッシングを受けて活性化される。細胞を破碎し、Pho8 Δ 60 の活性を生化学的に測定することで、細胞のオートファジー活性を定量的に評価することができる (Noda et al., 1995)。まず、既存の報告と合致して、*ATG12* 欠損株はオートファジー活性を示さないが、この株に Atg12^{AN56} 変異体を発現させた場合や、*ATG21* を欠損した株（プラスミドから野生型 *ATG12* を発現させた *ATG21 ATG12* 二重欠損株）では、コントロール細胞（プラスミドから野生型 *ATG12* を発現させた *ATG12* 欠損株）と比較してオートファジーの活性に部分的な欠損が見られた (Hanada and Ohsumi, 2005; Meiling-Wesse et al., 2004; Strømhaug et al., 2004)。 *ATG21* の欠失と Atg12 の N 末端領域の欠失を組み合わせると（プラスミドから Atg12^{AN56} 変異体を発現させた *ATG21 ATG12* 二重欠損株）、オートファジー活性はほぼ完全に消失した (図 8D)。これらの結果により、Atg16 複合体の Atg1 複合体との相互作用を介した PAS への局在化経路と PI3P 依存的な局在化経路はオートファゴソーム形成において少なくとも一部重複した役割を担っており、両経路が同時に欠損した場合、オートファゴソームの形成は完全に停止することが示された。

PI3P に依存した Atg16 複合体の PAS 局在化は Atg8-PE の形成に重要である (Meiling-Wesse et al., 2004; Strømhaug et al., 2004)。当研究室の小谷らは、Atg1 複合体との相互作用を介した Atg16 複合体の PAS への局在化も Atg8-PE の形成に関与しているかを調べた。Atg8-PE の形成は、窒素飢餓によって誘導した (図 S3, *atg12 Δ /patG12^{WT}*)。過去の報告通り、*ATG21* の欠失により、Atg8-PE 形成に顕著な欠損が生じたが、Atg8-PE の形成はまだ見られた (図 S3, *atg21 Δ atg12 Δ /patg12^{WT}*)。また、Atg12 の N 末端領域を欠失させた場合においても、Atg8-PE の形成に部分的な欠損が見られた (*atg12 Δ /patg12^{AN56}*)。Atg21 と Atg12 の N 末端領域を同時に欠失させると、Atg8-PE の形成はほぼ完全に停止した (*atg21 Δ atg12 Δ /patg12^{AN56}*)。なお、この変異体において見られるわずかな Atg8-PE は、オートファジーに非依存的に細胞質の Atg16 複合体によって液胞膜で形成されるものであると考えられる (Nakatogawa et al., 2012)。これらの結果により、PI3P 依存的に PAS に局在化する Atg16 複合体と同様、Atg1 複合体との相互

作用に依存して PAS に局在化する Atg16 複合体も、E3 酵素と機能して Atg8-PE の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用は Atg1 複合体による PAS の足場形成を促進する

図 4 に示した各 *ATG* 遺伝子欠損株における Atg5-GFP の PAS 局在の解析において、*ATG12* または *ATG16* を欠失させた株では Atg17-mCherry の輝点の形成効率も減少していることに気が付いた。Atg17-mCherry の輝点は、Atg1 複合体による高次会合体の形成を表している。この結果を *ATG11* 欠損株を用いて確認した。Atg11 は、富栄養条件における選択的オートファジー (cytoplasm-to-vacuole targeting 経路) のための PAS 形成の足場となるタンパク質であり、これを欠損させることにより、飢餓に応じた PAS 形成を観察することができる。*ATG11* と *ATG5*, *ATG12* あるいは *ATG16* の二重欠損体を作製し、ラパマイシン処理によりオートファジーを誘導し、Atg17-GFP の輝点形成を観察した。どの二重欠損株においても、*ATG11* 単独欠損株に比べ、Atg17-GFP の輝点の形成効率は低かった (図 9A)。また、野生型 Atg12 を発現させた *ATG11 ATG12* 二重欠損株に比べ、Atg12^{ΔN56} 変異体を発現させた同株においては、Atg17-GFP の輝点形成に欠損が見られた (図 9B)。これらの結果から、Atg16 複合体には、Atg1 複合体と相互作用することにより Atg1 複合体による PAS の足場形成を促進する役割もあることが示唆された。

第2節 Atg16 複合体と Atg2-Atg18 複体の相互作用

Atg16 複合体は Atg2-Atg18 複合体と相互作用する

Atg21 は、Atg16 と相互作用し、Atg16 複体の PAS への局在化を媒介する (Strømhaug et al., 2004)。Atg18 は、Atg21 のホモログであり、Atg2 と複合体を形成してオートファゴソーム形成に機能する。Atg5-FLAG を免疫沈降すると、Atg18 および Atg2 が共沈降されることがわかった (図 10A)。すなわち、Atg16 複合体は、Atg2-Atg18 複合体と直接あるいは間接的に相互作用することが示唆された。この共沈降は、*ATG12*, *ATG16* あるいは *ATG14* を欠失させても見られた (図 10)。これらのことから、Atg16 複合体と Atg1 複体の相互作用とは異なり、Atg5 と Atg2-Atg18 複合体との相互作用には Atg16 複体の形成や PAS での PI3P の産生は必要ないことが示された。Atg18 は Atg5 の PAS への局在化に必要なことが報告されていたが (Suzuki et al., 2007)、本研究においても同様の結果が得られた (図 11A)。したがって、Atg5 と Atg2-Atg18 複体の相互作用は、Atg16 複体の PAS への局在化とは関係がないと考えられた。次に、Atg5 が Atg18 の PAS への局在化に関与するか調べた。前述したように、栄養飢餓に応じた PAS 形成を観察するために *ATG11* を欠損させた株を用いた。また、Atg18 はエンドソームにも局在する。PAS への局在を観察しやすくするため、エンドソームでの PI3P の産生に必要な *VPS38* も欠失させた。*ATG5* を欠損させると、Atg18-GFP の PAS への局在化が減少した (図 11B)。しかしながら、前述したように、*ATG5* を欠失させると Atg17-mCherry の輝点 (Atg1 複合体による PAS の足場形成) も減少するため (図 9)、Atg18 の PAS への局在自体に Atg5 が寄与しているかについては明確な結論を出すことはできなかった。

Atg16 複合体との相互作用が低下する Atg18 変異体の取得

Atg16 複合体と Atg2-Atg18 複合体との相互作用の意義を調べるため、この相互作用に欠損を示す変異体の取得を試みた。近縁種の Atg18 で良く保存されているアミノ酸配列に関して、Atg18 のホモログである *Kluyveromyces lactis* の Hsv2 の結晶構造を基に、Atg2 あるいは PI3P との結合部位周辺を外して候補部位を 8 つ決定した (Baskaran et al., 2012; Krick et al.,

2012; Watanabe et al., 2012)。これら候補部位のアミノ酸残基をアラニン（1つのみアルギニン）に置換し、8種類の変異体を作製した（図 12）。*ATG18* を欠失させた *Pho8Δ60* 発現株において GFP と HA タグを融合したこれらの *Atg18* 変異体をプラスミドから発現させ、ALP アッセイを行い、オートファジーの活性を評価した。変異体 3, 変異体 6 および変異体 8 において顕著にオートファジー活性が減少し、変異体 1, 変異体 5 および変異体 7 については部分的な減少が見られた（図 13A）。抗 HA 抗体を用いたイムノブロットティングにより変異体の発現量を調べ、同抗体を用いて免疫沈降をおこない、*Atg2* との相互作用を解析した。その結果、変異体 3 および変異体 7 は顕著に発現量が低く、また、変異体 1 および変異体 5 は *Atg2* との相互作用が低下していた（図 13B）。これらのことから、変異体 6 および変異体 8 については、*Atg2* との相互作用以外のオートファジー重要な *Atg18* の機能に欠損が生じている可能性が示された。

次に、*Atg18* 変異体の細胞内局在を調べた。野生型 *Atg18*, 変異体 3 および変異体 5 については、PAS および液胞膜への局在が見られたが、変異体 6 および変異体 8 は、細胞質全体に散在していた（図 13C）。これらの結果より、変異体 6 および変異体 8 は、膜への結合能を失っていることが示唆された。

第3章 考察

出芽酵母における Atg16 複合体の PAS 局在化機構

本研究では、Atg16 複合体の PAS への局在化機構の解明を目指し、解析を行った。既存のモデルによると、Atg1 複合体が PAS の足場を形成し、続いて Atg9 小胞, PI3K 複合体 I がリクルートされ、PI3P 結合タンパク質である Atg21 が局在する。その後、Atg21 と Atg16 との相互作用を介して Atg16 複合体が PAS にリクルートされる。このように、Atg16 複合体の PAS への局在化は PI3P に依存すると考えられてきた (図 14)。しかしながら、本研究により、既存のモデルでは説明が付かない、PI3P に依存しない第二の局在化機構の存在が明らかとなった (図 4)。Atg5 の免疫沈降産物の質量分析により、Atg16 複合体結合タンパク質を探索したところ、Atg タンパク質を含め 36 因子を候補として得た (表 1)。遺伝子ノックアウト株ライブラリーを用いた解析により、*ERV14* と *SFT2* がオートファジーに重要であることが示された (図 6)。Erv14 は、膜タンパク質のレセプターとして、新生タンパク質を ER からゴルジ体へと運ぶ輸送経路で働く (Powers and Barlowe, 1998, 2002)。Sft2 は、エンドソームからゴルジ体への輸送に関わる膜タンパク質であり、機能の詳細は不明である (Conchon et al., 1999)。2003 年の Graef らが行った質量分析によると、Sft2 といくつかの Atg タンパク質が相互作用することが認められているが、Atg12, Atg5, Atg16 はそこには含まれていない (Graef et al., 2013)。膜輸送経路とオートファジー経路は密接な関係にあるため、これらタンパク質がオートファジーに関与する可能性も考えられる。しかしながら、当研究室の志摩らは、Erv14 はオートファジーに重要でないことを示した (Shima et al., 2019)。本研究に用いた遺伝子ノックアウト株ライブラリーでは、対象の遺伝子が正しくノックアウトされていない場合がしばしばあり、このライブラリーを用いて得られた結果は、改めて自ら遺伝子欠損株を作製し直して確認する必要がある。志摩らは新たに *ERV14* 欠失株を複数作製して、上記結論を得ているため、Erv14 はオートファジーには必要ないという結論が正しい可能性が高い。

Atg5 の免疫沈降産物の質量分析では、Atg タンパク質も相互作用候補として同定され、

中でも Atg1 複合体の 5 つの構成因子のうち 4 つが含まれていることに着目をした(図 7A)。PAS 形成の最も上流に位置し、高次会合体を形成することで PAS の足場を作る Atg1 複合体と、PAS 形成の後期に局在化すると考えられてきた Atg16 複合体との相互作用は予想外の結果であったが、これら 2 つの複合体は Atg12 の N 末端を介して相互作用することを明らかにした (図 7B, 図 S1)。さらに、Atg1 複合体と Atg16 複合体との相互作用が欠損する Atg12 の N 末端領域欠失変異体 Atg12^{AN56}においては、Atg16 複合体の PAS 局在が著しく低下していた (図 8C)。すなわち、Atg16 複合体と Atg1 複合体との相互作用は、Atg16 複合体の PAS への局在化に重要であることが示された。また、*atg12^{AN56} atg21Δ* 二重変異体では Atg16 複合体の PAS 局在が完全に失われたことから、PI3P-Atg21-Atg16 間相互作用に依存する経路と Atg1 複合体-Atg12 間相互作用に依存した経路の 2 つの経路を介して Atg16 複合体の PAS への局在化は達成されることが考えられる。

Atg1 複合体との相互作用を介した Atg16 複合体の PAS 局在化の意義

次に、Atg16 複合体が PAS への局在機構として異なる 2 つの経路を持つ理由について考察する。*atg12^{AN56}* 株においてはオートファジーの活性はコントロール株の 7 割程度維持された一方で、*atg12^{AN56} atg21Δ*株はオートファジーの活性をほとんど示さなかった。また、*atg21Δ* 株においては、Atg16 複合体の PAS 局在およびオートファジー活性はコントロール株の 4 割程度であったのに対し、*ATG12* との二重欠失株ではどちらも完全に消失した (Meiling-Wesse et al., 2004; Nair et al., 2010; Strømhaug et al., 2004) (図 9D)。これらの結果から、PI3P に依存した経路と Atg1 複合体に依存した経路は独立して存在し、一方が欠失しても他方が補うようにして機能している可能性が考えられる (図 14)。図 S3 で示した結果から、Atg8-PE の形成においては、PI3P 依存的経路の方が、Atg1 複合体依存的経路よりも大きく貢献していると考えられる。一方、Atg16 複合体と Atg1 複合体の相互作用は、Atg1 複合体による PAS の足場形成を促進することが示唆された (図 9)。PI3P はこの過程よりも後で PI3K 複合体によって産生されるため、PI3P に依存してリクルートされる Atg16 複合体は、PAS

の足場形成に関与することはない。したがって、PAS の足場形成の促進は、Atg1 複合体との相互作用を介してリクルートされた Atg16 複合体に特異的な役割であると考えられる。

Atg16 複合体は、Atg16 がコイルドコイル領域を介して二量体を形成する (Fujioka et al., 2014)。Atg16 複合体内の 2 つの Atg12 の N 末端領域が、2 つの Atg1 複合体内の Atg17 を架橋するようにして相互作用することにより、Atg1 複合体による高次会合体形成が促進されるのではないかと考えられる (図 14)。Atg1 複合体の基本的な自己会合能が Atg16 複合体との相互作用に重要であるという結果もこのモデルと矛盾しない。以上の結果から、Atg16 複合体は、Atg1 複合体と相互作用することで PAS の足場形成に寄与し、その後、さらに Atg21 との相互作用を介して PI3P 依存的に PAS に局在化し、E3 酵素として機能して Atg8-PE 形成を促進する、というモデルを提唱した (図 14)。

