

分子細胞生物学研究部門の10年

大 隅 良 典

細胞内エネルギー変換機構研究部門の後任として、当該部門は平成8年4月に発足して10年余りが過ぎた。吉森保を助教授、野田健司を助手として迎え、5人の東大からの大学院生〔白浜、船越、桐浴、亀高、徳永〕と壁谷技官からなる研究室がスタートした。前任部門から機器をもらい受けて、貧しかった研究室の立ち上げが始まった。毛利所長から早い時期にスタッフを採るようと言う有り難い助言を頂き10月には米国留学中の鎌田芳彰を迎えた。その後、鈴木邦律と中戸川仁が助手として加わった。この10年の間に吉森は国立遺伝学研究所に教授として転出後、大阪大学微生物病研究所に移った。学振特別研究員修了後、助手、さきかけ研究員となった水島昇は、東京都臨床研へ転出した後、東京医科歯科大学医学部教授に就任した。野田は阪大微研の助教授となった。この間、ポスドク24名、総研大学生14名、受託研究学生5名、技術支援員6名が研究に携わった。研究室出身者の多くが国公立大・助教授、助手として活躍している。

私の研究部門は一貫してオートファジーの分子機構と生理的意義の解明を旗頭に研究を進めてきた。一つの目標をもちヘテロな研究のバックグラウンドの研究者集団というのが私の常に意識した研究室のあり方であり、その実現に基生研は理想的な場であった。基生研での研究開始時に既にオートファジーに必須な14個の遺伝子群〔当時はAPG、後にATG〕が得られていた。帝京科学大学、大隅萬里子の協力を得て、それらのクローニングを開始し、当時の小さな研究室では恐らく10年掛かると思われたATG遺伝子のクローニングは酵母全ゲノムの解読により一部の例外を除いて極めて短期間に完了した(図1)。それらはATG6を例外として、全て新規の遺伝子であることが判明した。ATG遺伝子はオートファジーに特異的であり、独立性の高い機能を有している。ATG遺伝子は飢餓という条件下に作動する遺伝子であり、栄養増殖に必須な遺伝子を極めたいという酵母研究者の盲点

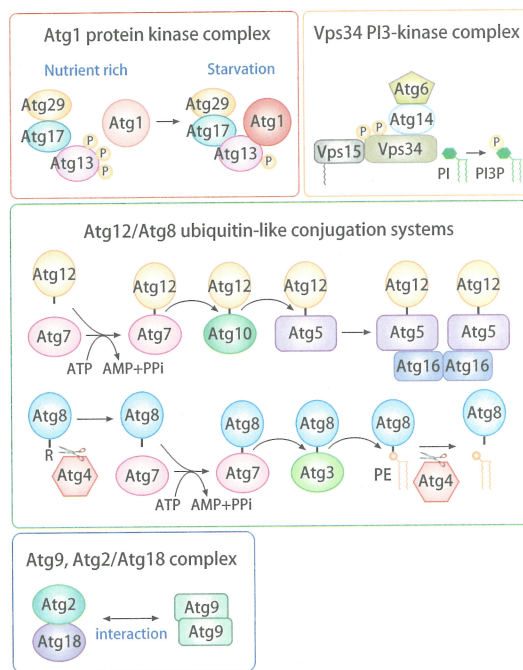


図1. オートファゴソーム形成に関わる Atg タンパク質群の機能単位。オートファジー関連遺伝子の多くは酵母から高等動物にまで良く保存されており、それらは2つのユビキチン様結合反応系によるタンパク質、脂質修飾系、タンパク質キナーゼ、PI3 脂質キナーゼなどからなっている。

になっていたのかも知れない。一方でオートファジーに必須であるが、栄養増殖には必要ではない遺伝子群であるという結論ばかりで、なかなか出口が見えない状況が続いた。研究室は、その後大きな高揚期を迎え、数年間に驚くほどの画期的な発見が相次いだ。その幕開けは、研究室に参画して間もない水島の解析から始まった。既にクローニングされていた Atg12 の解析を進め、Atg12 が 2 つの存在様式を持ち、想定分子量より遙かに大きな分子種を発見した。その高分子量バンドが全ての *atg* 変異株中、*atg5*、*atg7*、*atg10* で見られないことを示し、これが Atg 間の相互関係を示す最初のデータでもあった。やがて高分子量バンドが Atg12 と Atg5 の共有結合体であり、その形成がユビキチン様の反応系からなることが明らかとなった。ユビキチン様タンパク質に関心が高まる中、UBL、E1、E2 酵素、標的分子が一度に明らかにできたことと、オートファジーにもユビキチン/プロテアソーム系の同様なタンパク質結合反応が関与することは、大きな発見として注目を集めた。

前後してオートファジーに Atg1 キナーゼの活性化が必須であり、Atg13、Atg17 という因子が関与すること、Tor キナーゼが、オートファジーの負の制御因子として機能していること、オートファジーに特異的な PI3 キナーゼ複合体 (Atg6/Vps30, Atg14, Vps34, Vps15) が必須であることが次々に明らかとなった。これらはオートファジー研究に大きなインパクトを与える研究成果であった。

さらに我々がその局在から大いに注目していた Atg8 の研究が大きな進展を見せた (図 2)。即ち、Atg8 は小さなタンパク質であるが、C-末でプロセシングを受けることが明らかとなり、実際に末端から Arg がはずされ、Gly を末端に持つようになる。Atg8 は Atg12 系と共通の E1 酵素 Atg7 によって活性化され、Atg3 が E2 酵素として Atg8 を受け取る。最大の問題は最終的に Atg8 が何と共有結合をするかと言う問題であった。このとき既に Atg8 には少なくとも 2 つの型、膜貫通タンパクのように振る舞うものと、弱く膜に結合しているものが存在することが分かっていた。この 2 つの型は 6M 尿素入り SDS-PAGE によって分離されることが判り、膜結合型は移動度が速いことが見出された。修飾分子の同定は大阪大の蛋白研の高尾敏文教授のご協力で、実はタンパク質ではなく膜リン脂質、ホスファチジルエタノールアミンであることが明らかになった。これはユビキチン様の修飾がタ