哺乳類細胞におけるメカニズムとの比較

本研究では、出芽酵母において、オートファジーの誘導に応じて、Atg12 の N 末端領域と Atg17 が相互作用し、Atg16 複合体が PAS に局在化することを明らかにした。哺乳類細胞においても、Atg16L 複合体はオートファゴソーム形成部位 (PAS) に局在化する。酵母と哺乳類では、Atg12 の N 末端領域のアミノ酸配列に保存性は見られないが、哺乳類細胞においては、Atg17 に相当する FIP200 と Atg16L とが相互作用することにより、Atg16L 複合体が隔離膜へと局在化するという報告がある (Nishimura et al., 2013)。この相互作用に重要な Atg16L の領域は酵母には保存されていない。酵母と哺乳類における Atg16/Atg16L 複合体のオートファゴソーム形成の場への局在化機構は、詳細なメカニズムは異なるが、Atg1 複合体/ULK1 複合体との相互作用を介するという点で共通している。哺乳類において、この相互作用が WIPI2 と Atg16L との相互作用を介した経路 (酵母における Atg21 と Atg16 との相互作用を介した経路に相当する) とどのように協働しているかは不明であるが、Atg16L 複合体も ULK1 複合体の高次会合体形成を促進し、オートファゴソーム形成の開始にも寄与している可能性も大いに考えられる。

Atg16 複合体と Atg2-Atg18 複合体との相互作用について

本研究では、Atg5 は Atg2-Atg18 複合体と相互作用することも明らかにした。この相互作用は Atg12 及び Atg16 に依存しなかったことから、この相互作用は Atg5 が Atg16 複合体を形成する必要はなく、さらに、Atg14 も必要としなかったことから、PI3P にも依存しないことがわかった (図 10)。この相互作用の意義を理解するために、Atg18 の変異体を複数作製し、オートファジー活性が低下する変異体を見いだした。しかしながら、これら変異体は、タンパク質レベルや Atg2 との相互作用が低下したり、PAS への局在のみならず液胞膜への局在も失われたりしたことから、Atg2-Atg18 複合体の安定性や構造に異常が生じていることが示唆され、Atg5 との相互作用に特異的に欠損を示す変異体ではなかった。Atg5 と Atg2-Atg18 との相互作用の意義を解明するには、さらなる解析が必要である。

第4章 材料と方法

酵母株および培養

出芽酵母の培養は以下の通り行った。免疫沈降法には YPD 培地 [1% yeast extract (BD)、2% peptone (BD)、2% glucose]、顕微鏡観察には SD+CA+ATU 培地 [0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (YNB w/o aa and as) (BD), 0.5% ammonium sulfate, 0.5% casamino acid (BD), 2% glucose, 0.002% adenine sulfate, 0.002% tryptophan, 0.002% uracil] を用いた。また、Atg12, Atg13, Atg18 およびそれらの変異体で pRS316 を持つプラスミドを発現させた酵母株の培養は、SD+CA+ATU からウラシルを抜いた培地を使用した。オートファジーを誘導する際は、対数増殖基中期まで酵母を培養した後、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のラパマイシンを添加、あるいは培養液を遠心し、滅菌水で洗浄した後、SD-N 培地 [0.17% YNB w/o aa and as and 2% glucose] に移した。

酵母株の作製

本研究で使用した酵母株は、BJ2168 株, BY4741 株, W303-1a 株のいずれかを親株とし、作製した (Brachmann et al., 1998; Jones, 1991; Thomas and Rothstein, 1989)。遺伝子欠失およびタグ付加を行う際は、標的遺伝子に相同な配列を持つプライマー (表 2) を利用して PCR 産物を作製し、これを酵母株に導入することで作製した (Janke et al., 2004)。本研究で作製および使用した酵母株は、表 3 に記した。出芽酵母の形質転換は、YPD 培地で $\text{OD}_{600}=0.8$ まで培養した細胞を集菌し、100 mM 酢酸リチウム溶液で懸濁後、遠心分離により上清を除去し、240 μl の 50% polyethylene glycol 3350、36 μl の 1 M 酢酸リチウム溶液、5 μl の 10mg/ml ssDNA (サケ精子由来 DNA を 100°C で熱処理した後、冷却したもの) に懸濁した。そこに 20 μl の PCR 産物、70 μl の滅菌水を添加し、ボルテックス後、30°C で 1 時間、42°C で 15 分間インキュベートとした。遠心分離により上清を除去し、YPD 培地に懸濁した後、更に 1 時間インキュベートした。その後、必要な抗生物質 (G418, clonNAT, hygromycin B あるいは zeocin) 含む YPD 寒天培地に全量を添加し、ガラスビーズを用いて広げた。数日後、培

地上に形成されたコロニーを分取し、PCR により目的の組み換えが起こっているかを確認した。

プラスミドの作製

pRS16 が元となった Atg13 のプラスミドは、Yamamoto et al., 2016 で用いられたものを使用した。Atg12 のプラスミドは下記の通り作製した。pRS424-*ATG12* (Hanada and Ohsumi, 2005) を *SacI* および *XhoI* で切断し、*ATG12* フラグメントを同じ制限酵素で切断した pRS316 空ベクター (Sikorski and Hieter, 1989) に挿入し、pRS316-*ATG12* を作製した。その後、QuickChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) を利用して、Atg12^{AN56} 変異体 (pRS316-*atg12*^{AN56}) および Atg12^{(2-10)A} 変異体 (pRS316-*atg12*^{(2-10)A}) を作製した。これらのプラスミドから *SacI* および *XhoI* により DNA フラグメントを切り出し、pRS303 空ベクター (Sikorski and Hieter, 1989) に挿入することで、pRS303-*ATG12* と pRS303-*atg12*^{AN56} を作製した。pRS303 由来のプラスミドは *NheI* により切断後、酵母の形質転換に用いた。pRS316-*ATG18*-3HA-EGFP は研究室のストックを用いた。QuickChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) を利用して Atg18 の変異体を発現するプラスミドを作製した。本研究で使用したプラスミドは表 4 にまとめた。

蛍光顕微鏡観察

Atg5-GFP の PAS 局在および Atg17 輝点形成の蛍光顕微鏡観察には、CCD カメラ (ImagEM C9100-13、浜松ホトニクス) および 150 倍対物レンズ (UAPON 150XOTIRF, NA/ 1.45; Olympus) を搭載した倒立顕微鏡 (IX83; Olympus) を用いた。GFP と mCherry は、それぞれ 488 nm 青色レーザー (50 mW; Coherent)、588 nm 黄色レーザー (50 mW; Coherent) で励起した。蛍光は、405-nm, 488-nm, 588-nm ダイクロイックミラー (Olympus) を通し、Di02-R594-25x36 ダイクロイックミラー (Semrock) を備えた DV2 マルチチャネルイメージングシステム (Photometrics) を用いて 2 つのチャネルに分離した。GFP の蛍光は、TRF59001-EMET バ

ンドパスフィルター (Semrock)を、mCherry の蛍光には FF01-624/40-25 バンドパスフィルター(Semrock) を用いた。画像は MetaMorpho (Molecular Devices) を用いて取得し、Fiji (Image J)を用いて編集および解析を行った(Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012)。

図 11 および図 13 の蛍光顕微鏡観察には、同上 CCD カメラと 150 倍対物レンズを搭載した倒立顕微鏡 (IX71; Olympus)を用いて行った。GFP と mCherry は、それぞれ 488 nm 青色レーザー (20 mW; Spectra-Physics)、588 nm 黄色レーザー (25 mW; Cobalt)で励起した。蛍光は、ダイクロイックミラー (Di01-R488/ 561-25; Semrock)とバンドパスフィルター (Em01-R488/ 568-25; Semrock)とスプリッター (U-SUP; Olympus)を用いて 2 つのチャンネルに分離した。さらに、GFP の蛍光にはバンドパスフィルター (FF02-525/50-25; Semrock)を、mCherry の蛍光にはバンドパスフィルター (FF01-624/40-25; Semrock)を用いた。画像は AQUACOSMOS ソフト (浜松フォトニックス) から取得し、Fiji (Image J)を用いて編集および解析を行った。

イムノブロットティング

培養した細胞をペレットにし、20% トリクロロ酸 (TCA)で懸濁して 15 分氷上に静置した後、15,000g で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、ペレットを冷却したアセトンで洗浄後、室温で乾燥させ、SDS サンプルバッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.5), 2% SDS, 20 mM dithiothreitol (DTT), 10% glycerol] に懸濁して 65°C で 10 分間振盪させた。2g の 0.5-mmYZB ジルコニアビーズ (安井器械)を加えた後、FastPrep-24 (MP Biomedicals) にて細胞を破碎した。破碎した細胞から上清を回収し、3 分ボイルした後、15,000g で 1 分間遠心したものをサンプルとした。サンプルはトランスブロット Turbo ブロットティングシステム (Bio-Rad) を用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離を行い、その後 PVDF メンブレン (メルクミリポア) に転写した。転写したメンブレンに対して 2%スキムミルク溶液でブロッキングを行い、一次抗体と一晚反応させた。翌日、メンブレンを TBS-Tween にて洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)を付加した 2 次抗体と 30 分間反応させ、再度 TBS-

Tween にて洗浄を行った後、HRP 用化学発光基質 (FEMTOGLOW、フナコシ) を用いて ImageQuant LAS 4000 (GE ヘルスケア・ジャパン) にて検出を行った。本研究で使用した抗体は表 5 に示した。

GFP プロセシングアッセイ

GFP 断片を示すバンドと GFP-Atg8 全長を示すバンドの強度を合計し、GFP 断片のバンドの強度を合計で割った値を、野生株の値を 100 とした時の相対値に換算して分解率とした。バンドの定量には ImageQuant TL (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いた。

免疫沈降・質量分析

30°C で mid-log-phase ($OD_{600} = 1.6-2.0$)まで培養した細胞を回収し、1 M sobitol, 0.1 mg/mL zymolyase 100T (ナカライテスク)を含んだ YDP にて懸濁をして 90 rpm, 30°C の条件で 45 分間振盪することで細胞破碎をした。その後、1.2 M ソルビトールを含んだ 20 mM HEPES-KOH (pH7.2) で洗浄し、4°C , 15,000g で 5 分間遠心分離をした。上清除去後、1 M ソルビトールおよび 0.2 μ g/mL のラパマイシンを加えた YPD で懸濁をし、30°C で 2 h インキュベート後、回収した細胞を 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 $\times$ Complete protease inhibitor cocktail (Roche), 0.1 $\times$ PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche) , 500 nM microcystin (最後の 2 試薬は、質量分析用サンプル作製の際のみ使用した) を含む IP バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM NaF, and 10% glycerol] で懸濁した。20 分間 15,000g で遠心分離を行い、FLAG 抗体を付加した FG ビーズ (多摩川精機) に上清を加え、4°C で 2 h 転倒混和した。その後、0.1% n-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) を含んだ IP バッファーで洗浄し、反応サンプルに SDS-PAGE サンプルバッファー [50 mM Tris-HCl (pH7.5), 2% SDS, 8% glycerol, 適量のブロモフェノールブルー] を加え、65°C で 5 分間溶出を行った。その後、SDS-PAGE によってサンプルを分離後、イムノブロッティングにより検出した。

質量分析を行う際は、電気泳動後、CBB 染色をしたアクリルアミドゲルからバンドを切

り出し、サンプルとした。測定解析は、横浜市立大学の平野久先生のグループに依頼し、質量分析 (LC/MS/MS) に供した。

酵母ツーハイブリッド解析

Gal4 の転写活性化ドメイン (GAD) および DNA 結合ドメイン (GBD) に Atg タンパク質を融合して AH109 株に発現させたものを、ロイシン・トリプトファン欠損合成寒天培地、ロイシン・トリプトファン・ヒスチジン欠損合成寒天培地もしくは、ロイシン・トリプトファン・アデニン欠損合成寒天培地に撒き、30°C で 3 日間培養した。

Atg8-PE 解析

30°C で mid-log-phase ($OD_{600} = 1.6-2.0$)まで培養した細胞を回収し、1 mM PMSF で 10 分処理後、純水で洗浄し、1 mM PMSF を含んだ SD-N 培地に移して 30°C, 4 時間培養した。回収したサンプルは、イムノブロットニングにより解析した。urea-SDS-PAGE で電気泳動後、Atg8 (抗 Atg8-2 抗体)を用いて Atg8 および Atg8-PE を検出し、脂質化率を調べた。

ALP アッセイ

培養した *PHO8460* 発現細胞を回収し、ALP バッファー [250 mM Tris-HCl (pH 9.0), 10 mM $MgSO_4$, 10 μM $ZnSO_4$]で洗浄後、1 mM PMSF を含む 50 μL の ALP バッファーで再懸濁した。その後、適量のガラスビーズを添加し、4°C 冷蔵庫にて 15 分間ボルテックスすることで細胞を破碎した。細胞破碎液に 1 mM PMSF を含む 50 μL の ALP バッファーを添加してボルテックス後、10,000 rpm で 1 分間遠心分離して上清を 50 μL 回収した。上清 10 μL に対して ALP バッファーを 40 μL 加えたものをサンプルとし、50 μL の 11 mM α -naphthyl phosphate を加えて 30°C, 10 分間反応させた。その後、100 μL のストップバッファー [2 M glycine-NaOH (pH 11.0)] を加えて反応を停止させた。蛍光はマルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific)にて測定した (Ex. 345 nm, Em. 472

nm)。サンプルのタンパク質濃度は、Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。窒素飢餓にさらした野生株の値を 100 とした時の、タンパク質あたりの蛍光量を ALP 活性値として算出した (Noda and Klionsky, 2008; Noda et al., 1995)。

参考文献

- Araki, Y., Ku, W.-C., Akioka, M., May, A.I., Hayashi, Y., Arisaka, F., Ishihama, Y., and Ohsumi, Y. (2013). Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J. Cell Biol.* 203, 299–313.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 182, 685–701.
- Bartel, B., Wüning, I., and Varshavsky, A. (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J.* 9, 3179–3189.
- Barth, H., Meiling-Wesse, K., Eppe, U.D., and Thumm, M. (2001). Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require Aut10p. *FEBS Lett.* 508, 23–28.
- Baskaran, S., Ragusa, M.J., Boura, E., and Hurley, J.H. (2012). Two-site recognition of phosphatidylinositol 3-phosphate by PROPPINs in autophagy. *Mol. Cell* 47, 339–348.
- Bento, C.F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2016). Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.* 85, 685–713.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.*
- Brown, W.J., DeWald, D.B., Emr, S.D., Plutner, H., and Balch, W.E. (1995). Role for phosphatidylinositol 3-kinase in the sorting and transport of newly synthesized lysosomal enzymes in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 130, 781–796.
- Chan, E.Y.W., Kir, S., and Tooze, S.A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 25464–25474.

Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., and Hershko, A. (1982). “Covalent affinity” purification of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.* 257, 2537–2542.

Conchon, S., Cao, X., Barlowe, C., and Pelham, H.R. (1999). Got1p and Sft2p: membrane proteins involved in traffic to the Golgi complex. *EMBO J.* 18, 3934–3946.

Dikic, I., and Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 349–364.

Dove, S.K., Piper, R.C., McEwen, R.K., Yu, J.W., King, N.C., Hughes, D.C., Thuring, J., Holmes, A.B., Cooke, F.T., Michell, R.H., et al. (2004). Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors. *EMBO J.* 23, 1922–1933.

de Duve, C., and Wattiaux, R. (2003). Functions of Lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435–492.

Fujioka, Y., Suzuki, S.W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Noda, N.N. (2014). Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 513–521.

Fujita, N., Matsunaga, K., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). [Molecular mechanism of autophagosome formation in mammalian cells]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 53, 2106–2110.

Haas, A.L., Warms, J. V, Hershko, A., and Rose, I.A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* 257, 2543–2548.

Hanada, T., and Ohsumi, Y. (2005). Structure-function relationship of Atg12, a ubiquitin-like modifier essential for autophagy. *Autophagy* 1, 110–118.

Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 37298–37302.

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S.-I., Natsume, T., Guan, J.-L., and Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 181, 497–510.

Harada, K., Kotani, T., Kirisako, H., Sakoh-Nakatogawa, M., Oikawa, Y., Kimura, Y., Hirano, H., Yamamoto, H., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2019). Two distinct mechanisms target the autophagy-related E3 complex to the pre-autophagosomal structure. *Elife* 8.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* 11, 1433–1437.

Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905–909.

Hershko, A. (1983). Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* 34, 11–12.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488–492.

Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6, 764–776.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., and Mizushima, N. (2012). Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J. Cell Sci.* 125, 1488–1499.

James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436.

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21,

947–962.

Jones, E.W. (1991). Tackling the Protease Problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 194, 428–453.

Juris, L., Montino, M., Rube, P., Schlotterhose, P., Thumm, M., and Krick, R. (2015). PI3P binding by Atg21 organises Atg8 lipidation. *EMBO J.* 34, 955–973.

Kabeya, Y., Noda, N.N., Fujioka, Y., Suzuki, K., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2009).

Characterization of the Atg17-Atg29-Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 612–615.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150, 1507–1513.

Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 22284–22291.

Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 152, 519–530.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435–446.

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). 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.

Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., and Seglen, P.O. (2007). Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 3, 181–206.

- Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2018). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 10363–10368.
- Krick, R., Tolstrup, J., Appelles, A., Henke, S., and Thumm, M. (2006). The relevance of the phosphatidylinositolphosphat-binding motif FRRGT of Atg18 and Atg21 for the Cvt pathway and autophagy. *FEBS Lett.* *580*, 4632–4638.
- Krick, R., Henke, S., Tolstrup, J., and Thumm, M. (2008). Dissecting the localization and function of Atg18, Atg21 and Ygr223c. *Autophagy* *4*, 896–910.
- Krick, R., Busse, R.A., Scacioc, A., Stephan, M., Janshoff, A., Thumm, M., and Kühnel, K. (2012). Structural and functional characterization of the two phosphoinositide binding sites of PROPPINs, a β -propeller protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2042-9.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2002). Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* *277*, 18619–18625.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* *10*, 457–468.
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *192*, 245–250.
- Meiling-Wesse, K., Barth, H., Voss, C., Eskelinen, E.-L., Epple, U.D., and Thumm, M. (2004). Atg21 is required for effective recruitment of Atg8 to the preautophagosomal structure during the Cvt pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 37741–37750.
- Mizushima, N. (2018). A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat. Cell Biol.* *20*, 521–527.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (1998). A new protein conjugation

system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* *273*, 33889–33892.

Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* *18*, 3888–3896.

Munn, A.L., and Riezman, H. (1994). Endocytosis is required for the growth of vacuolar H⁺-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J. Cell Biol.* *127*, 373–386.

Nair, U., Cao, Y., Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Roles of the lipid-binding motifs of Atg18 and Atg21 in the cytoplasm to vacuole targeting pathway and autophagy. *J. Biol. Chem.* *285*, 11476–11488.

Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* *130*, 165–178.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458–467.

Nakatogawa, H., Ohbayashi, S., Sakoh-Nakatogawa, M., Kakuta, S., Suzuki, S.W., Kirisako, H., Kondo-Kakuta, C., Noda, N.N., Yamamoto, H., and Ohsumi, Y. (2012). 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.

Nishimura, T., Kaizuka, T., Cadwell, K., Sahani, M.H., Saitoh, T., Akira, S., Virgin, H.W., and Mizushima, N. (2013). FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Rep.* *14*, 284–291.

Noda, T., and Klionsky, D.J. (2008). The quantitative Pho8Delta60 assay of nonspecific autophagy. *Methods Enzymol.* *451*, 33–42.

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* *273*, 3963–3966.

Noda, T., Matsuura, A., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1995). Novel system for monitoring autophagy

in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *210*, 126–132.

Noda, T., Kim, J., Huang, W.P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J. Cell Biol.* *148*, 465–480.

Obara, K., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2006). Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes--Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1527–1539.

Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., and Ohsumi, Y. (2008). The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.* *283*, 23972–23980.

Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* *24*, 9–23.

Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., and Tooze, S.A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1860–1873.

Peters, J.M., King, R.W., Höög, C., and Kirschner, M.W. (1996). Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* *274*, 1199–1201.

Powers, J., and Barlowe, C. (1998). Transport of axl2p depends on erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila* cornichon gene product. *J. Cell Biol.* *142*, 1209–1222.

Powers, J., and Barlowe, C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* *13*, 880–891.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2006). Atg9 sorting from mitochondria is impaired in early secretion and VFT-complex mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* *119*, 2903–2911.

Robinson, D.G., Hinz, G., and Holstein, S.E. (1998). The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol. Biol.* *38*, 49–76.

Sakoh-Nakatogawa, M., Matoba, K., Asai, E., Kirisako, H., Ishii, J., Noda, N.N., Inagaki, F.,

- Nakatogawa, H., and Ohsumi, Y. (2013). Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 433–439.
- Scheffner, M., and Al., E. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP Complex Functions as a Ubiquitin-protein Ligase in the Ubiquitination of p53. Cortes D. Acetogenins from Annonaceae, Inhibitors of Cell. *75*, 495–505.
- Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* *373*, 81–83.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* *9*, 671–675.
- Schu, P. V, Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., and Emr, S.D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* *260*, 88–91.
- Seaman, M.N., Marcusson, E.G., Cereghino, J.L., and Emr, S.D. (1997). Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J. Cell Biol.* *137*, 79–92.
- Shima, T., Kirisako, H., and Nakatogawa, H. (2019). COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes. *J. Cell Biol.* DOI: 10.1083/jcb.201809032
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.* *18*, 5234–5241.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of. DNA *Saccharomyces Cerevisiae*, *Genet.* *122*, 19–27.
- Stack, J.H., and Emr, S.D. (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple

specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J. Biol. Chem.* *269*, 31552–31562.

Stack, J.H., Herman, P.K., Schu, P. V, and Emr, S.D. (1993). A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J.* *12*, 2195–2204.

Stack, J.H., DeWald, D.B., Takegawa, K., and Emr, S.D. (1995). Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J. Cell Biol.* *129*, 321–334.

Strømhaug, P.E., Reggiori, F., Guan, J., Wang, C.-W., and Klionsky, D.J. (2004). Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3553–3566.

Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* *12*, 209–218.

Suzuki, N.N., Yoshimoto, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2005). The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* *1*, 119–126.

Suzuki, S.W., Yamamoto, H., Oikawa, Y., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., and Ohsumi, Y. (2015). Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 3350–3355.

Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* *119*, 301–311.

Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E. (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1367–1379.

Thomas, B.J., and Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active

DNA. Cell.

Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174.

van der Vaart, A., Griffith, J., and Reggiori, F. (2010). Exit from the Golgi is required for the expansion of the autophagosomal phagophore in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 21, 2270–2284.

Velikkakath, A.K.G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., and Mizushima, N. (2012). Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* 23, 896–909.

Watanabe, Y., Kobayashi, T., Yamamoto, H., Hoshida, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Noda, N.N. (2012). Structure-based analyses reveal distinct binding sites for Atg2 and phosphoinositides in Atg18. *J. Biol. Chem.* 287, 31681–31690.

Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., and Ohsumi, Y. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 198, 219–233.

Yamamoto, H., Fujioka, Y., Suzuki, S.W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Ando, T., Noda, N.N., et al. (2016). The Intrinsically Disordered Protein Atg13 Mediates Supramolecular Assembly of Autophagy Initiation Complexes. *Dev. Cell* 38, 86–99.

Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 124–131.

Young, A.R.J. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* 119, 3888–3900.

Zachariae, W., Shin, T.H., Galova, M., Obermaier, B., and Nasmyth, K. (1996). Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 274, 1201–1204.

表

表 1 質量分析によって同定された主な Atg16 複合体結合タンパク質

Arl3	ADP リボシル化酵素
Cue4	機能未知タンパク質
Emp47	COPII 小胞に含まれる膜タンパク質
Erv14	COPII 小胞に含まれる膜タンパク質
Fmp10	機能未知ミトコンドリアタンパク質
Gos1	ゴルジ体 SNAP 構成タンパク質
Mrh1	細胞膜に局在するタンパク質
Opy2	高浸透圧応答経路に関わる膜タンパク質
Rcr2	液胞タンパク質
Sft2	エンドソームからゴルジ体への輸送に関わる膜タンパク質
Skg1	細胞膜でのポリマー組成に関わる膜タンパク質
Sna3	MVB 輸送に関わるタンパク質
Svp26	COPII 小胞に含まれる膜タンパク質
Ycl012c	機能未知タンパク質
Ycl049c	機能未知タンパク質
Ycr043c	機能未知タンパク質
Ydr090c	機能未知膜タンパク質
Yet3	ER 膜タンパク質
Yfl042c	ステロール転移酵素
Ykl063c	機能未知タンパク質
Ykl077w	機能未知タンパク質
Ylr072w	ステロール転移酵素
Ylr297w	機能未知液胞タンパク質
Ylr413w	細胞膜タンパク質
Ymr124w	機能未知タンパク質
Ymr010w	機能未知膜タンパク質
Ynr061c	機能未知液胞膜タンパク質
Ypl257w	機能未知膜タンパク質
Atg1	タンパク質キナーゼ/ Atg1 複合体構成因子
Atg8	PE と結合するユビキチン様タンパク質
Atg11	選択的オートファジーで働くアダプタータンパク質
Atg13	Atg1 複合体構成因子
Atg17	Atg1 複合体構成因子
Atg19	Cvt 経路で働くレセプタータンパク質

Atg29	Atg1 複合体構成因子
Atg34	Cvt 経路で働くレセプタータンパク質

表 2 本研究に用いたオリゴ DNA

No	プライマー名	詳細
1	Atg12ΔN56 Fw	TGAACCAATGACAGTatgCTTGGTTTGGCGAGTGACAT
2	Atg12ΔN56 Rv	ACTGTCATTGGTTCACTCTACTGTAGAATATACAG
3	Atg12(2-10)A Fw	AGTATGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTACA
4	Atg12(2-10)A Rv	TTCTGTAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCAT
5	ATG18 mutation1 Fw	GCTGCCGCGATTGCTTTCAATCAAACCGGAACG
6	ATG18 mutation1 Rv	AGCAATCGCGGCAGCAGTAGGTGATGAATCAGA
7	ATG18 mutation2 Fw	TGTGCTCCCGCTGGAAAATTTATTTCAGAGGAC
8	ATG18 mutation2 Rv	TCCAGCGGGAGCACAAATTGAATATTTGAAACC
9	ATG18 mutation3 Fw	GCTGCCGCGAGCGGCTAACACCGCTGCCCTAGCTGCCGCAATAGAAACAAACCCTAACCCAC GTGGCC
10	ATG18 mutation3 Rv	TGCGGCAGCTAGGGCAGCGGTGTTAGCCGCTGCGGCAGCAATCTGCTCTTGTAAGTACC ACCAATCG
11	ATG18 mutation4 Fw	GCTGCCAACCCCTGCTCCACGTGGCGCTATGGCTATGTCTCCTTCG
12	ATG18 mutation4 Rv	AGCGCCACGTGGAGCAGGGTTGGCAGCTATAGTATGCAATAGTCTCATGG
13	ATG18 mutation5 Fw	GCTGGTGCTGCCGAGTAGCTGCCTTGGAACATTACAGCCA
14	ATG18 mutation5 Rv	GGCAGCTACGATGGCAGCACCAGCCTTTATTATACTGCTGTTACCGCCG
15	ATG18 mutation6 Fw	GCTGTTACAGCTTTGGCTGCCTCCTCGGCTGCCGCAAAAGCTGCCAACTTCCCGTTGAAA CCAATTCCC
16	ATG18 mutation6 Rv	GGCAGCCGCTGCGGCAGCCGAGGAGGCAGCCAAAGCTGTAACAGCGATGGGGAAAATCTG ACCCAATGTT
17	ATG18 mutation7 Fw	GCTATGGTCCCCATCAGGCGTGTGCTGCCGATGGATACCTATACAAC

18	ATG18 mutation7 Rv	GGCAGCAACAGCCCTGATGGGGACCATAGCCATAACAGGCTCATGGTAGGACTCT
19	ATG18 mutation8 Fw	GCTGCCGCAGCGGCTTTAATATTGTCACAGGCTGCCATCTTGATGGAT
20	ATG18 mutation8 Rv	GGCAGCCTGTGACAATATTAAAGCCGCTGCGGCAGCCTCCGGGTCCATAACAAAAGTTGTAT

表 3 本研究に用いた出芽酵母株

Name	Genotype	Reference
W303-1a	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(Thomas and Rothstein, 1989)
ScKH146	W303-1A, <i>ade2::ADE2 ATG5-EGFP::kanMX6</i> <i>ATG17-2×mCherry::hphNT1</i>	本研究
ScKH153	ScKH146 <i>atg16Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH182	ScKH146 <i>atg21Δ::zeoNT3</i>	本研究
ScKH151	ScKH146 <i>atg14Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH149	ScKH146 <i>atg12Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH162	ScKH146 <i>atg14Δ::natNT2 atg12Δ::zeoNT3</i>	本研究
ScTK623	ScKH146 <i>atg21Δ::natNT2 atg12Δ::zeoNT3</i>	本研究
BJ2168	<i>MATa leu2 trp1 ura3-52 prb1-1122 pep4-3 prc1-407 gal2</i>	(Jones, 1991)
MAN169	BJ2168 <i>ATG5-TEV-3×FLAG::kanMX4</i>	本研究
ScKH10	MAN169 <i>atg16Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH32	MAN169 <i>atg12Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH96	MAN169 <i>atg10Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH90	BJ2168 <i>ATG16-TEV-3×FLAG::kanMX4</i>	本研究
ScKH92	ScKH90 <i>atg5Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH93	ScKH90 <i>atg12Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH141	MAN169 <i>atg1Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH99	MAN169 <i>atg13Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH216	MAN169 <i>atg17Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH101	MAN169 <i>atg29Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH143	MAN169 <i>atg31Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH98	MAN169 <i>atg14Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH97	MAN169 <i>atg11Δ::natNT2</i>	本研究
ScYH3184	BJ2168 <i>leu2::LEU2</i>	本研究
ScKH66	ScHY3184 <i>ATG5-TEV-3×FLAG::kanMX4</i>	本研究
ScKH68	ScHY3184 <i>atg1^{D211A}::hphNT1 ATG5-TEV-3×FLAG::kanMX4</i>	本研究
ScTK649	ScTK623 <i>his3::pRS303</i>	本研究
ScTK650	ScTK623 <i>his3::pRS303-ATG12</i>	本研究
ScTK651	ScTK623 <i>his3::pRS303-atg12^{ΔN56}</i>	本研究

BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
ScTK557	BY4741 <i>pho8::kanMX4- P_{GPD}-pho8Δ60 atg12Δ::natNT2</i>	本研究
ScTK559	BY4741 <i>pho8::kanMX4- P_{GPD}-pho8Δ60 atg21Δ::zeoNT3 atg12Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH119	W303-1A, <i>ade2::ADE2 ATG17-EGFP::kanMX4 atg11Δ::zeoNT3</i>	本研究
ScKH121	ScKH119 <i>atg5Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH123	ScKH119 <i>atg12Δ::natNT2</i>	本研究
ScKH125	ScKH119 <i>atg16Δ::natNT2</i>	本研究
ScTK657	YKH123 <i>his3::pRS303</i>	本研究
ScTK658	YKH123 <i>his3::pRS303-ATG12</i>	本研究
ScTK659	YKH123 <i>his3::pRS303-atg12^{ΔN56}</i>	本研究

表 4 本研究に用いたプラスミド

No.	プラスミド名	ソース
1	pRS316	研究室ストック
2	pRS316-ATG12	本研究
3	pRS316-ATG12 (Δ N56)	本研究
4	pRS316-ATG12 (2-10A)	本研究
5	pRS303	研究室ストック
6	pRS303-ATG12	本研究
7	pRS303-ATG12 (Δ N56)	本研究
8	pRS316-ATG13	Yamamoto et al., 2016
9	pRS316-ATG13 (F375A)	Yamamoto et al., 2016
10	pRS316-ATG13 (F430A)	Yamamoto et al., 2016
11	pRS316-Atg18-3HA-EGFP	研究室ストック
12	pRS316-Atg18 (mutation#1/8-10A N12A) -3HA-EGFP	本研究
13	pRS316-Atg18 (mutation#2/E34A F36A) -3HA-EGFP	本研究
14	pRS316-Atg18 (mutation#3/114-118A M121A R122A 124-126A) -3HA-EGFP	本研究
15	pRS316-Atg18 (mutation#4/E128A T129A N132A L136A) -3HA-EGFP	本研究
16	pRS316-Atg18 (mutation#5/N224A 226-228A F230A N231A) -3HA-EGFP	本研究
17	pRS316-Atg18 (mutation#6/K401A S404A L406A E407A 410-412A S414A L415A) -3HA-EGFP	本研究
18	pRS316-Atg18 (mutation#7/K463A V469R S471A S472A) -3HA-EGFP	本研究
19	pRS316-Atg18 (mutation#8/485-489A Y495A S496A) -3HA-EGFP	本研究

表 5 本研究に用いた抗体

No.	抗体名	ソース	2 次抗体
1	抗 FLAG 抗体	SIGMA	マウス
2	抗 HA 抗体	Roche	マウス
3	抗 Pgk1 抗体	invitrogen	マウス
4	抗 Atg1 抗体	当研究室	ラビット
5	抗 Atg2 抗体	当研究室	ラビット
6	抗 Atg3 抗体	当研究室	ラビット
7	抗 Atg5 抗体	当研究室	ラビット
8	抗 Atg7 抗体	当研究室	ラビット
9	抗 Atg2 抗体	当研究室	ラビット
10	抗 Atg12 抗体	当研究室	ラビット
11	抗 Atg13 抗体	当研究室	ラビット
12	抗 Atg17 抗体	当研究室	ラビット
13	抗 Atg18 抗体	当研究室	ラビット
14	抗 Atg29 抗体	当研究室	ラビット
15	抗 Atg31 抗体	当研究室	ラビット

図

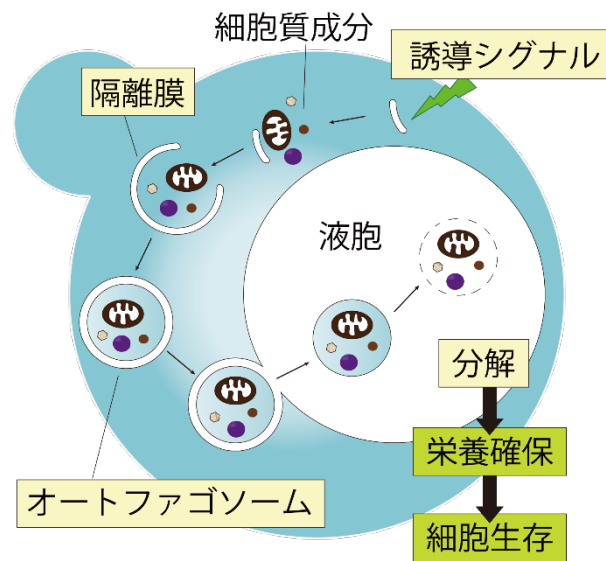


図 1 出芽酵母におけるオートファジーのモデル図

オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる膜構造体が細胞質中出现し、伸張する過程で細胞質成分を覆い囲む。この構造体は、オートファゴソームと呼ばれ、二重膜構造を有する。オートファゴソームは、液胞に運ばれ、液胞内の分解酵素によって分解される。

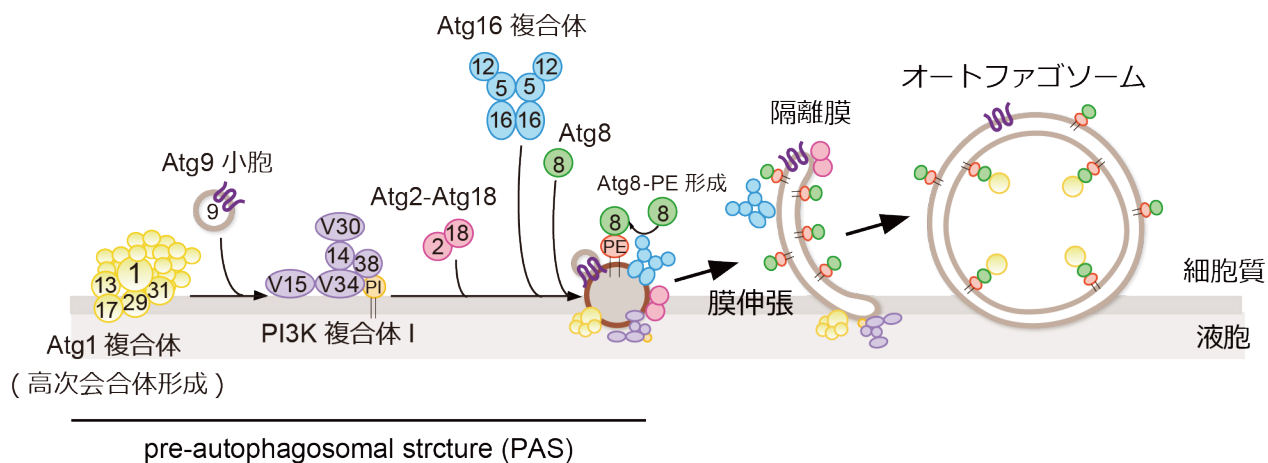


図2 オートファゴソームの形成機構

オートファジーの誘導に伴い、各 Atg タンパク質ユニットが液胞近傍の 1 点に集合し、pre-autophagosomal structure (PAS) と呼ばれる集合体を構築する。PAS はオートファゴソームの前駆体である。

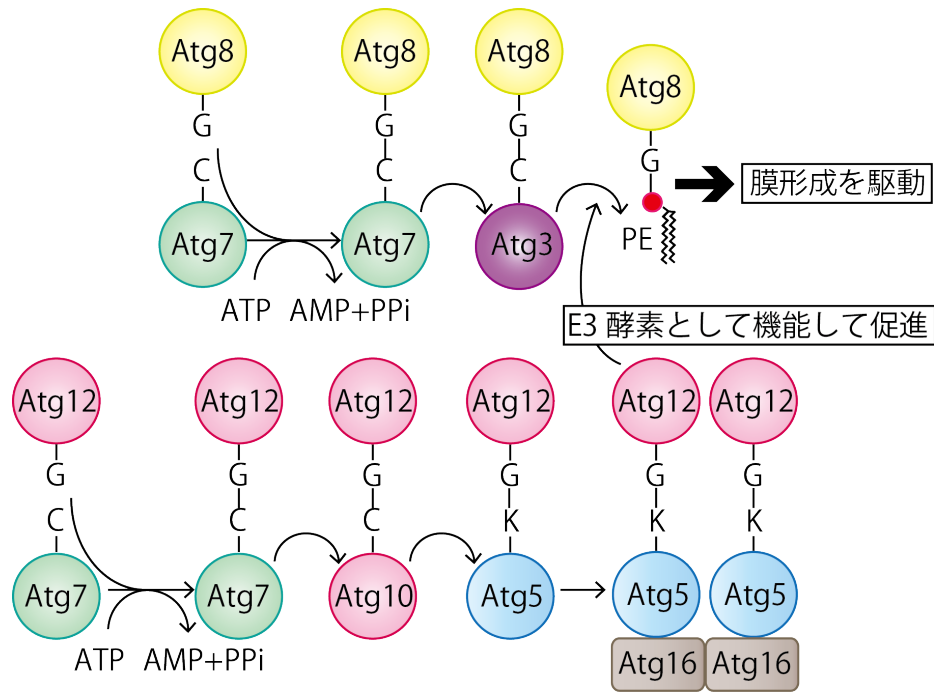


図 3 Atg12 結合反応系、Atg8 結合反応系のモデル図

ユビキチン様反応系は ATP 依存的に起こる反応系である。Atg12 C 末端のグリシンが E1 様酵素 Atg7 によってチオエステル化され、E2 様酵素である Atg10 に渡される。続いて、Atg5 の 149 番目のリジン残基と共有結合を形成し、更に Atg16 と複合体を組むことで Atg16 のコイルドコイルを介した二量体として存在する。

Atg12-Atg5-Atg16 複合体 (Atg16 複合体) は、Atg8 結合反応系における E3 様酵素として働く。Atg8 は翻訳された後、システインプロテアーゼである Atg4 によって C 末端のアルギニンを切断され、グリシンが露出する。その後、E1 様酵素 Atg7 によって活性化され、E2 様酵素である Atg3 と結合する。続いて、Atg8 は Atg3 からリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) へと渡され、Atg8-PE を形成する。Atg16 複合体はこの Atg8 の PE への転移反応を促進する。Atg8-PE はオートファゴソーム形成において膜形成を駆動する役割を持つ。

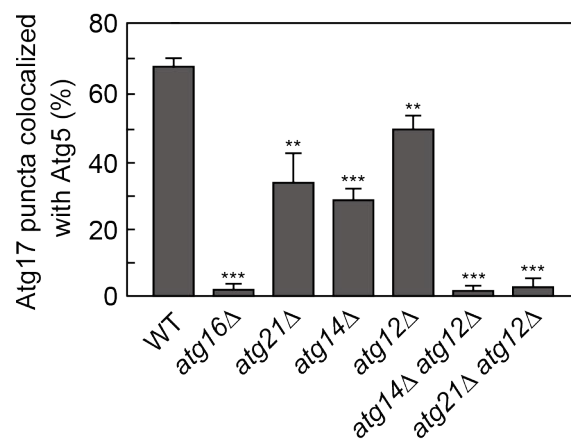
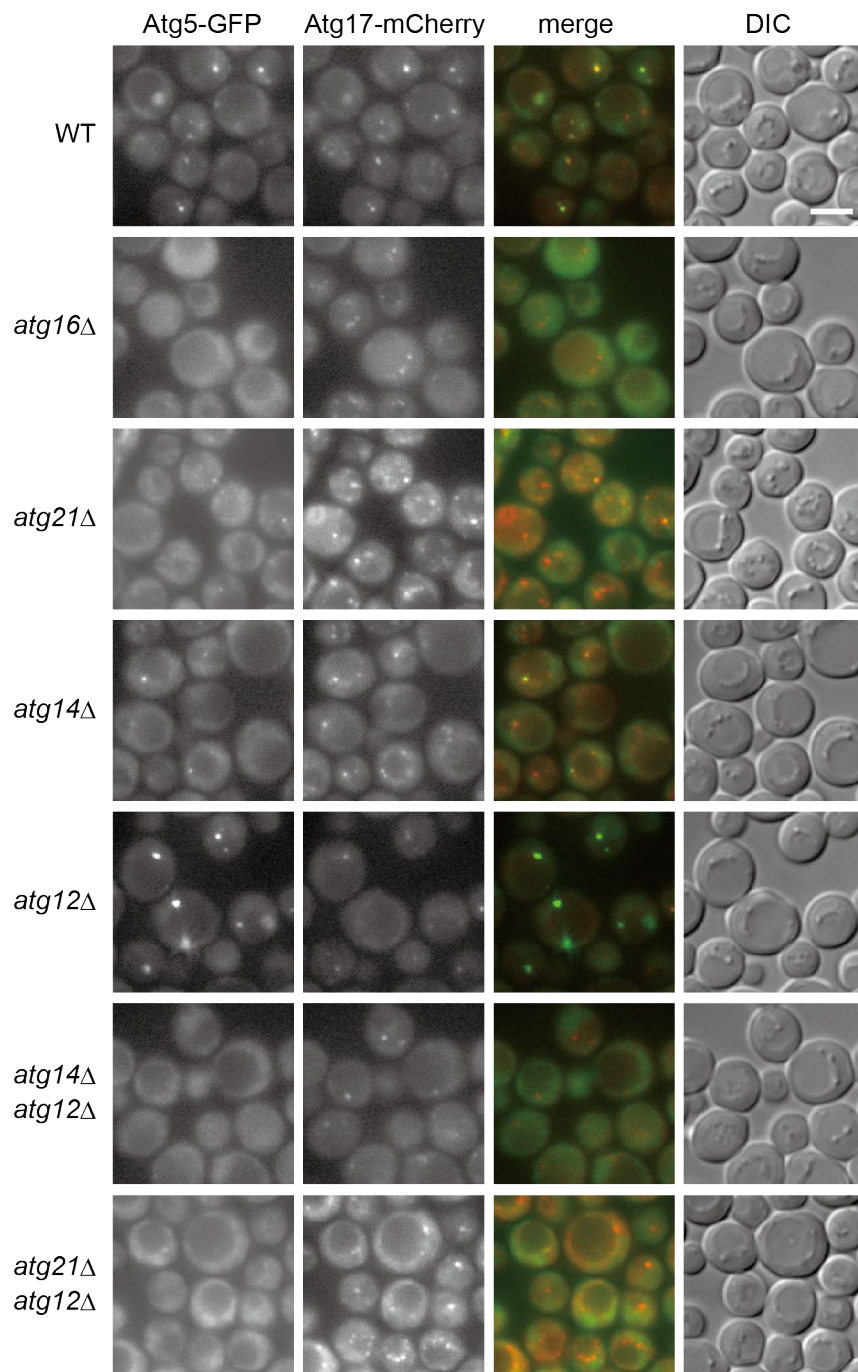