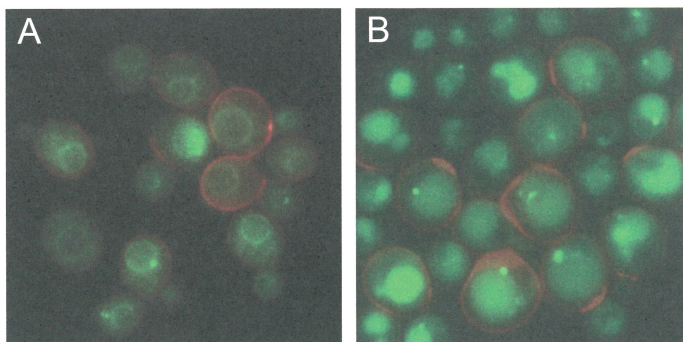


図 2. GFP-Atg8 の局在。A. 増殖時、細胞質、液胞膜、PAS 局在 B. 飢餓条件下、液胞内腔と PAS に局在。Atg8 および そのホモログ (LC3) はオートファゴソーム形成の可視化マーカーとして重要な分子である。

ンパク質に限らず、脂質化にも関わることを示した意味でユビキチン様タンパク質の世界を一段と広げると共に、ATG 遺伝子群の半数が 2 つの結合反応系に関与することを示す結果ともなった (図 1)。

これらの遺伝子の高等動物におけるホモログの解析も水島、吉森によって進められ、2 つの結合反応系がよく保存され、オートファジーに必須であることが証明された。Atg8 ホモログ LC3 を用いた動物細胞におけるオートファジーの可視化、Atg5 ノックアウト ES 細胞の構築、GFP-LC3 のトランスジェニックマウスは、動物における

オートファジー研究を一変させ、それらは世界中に頒布され、大きなインパクトを与えた。植物における ATG 遺伝子の同定と欠損植物の表現型の解析もスタートした。

オートファゴソーム形成というオートファジーの最も重要な膜動態を担う Atg タンパク質の機能単位が明らかになったが、オートファゴソーム形成には、多くの謎が残されている。オートファジーの誘導により、いかなる機構で細胞内に隔離膜が出現し、2重膜の新規のコンパートメントが形成されるかという細胞生物学的にも未知の課題である。今その解明に向けて新しい生みの苦しみとも言うべき時を迎えている。

鈴木による Atg タンパク質の可視化により、ほとんど全ての Atg タンパク質が局在し、酵母のオートファゴソーム形成の場となる構造として preautophagosomal structure (PAS) が提唱され、その形成における Atg タンパク質の階層構造を明らかにすることが出来た。鎌田によって Atg1 キナーゼの結合因子として同定された Atg17 が、Atg タンパク質の PAS 局在を規定する因子であることも明らかとなってきた。北海道大・稲垣冬彦教授のグループとの共同研究により多数の Atg タンパク質の構造が決まったことも研究に新しい視点を与えつつある。オートファジーの分子機構の解明は、個々の Atg タンパク質の解明のみならず、少なくとも 18 個の Atg タンパク質の挙動を 1 つのシステムとして理解することが必須である。分子生物学的解析に加えて *in vitro* 再構成、細胞内の Atg タンパク質の動態解析、生化学的な解析などが必須となって来ている。オートファジーはこの 10 年で世の中に広く認知され、多くの人に関心を示すようになってきた。最近細胞内のタンパク質の分解が高次の生理機能や、病態に深く関わっていることが続々と明らかとなってきている。それはとりも直さず我々の ATG 遺伝子の同定と解析に端を発している。

オートファジーの分子機構の解明はますます重要性を増している。我々は研究室の総力を挙げてこの重要だが極めて難しい問題に挑戦している。生化学的な解析が極めて困難な中、着実に前進し数年後には細胞の基本的な機能としてのオートファジーの分子機構に関して新たな提言ができると考えている。

これまでの研究の進展に寄与して個々人について紙面の都合上言及することが出来なかったが、何にもまして基礎生物学研究所における 10 年はかけがいのない時であり、当該部門で研究に専心し貴重な時を過ごした同志に心から敬意と感謝の意を表したい。幸運にも基礎生物学研究所と言う恵まれた環境を与えられて研究を展開できたことを心から感謝すると共に、今後もそのようなチャレンジを認め、推奨してくれる研究所として発展することを心から願っている。

参考文献

1. Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., Mizushima, N., (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.
2. Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., Ohsumi, Y. (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell*, 16, 2957-2983.
3. Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2004)

- LC3. GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation, *J. Cell Sci.* 117, 2805-2812.
4. Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2001) The preautophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.*, 20, 5971-5981.
 5. Ohsumi, Y., (2001) Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems, *Nat. Rev. Molecular Cell Biol.*, 2, 211-216.
 6. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhsa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.*, 152, 657-668.
 7. Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001) Two distinct Vps34 PtdIns 3-kinase complexes function in autophagy and CPY sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 152, 519-530.
 8. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., Ohsumi, Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408, 488-492.
 9. Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Noda, T., 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, 263-275.
 10. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, T., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-398.
 11. Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, 273, 3963-3966.
 12. Baba, M., Ohsumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J., and Ohsumi, Y. (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.*, 139, 1687-1695.