図4 Atg16 複合体の PAS 局在には PI3P 依存的な経路と Atg12 依存的な経路がある

Atg5-GFP および Atg17-mCherry を発現させた細胞を 90 分ラパマイシン処理し、蛍光顕微鏡にて観察した。50 個以上の Atg17-mCherry の輝点に対して、Atg17-mCherry と共局在する Atg5-GFP の割合を算出し、記した。観察は $n=3$ で行い、 P 値は unpaired two-tailed Student's t -test により算出した (** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。スケールバー、5 μm 。

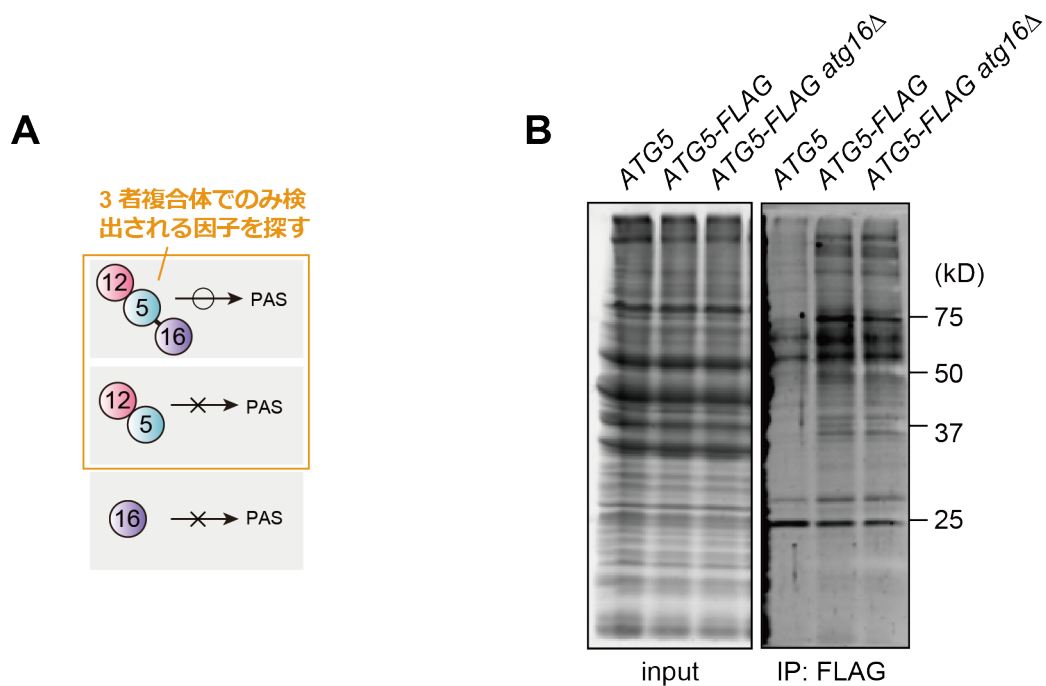


図 5 質量分析による Atg16 複合体と相互作用するタンパク質同定の戦略

(A) Atg16 複合体の PAS への局在様式。Atg12-Atg5 結合体または Atg16 単独では PAS に局在することはできない。複合体として存在している状態でのみ相互作用する因子が、Atg16 複合体の PAS 局在に関与する可能性がある。

(B) Atg5-FLAG を発現する酵母株を YPD 培地で培養し、スフェロプラスト化した。ラパマイシン添加から 2 時間後に細胞を回収した。1% DDM を加え細胞を溶解し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降産物を SDS-PAGE により分離後、タンパク質染色液である SYPRO® Ruby で染色した。

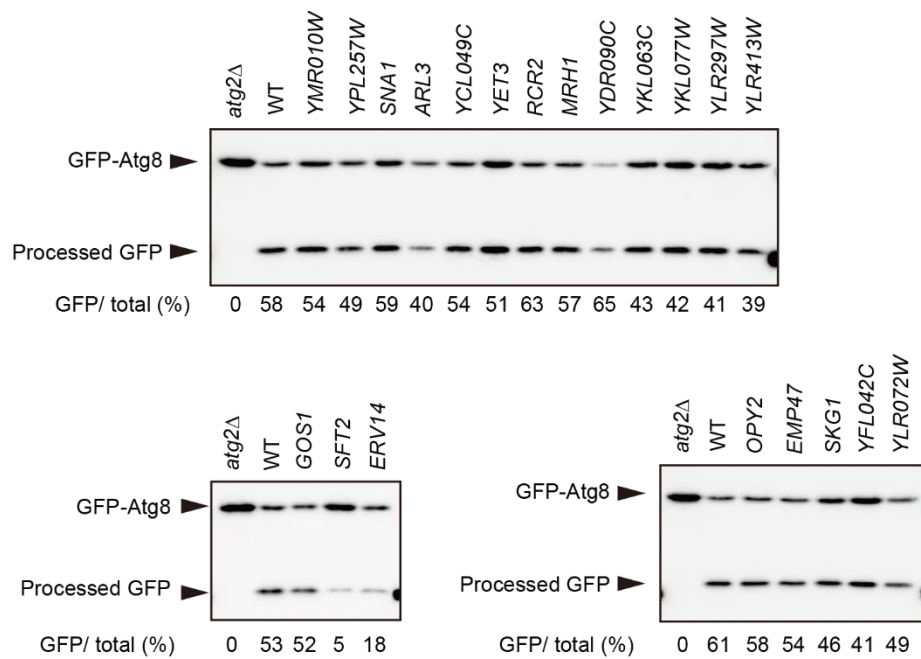


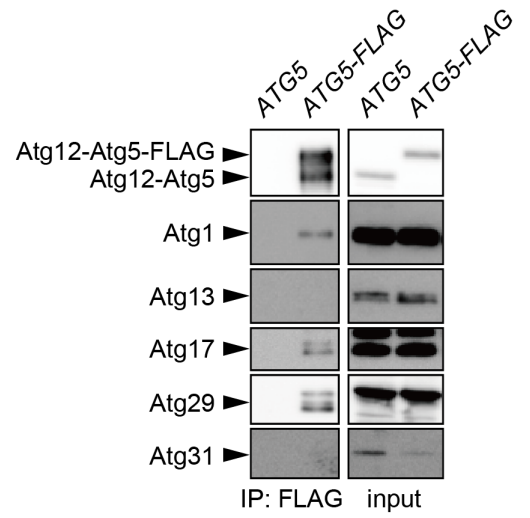
図 6 Atg16 複合体の相互作用候補の GFP-Atg8 プロセシングアッセイ

GFP-Atg8 を発現する株を SD+CA 培地で培養し、窒素飢餓培地に移行した。GFP-Atg8 のプロセシングを抗 GFP 抗体を用いてイムノブロッティングにより検出した。

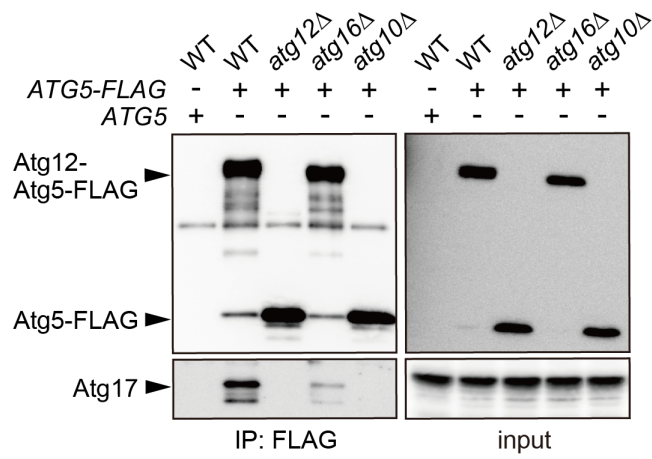
A MASCOT scores in mass spectrometry

protein name	<i>ATG5</i>	<i>ATG5-FLAG</i>	
	<i>ATG16</i>	<i>ATG16</i>	<i>atg16Δ</i>
Atg1	0	86	0
Atg8	0	99	0
Atg11	0	105	0
Atg13	0	59	0
Atg17	0	158	0
Atg19	0	670	0
Atg29	0	88	0
Atg34	0	142	0

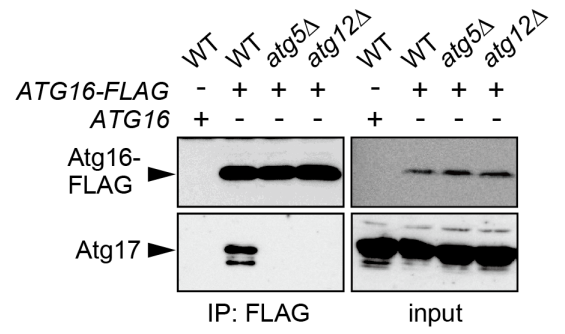
B



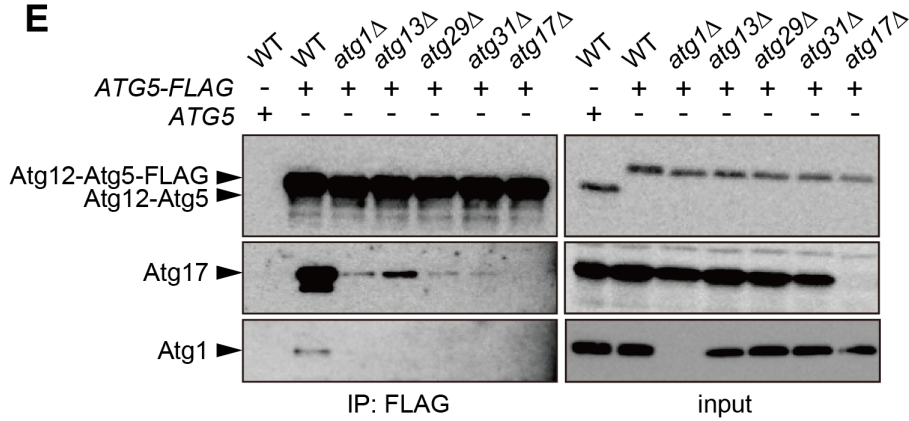
C



D



E



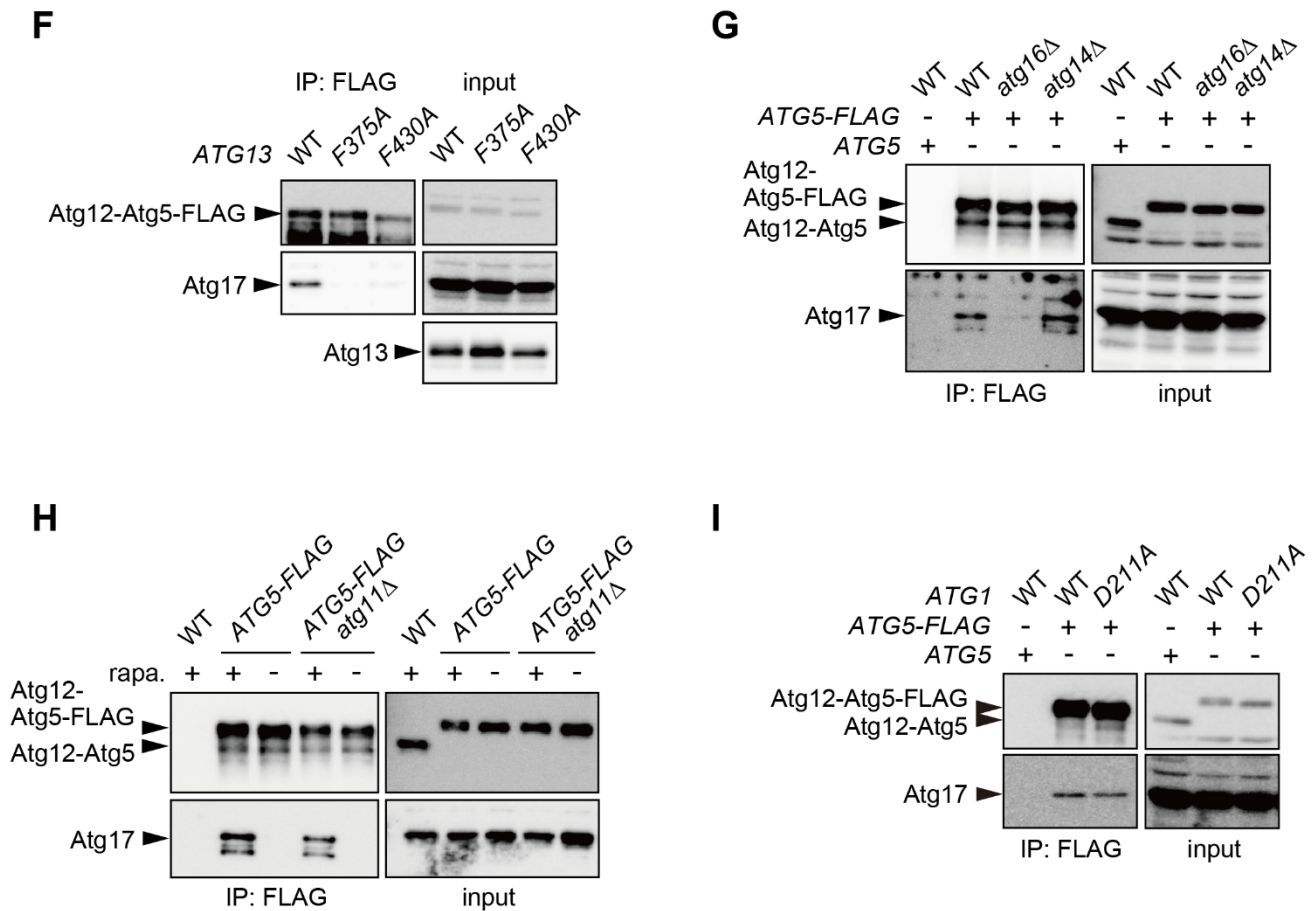


図 7 Atg16 複合体は Atg1 複合体と相互作用する

(A) Atg5-FLAG の免疫沈降産物を質量分析で分析した。図には、各 Atg タンパク質の MASCOT スコアが記されている。グレーで塗られている Atg タンパク質は、Atg1 複合体の構成因子である。

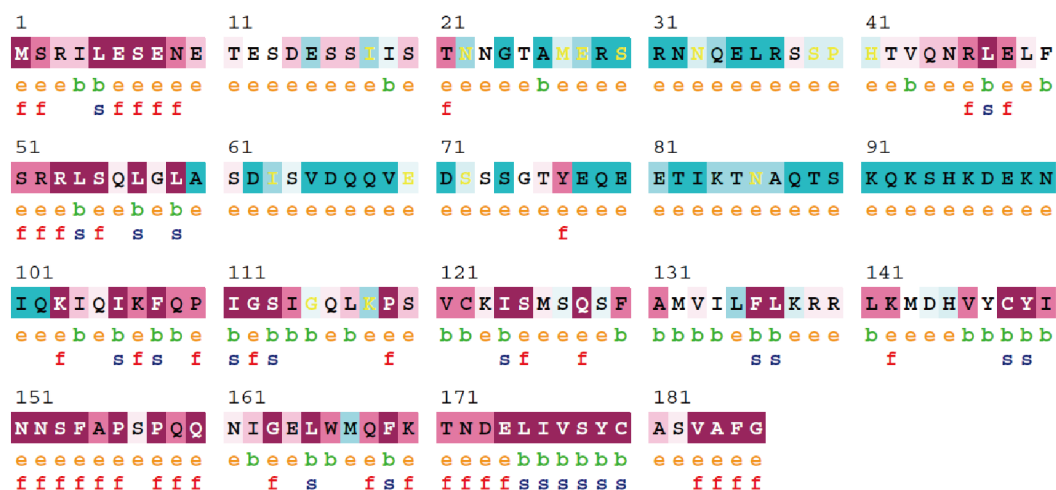
(B-E, G) Atg5-FLAG (B, C, E, G) あるいは Atg16-FLAG (D) を発現した酵母株について、ラパマイシン処理を2時間行い、抗 FLAG ビーズを用いた共免疫沈降を行った。共免疫沈降産物は、抗 FLAG 抗体、Atg12 抗体、Atg17 抗体、Atg1 抗体、Atg13 抗体、Atg29 抗体、Atg31 抗体を用いて、イムノブロットニングによって解析した。

(F) 野生型 Atg13、Atg13^{F375A} 変異体、および Atg13^{F430A} 変異体を発現した *atg13Δ* 細胞について、ラパマイシン処理を2時間行い、抗 FLAG ビーズを用いた共免疫沈降を行った。共免疫沈降産物は、抗 Atg12 抗体、Atg13 抗体、Atg17 抗体を用いて、イムノブロットニングによって解析した。

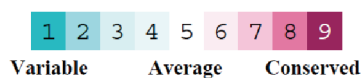
(H) Atg5-FLAG を発現した酵母株について、ラパマイシンを添加あるいは添加せず、2 時間処理した。免疫沈降および免疫沈降産物の解析については、図 7E と同様である。

(I) Atg1 あるいは Atg1^{D211A} 変異体を発現した酵母株について、Atg17 と Atg5-FLAG の共免疫沈降を解析した。方法は図 7E と同様である。

A



The conservation scale:



- e - An exposed residue according to the neural-network algorithm.
- b - A buried residue according to the neural-network algorithm.
- f - A predicted functional residue (highly conserved and exposed).
- s - A predicted structural residue (highly conserved and buried).
- X - Insufficient data - the calculation for this site was performed on less than 10% of the sequences.

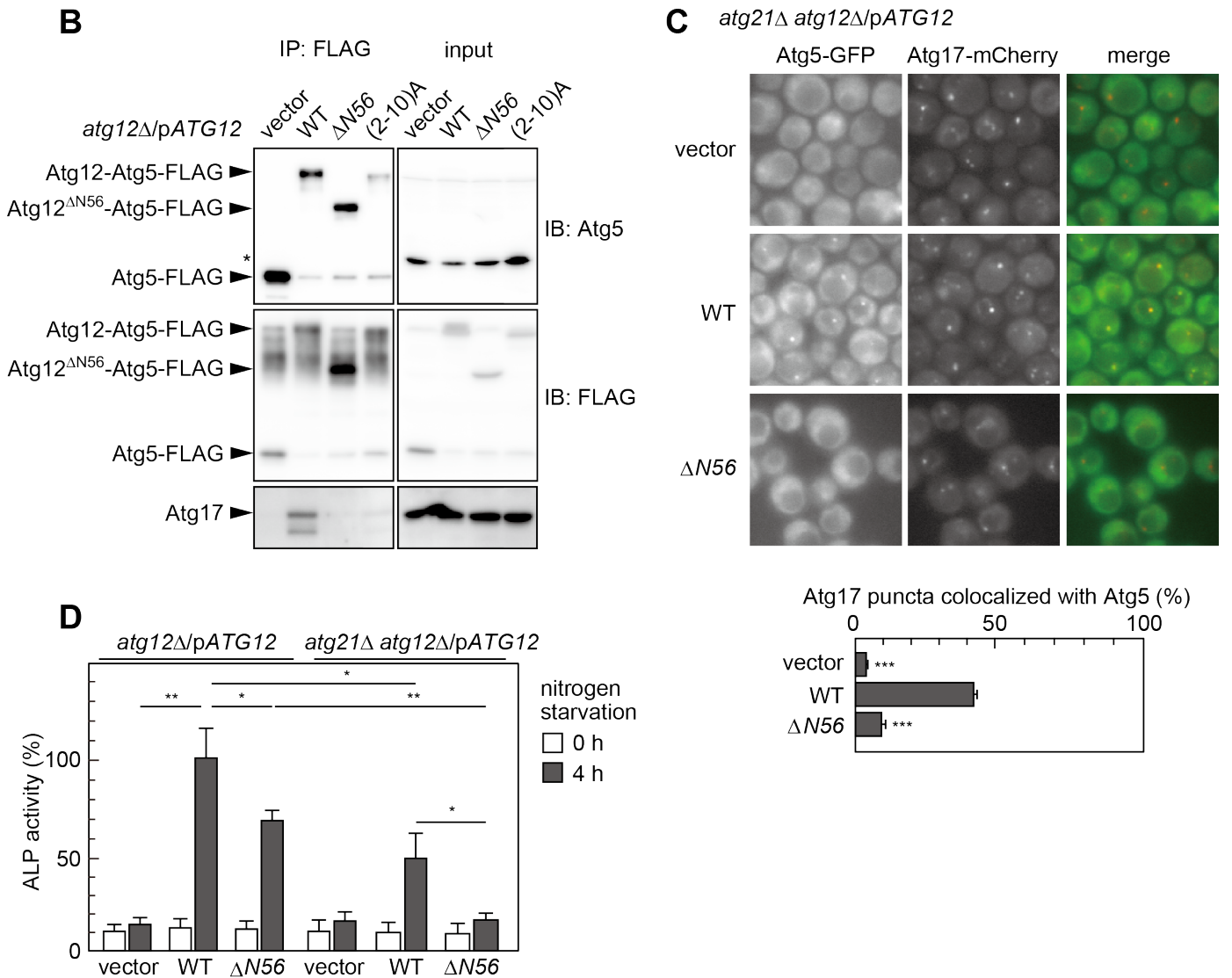


図 8 Atg16 複合体は Atg12 の N 末端を介して Atg1 複合体と相互作用する

(A) Consurf サーバーにより作成した Atg12 ホモログのアミノ酸配列のアライメント。保存性の高い残基は紫で、保存性の低い残基は青で示した。

(B) 野生型 Atg12、Atg12 $\Delta N56$ あるいは Atg12 $(2-10)^A$ を発現した *atg12Δ* 細胞についてラパマイシン処理を 2 時間行い、図 7E 同様に Atg17 と Atg5-FLAG の共免疫沈降を行った。*は非特異的なバンドである。

(C) Atg5-GFP を発現した *atg21Δ atg12Δ* 細胞について、ラパマイシン処理を 2 時間行い、Atg5-GFP の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。100 個以上の Atg17-mCherry の輝点に対して、Atg17-mCherry と共局在する Atg5-GFP の割合を算出し、記した。観察は $n=3$ で行い、 P 値は unpaired two-tailed Student's t -test により算出した (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。スケールバー、5 μm 。

(D) 野生型 Atg12 あるいは Atg12 $\Delta N56$ を発現した *atg12Δ*、および *atg21Δ atg12Δ* 細胞について、窒素飢餓に 4 時間さらし、オートファジー活性を測定した。3 回測定の平均値が示されている。 P 値は unpaired two-tailed Student's t -test により算出した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

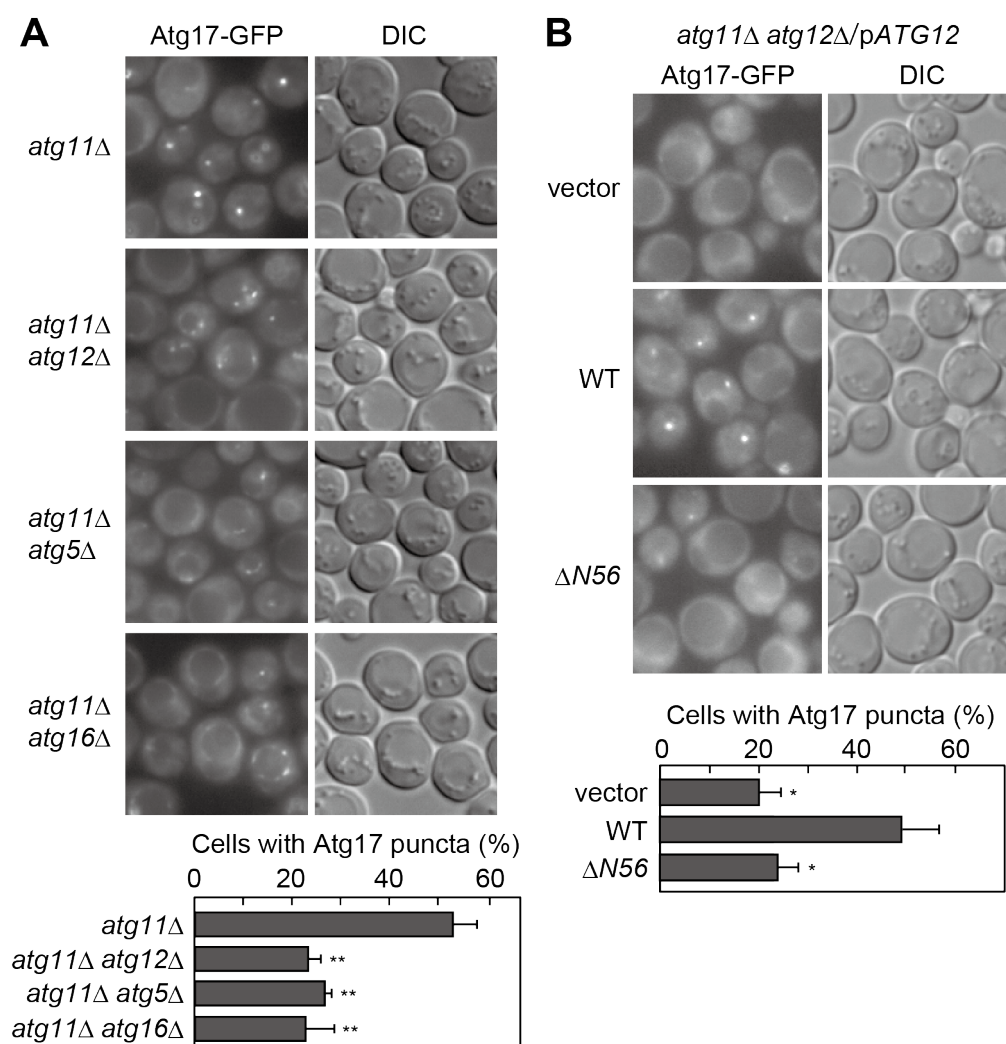


図9 Atg16 複合体と Atg1 複合体は Atg1 複合体の PAS の足場形成を促進する

Atg17-GFP を発現した細胞を、ラパマイシンで 90 分 (A) あるいは 2 時間 (B) 処理し、蛍光顕微鏡で 100 個以上の細胞を観察した。Atg17-GFP の輝点を全細胞数で割り、Atg17-GFP の輝点形成を算出した。観察は $n=3$ で行い、 P 値は unpaired two-tailed Student's t -test により算出した (** $P < 0.01$)。スケールバー、5 μm 。

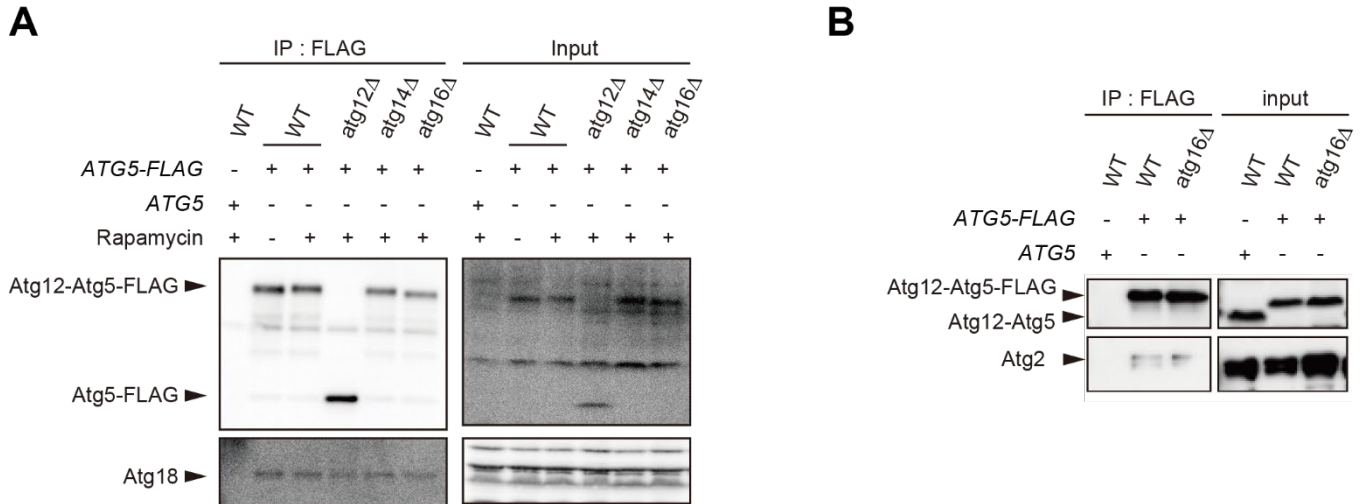


図 10 Atg16 複合体は Atg2-Atg18 複合体と相互作用する。

(A) Atg5-FLAG を発現した各細胞をラパマイシンで 2 時間処理し、抗 FLAG ビーズを用いた共免疫沈降を行った。共免疫沈降産物は、抗 Atg12 抗体および抗 Atg18 抗体を用いて、イムノブロットティングによって解析した。

(B) (A) の手順同様に、Atg2 と Atg5-FLAG の共免疫沈降を行い、抗 Atg12 および Atg2 抗体を用いて、イムノブロットティングにより解析した。

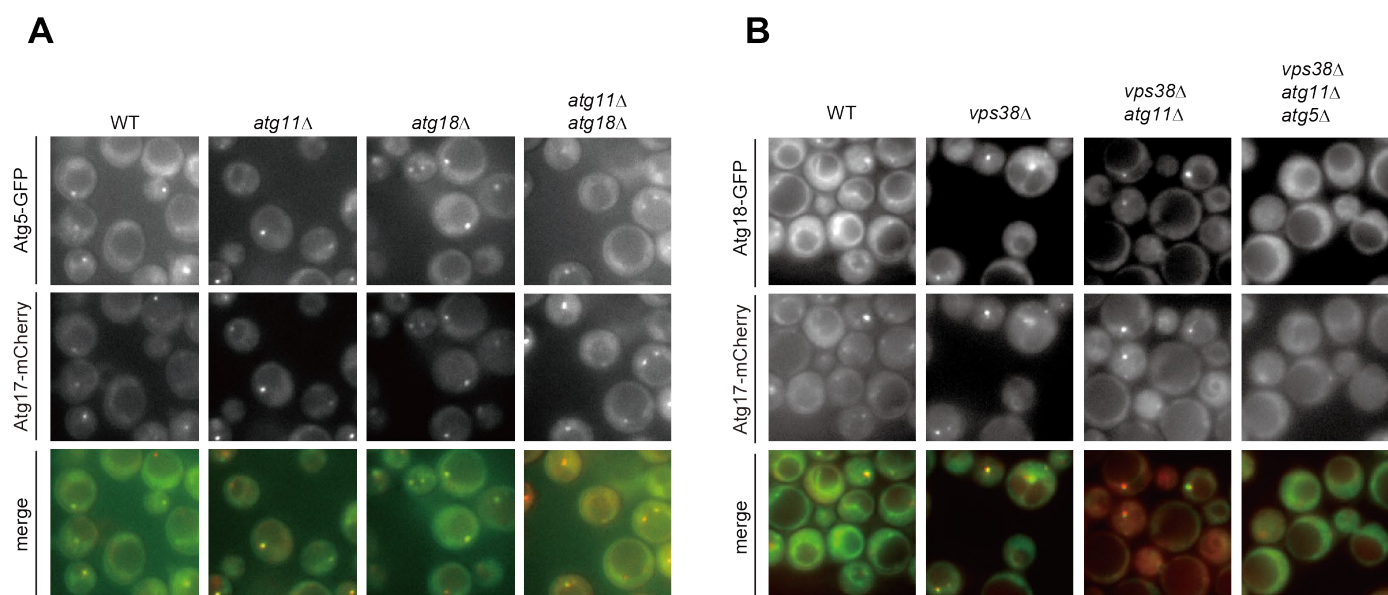
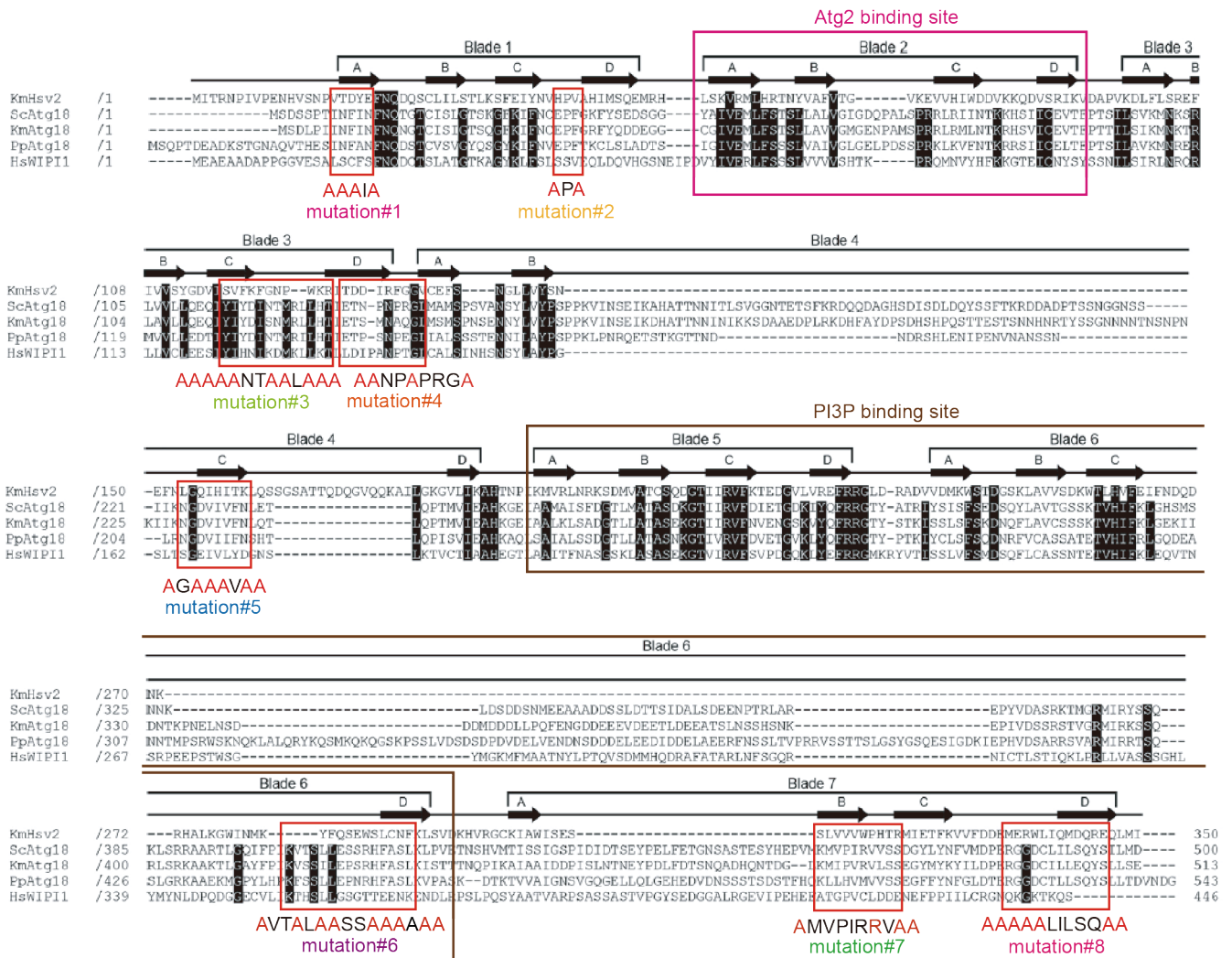


図 11 Atg18 は Atg5-GFP の PAS 局在に影響しない

Atg5-GFP (A) あるいは Atg18-GFP (B) を発現させた各細胞をラパマイシンで 2 時間処理をし、蛍光顕微鏡にて観察した。

A



B

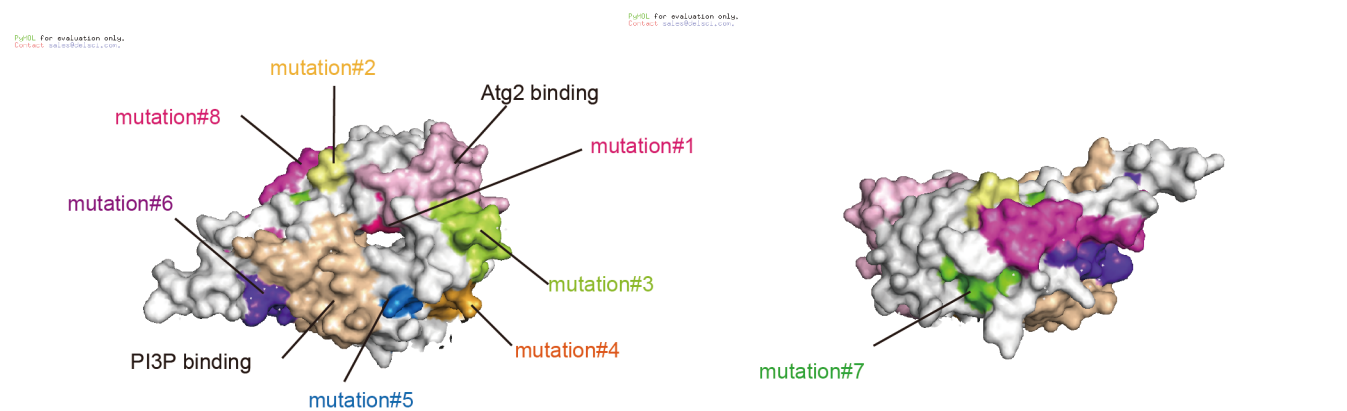
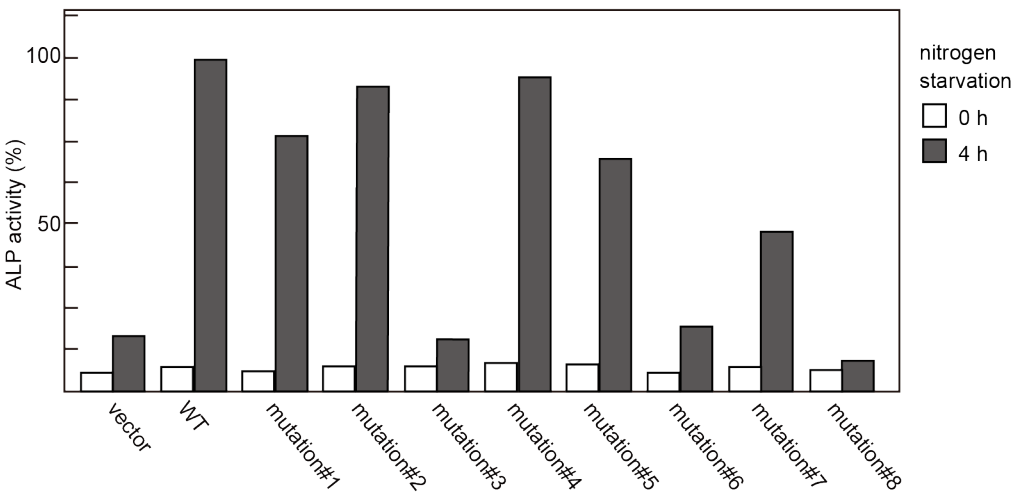


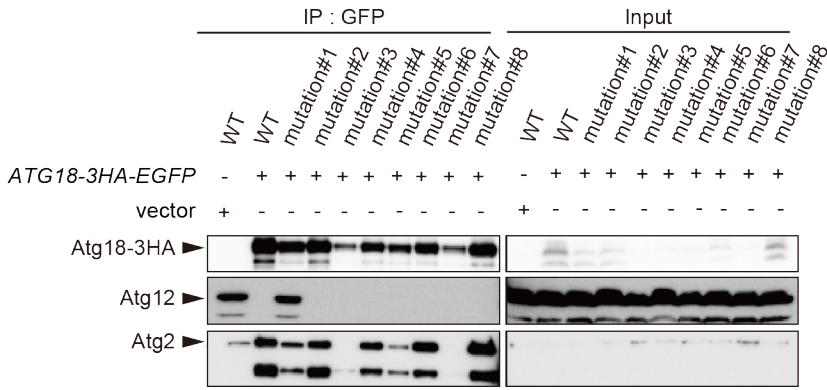
図 12 Atg18 変異体の作製

- (A) Wantanabe et al., 2012 に掲載された、近縁種における Atg18 ホモログのアミノ酸配列。Atg18 でのみ保存されている配列に着目をし、mutation#1 から#8 までを作製した。Atg2 および PI3P 結合部位も示した。
- (B) Phymol を用いて、各変異部位を調べた。Atg18 は構造が解かれていないため、ホモログである Hsv2 の構造を用いた。

A



B



C

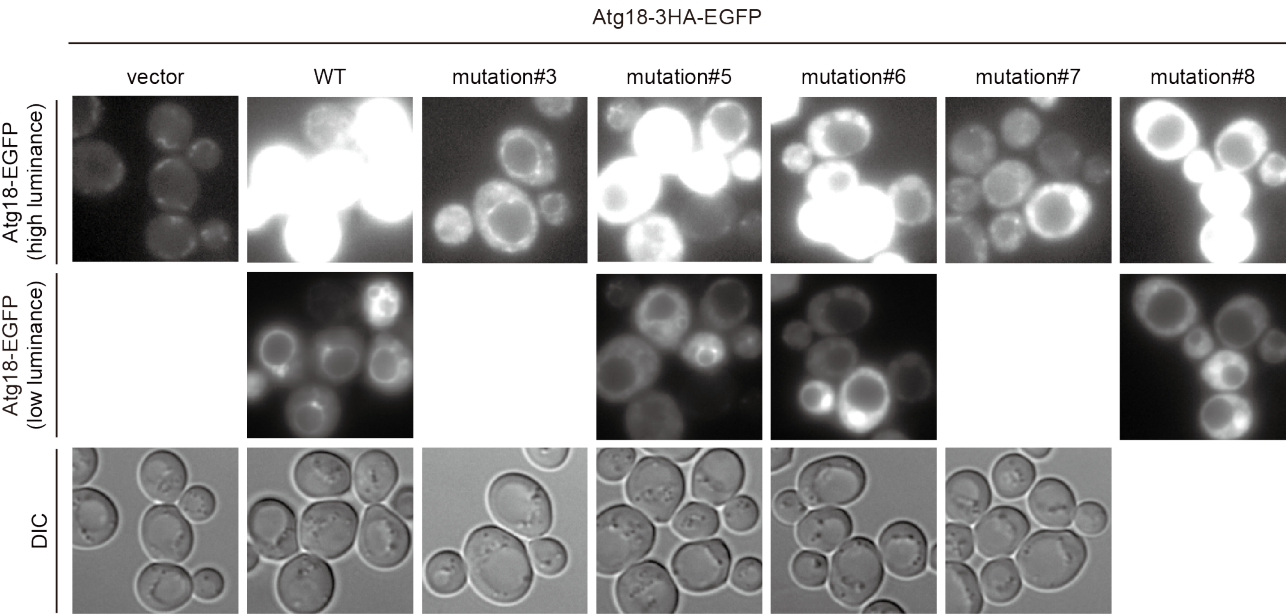


図 13 Atg18 変異体のオートファジー活性への影響

- (A) 野生型 Atg18 あるいは Atg18 変異体を発現した *atg18Δ*細胞について、窒素飢餓に4時間さらし、オートファジー活性を測定した。測定は n=1。
- (B) 各 GFP 付加変異体を発現した *atg18Δ*細胞を回収し、抗 GFP ビーズを用いて Atg2 および Atg12 との共免疫沈降を行った。共免疫沈降産物は、抗 HA 抗体、Atg2 抗体および Atg12 抗体を用いたイムノブロッティングにより解析した。
- (C) 各 GFP 付加変異体を発現した *atg18Δ*細胞をラパマイシンで90分処理し、各変異体の局在を調べた。

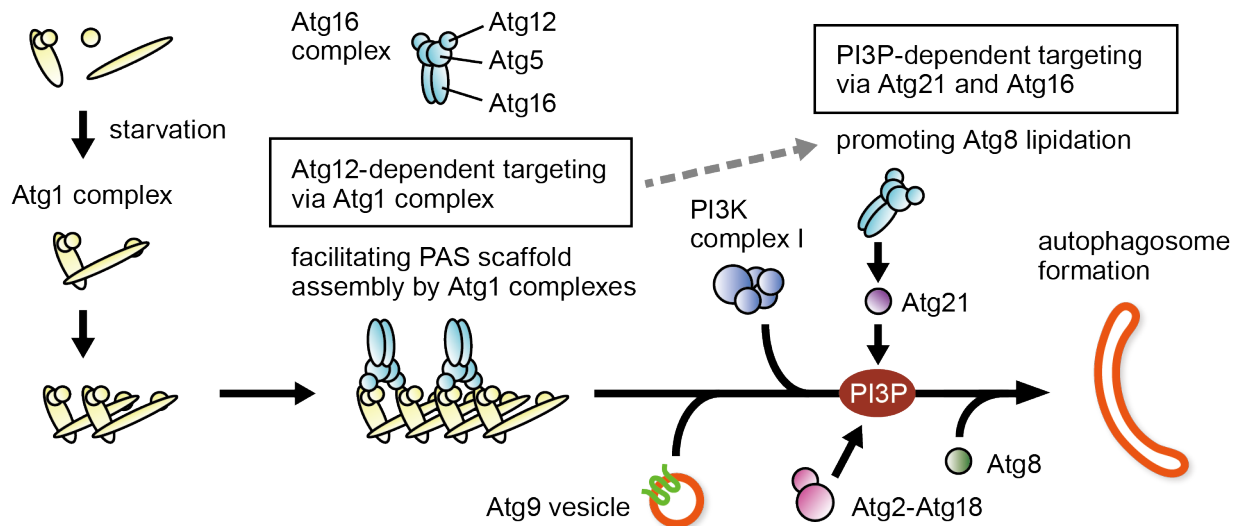


図 14 オートファゴソーム形成における Atg16 複合体の PAS への局在モデル

Atg16 複合体が PAS へと局在化するメカニズムには 2 通りある。Atg12 依存的経路と PI3P 依存的経路である。栄養飢餓あるいは TORC1 の不活性化によりオートファジーが誘導されると、Atg1 複合体形成が起こり、複数の Atg1 複合体が集積することで高次会合体を形成する。この過程において、Atg16 複合体は Atg12 の N 末端領域を介して Atg1 複合体と相互作用し、PAS の足場形成を促進する。また、PAS 形成の後期に局在した Atg16 複合体は、Atg8 の PE 化を促進する役割を持つ。以前の報告によると、PI3K 複合体 I が PI3P を産生し、PI3P 結合タンパク質である Atg21 が Atg16 と結合することで PAS に局在化し、Atg8-PE 形成を促進することが分かっている。

本研究に関連する結果 (Harada et al., 2019)

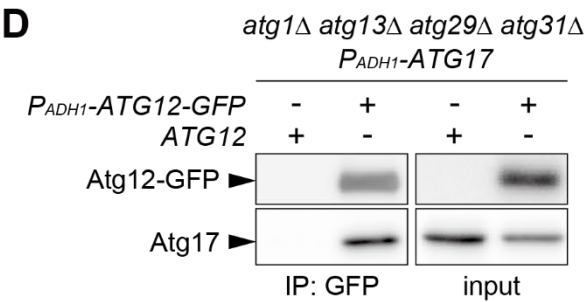
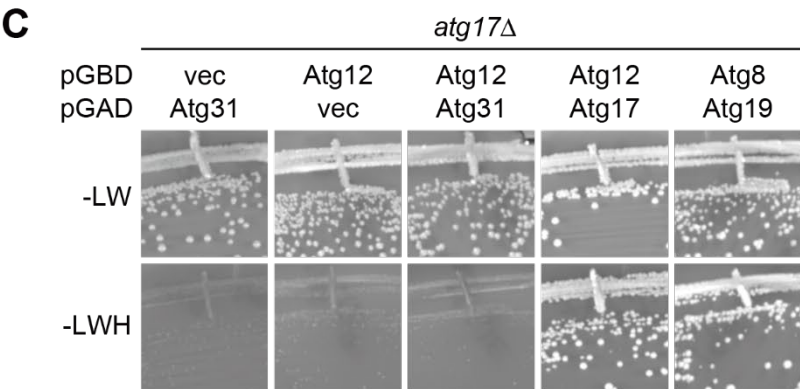
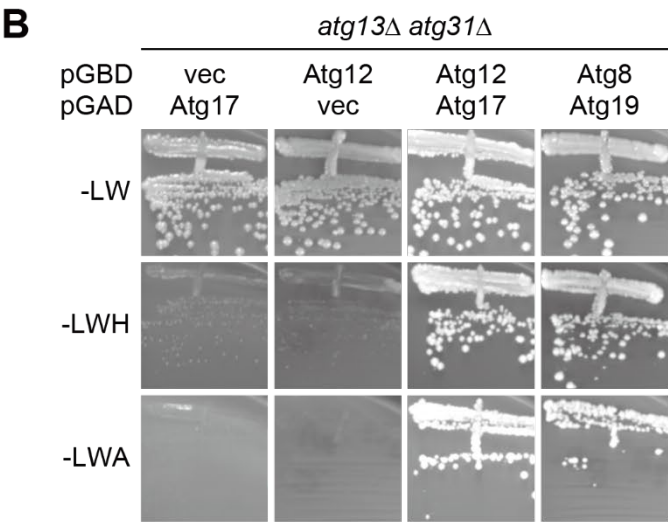
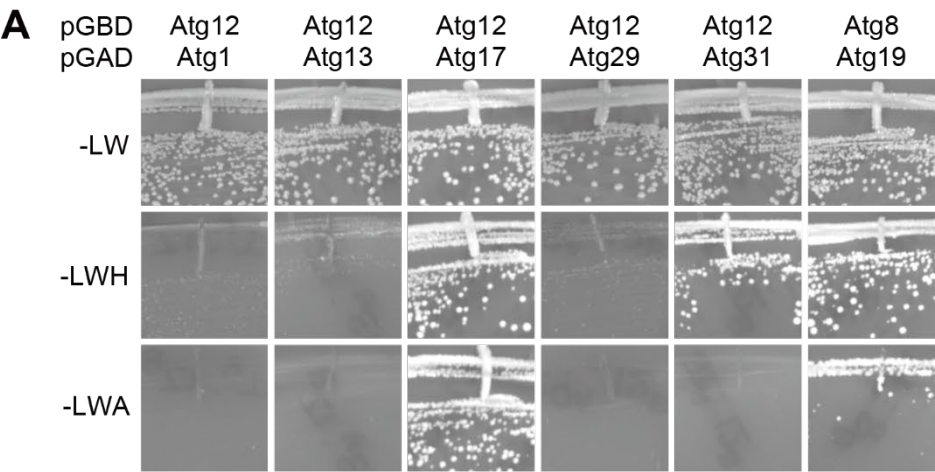


図 S1 Atg17 は Atg12 と相互作用する。

(A-C) Atg タンパク質に Gal4 転写活性化ドメイン (GAD)あるいは DNA 結合ドメイン (GBD)を融合し、AH109 細胞に発現させた。細胞を、ロイシン・トリプトファン欠損合成寒天培地、ロイシン・トリプトファン・ヒスチジン欠損合成寒天培地もしくは、ロイシン・トリプトファン・アデニン欠損合成寒天培地に撒き、30°C で 3 日間培養した。

(D) *ADHI* プロモーター (*P_{ADHI}*) の制御下で、*ATG17* および *ATG12-GFP* を過剰発現させた *atg1Δ atg13Δ atg29Δ atg31Δ*細胞をラパマイシンで2時間処理し、抗 GFP ビーズを用いて共免疫沈降を行った。共免疫沈降産物は、抗 Atg12 抗体および抗 Atg17 抗体を用いてイムノブロッティングにより解析した。

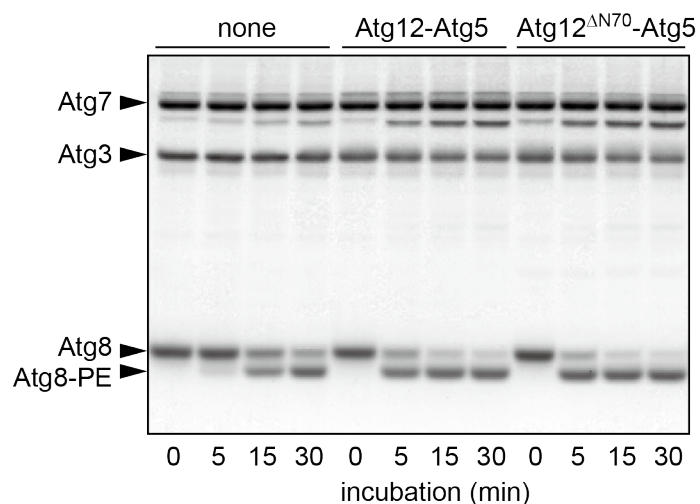


図 S2 Atg12 の N 末端は Atg12-Atg5 結合体の E3 酵素様活性には必要ない。

リコンビナントタンパク質とリポソーム (20 mol% DOPE, 70 mol% POPC および 10 mol% yeast PI) を Sakoh-Nakatogawa et al., 2013 および Nakatogawa et al., 2007 に従って作製し、Atg8 (5 μ M), Atg7 (1 μ M), Atg3 (1 μ M), ATP (1 mM) およびリポソーム (350 μ M lipids)を野生型 Atg12-Atg5 あるいは Atg12 Δ 70-Atg5 (0.2 μ M) を 30°C で培養した。その後、urea-SDS-PAGE および CBB 染色を行った。Atg12-Atg5 結合体は低濃度であったため、検出されなかった。

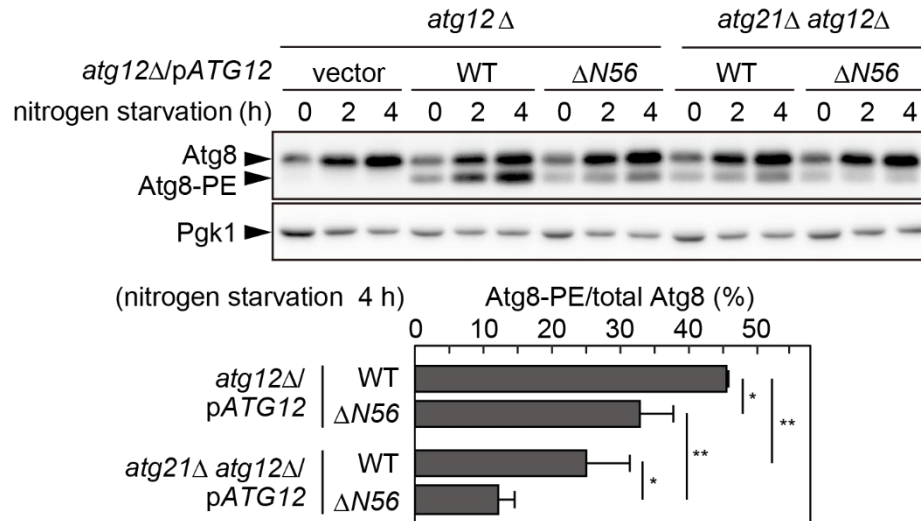


図 S3 Atg12N 末端欠損による Atg8-PE への影響

*atg12Δ*あるいは *atg21Δ atg12Δ*細胞を窒素飢餓培地で培養し、urea-SDS-PAGE および抗 Atg8 抗体を用いたイムノブロッティングにより Atg8-PE の形成効率を調べた。形成効率は、Atg8-PE 量を全 Atg8 量で割り、算出した。P 値は unpaired two-tailed Student's *t*-test により算出した (*P < 0.05, **P < 0.01)。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻くださりました中戸川仁先生、東京工業大学・科学技術創成研究院の大隅良典先生に深く感謝いたします。東京大学・医学研究科の山本林先生には、ご指導および酵母株やプラスミド等の材料をお譲りいただきました。質量分析においては、横浜市立大学・生命医科学研究科の平野久先生、木村弥生先生、東京工業大学・科学技術創成研究院の及川優博士にも大変お世話になりました。当研究室の小谷哲也博士には多くのご助言や実験の手助けをいただきました。中戸川万智子博士にはプラスミドの提供や実験の手助けをいただきました。桐浴裕巳さんにも多くの実験の手助けをいただきました。中戸川研究室の皆様、大隅研究室の皆様にも大変お世話になりました。この場を借りて、心より御礼申し上げます。