

細胞内エネルギー変換部門

本研究部門は研究室の立ち上げから3年目が経過し研究も軌道に乗り、細胞生物学の残された課題であるオートファジー（自食作用）の機構とその生理的な意義の解明を目指して研究を進めている。

栄養飢餓ストレス

自然界に生息する生命体にとって栄養源をいかに確保するかは、最も重要であるに違いない。外界には常に十分な栄養源が保証されている訳ではない。従って自己をとりまく環境の様々な栄養条件を感知し、内部の活性を制御し、さらに飢餓条件下にいかにより生存率を維持するための機構を獲得するかは進化上で、きわめて重要な選択圧の1つであったに違いない。オートファジーはそのような栄養飢餓に対する適応機能の1つであるが、その生理的意義はさらに多面的であることが予想される。

自食作用とは

外界の栄養源が枯渇したとき細胞は自己の構成成分を分解する。このオートファジー（autophagy）と呼ばれる細胞応答は、真核細胞に普遍的であり、生理的にも重要な役割を担っているものと考えられる。我々の肝細胞では、食事の間の空腹時に活発なオートファジーが繰り返されている。神経細胞においてもオートファジーが盛んに進行していることが報告されている。植物細胞では、個体の老化した部分を分解し、分解産物を新しい組織へと転流する事が日常的に行われているし、いわゆる老化（senescence）に伴ってきわめて大規模な自己分解が進行する。酵母細胞は、窒素源の枯渇を引き金として減数分裂過程、すなわち孢子形成を誘導する。この細胞分化過程には、既存のタンパク質の大規模な分解が不可欠である。オートファジーは、無秩序な分解ではなく、高度に組織化された過程であるに違いない。

1955年にde Duveによってリソソームが発見されて以来、細胞内分解コンパートメントの役割と分解機構は、多くの研究者の興味を駆り立ててきたが、今日に至ってもその分子レベルでの理解はほとんど進んでいない。その理由はオートファジーを検出する方法がなかったこと、リソソーム系を構成する膜系が複雑であり、かつダイナミックな動態

を伴うために、解析の手がかりが得られなかったことによるものと思われる。

酵母の自食作用の発見

我々は、酵母細胞が種々の栄養飢餓に応答して自己の細胞質成分をリソソームと相同な液胞に送り込み、大規模に分解すること、その機構が高等動物細胞で広く知られているオートファジーと同様な複雑な膜現象によっていることを見いだした(図1)。酵母のオートファジーは窒素、炭素、リン酸、硫黄源など様々な飢餓によって誘導される。多様な飢餓条件による対応したシグナル伝達系を想定するよりも細胞が外界の栄養飢餓を感知し、共通のシグナル伝達機

構によってオートファジーを誘導していると思われる。最近我々はフォスファチジルイノシトールキナーゼのホモログであるTorが栄養源の感知に重要な役割をになっていることを見いだした。

自食作用の未解決の問題の1つはオートファジーに伴う大規模な膜動態の機構に関するものである。オートファゴソーム形成は細胞内に新たに閉じた空間、コンパートメントを形成する機構であり、これまでに解析されてこなかった膜現象である(図2)。細胞質の一部を取り囲む二重膜の構造体、オートファゴソームがどのように形成されるのか。オートファゴソームがいかにして液胞/リソソームと特異

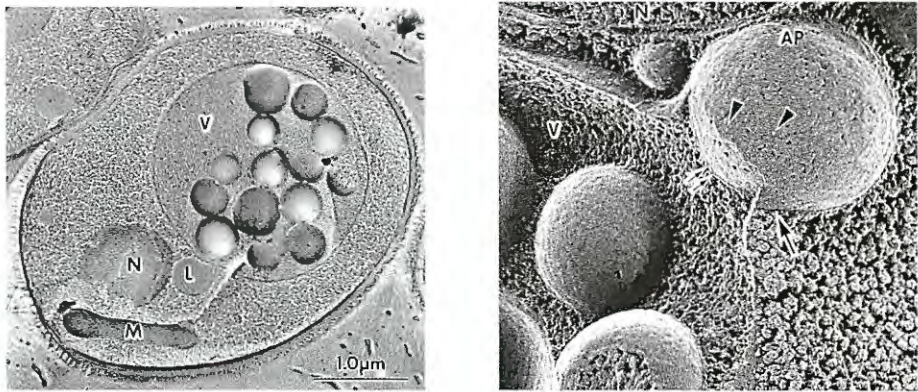


図1. 飢餓条件下の液胞蛋白分解酵素欠損株のフリーズレプリカ像
(上) 液胞内に細胞質の一部を囲んだ球形の膜構造、自食体が多数蓄積する。
(右) 細胞質に形成された二重膜構造、オートファゴソームはその外膜で液胞膜と融合し液胞内に自食体(オートファジックボディ)を放出する。オートファゴソームの膜は、内膜にほとんど膜内粒子が認められない特異な構造をしていることが判る。

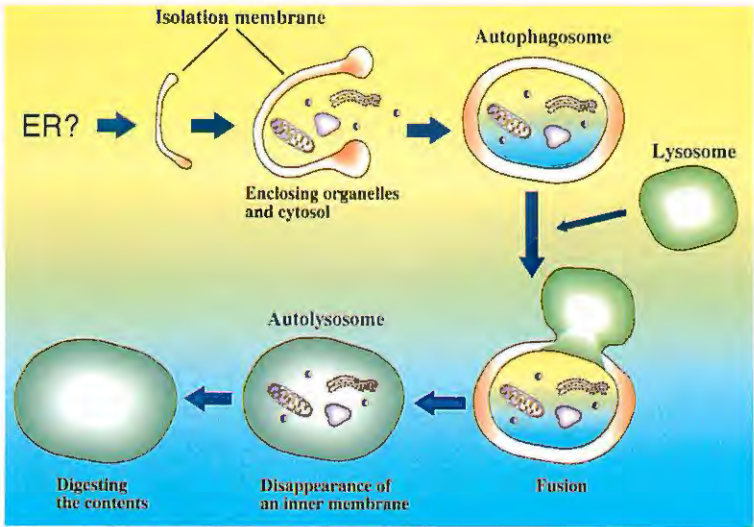


図2. 自食作用の膜動態の模式図、栄養飢餓シグナルの伝達、オートファゴソームの形成、リソソームとの融合など、まだ分子レベルではまったく未解決の課題である。

的に融合するのか、オートリソソーム内でなぜオートファジックボディ膜が容易に分解されるのか、自食作用がどのように制御されているのかなど、興味深い課題が未解決のまま残されている。

オートファジーに関与する遺伝子群

酵母はこれまで細胞周期や分泌などの複雑な過程を分子レベルで理解する上で先導的な役割を担ってきた。それは遺伝子学的な手法と分子生物学的な手法によって、それらの素過程に関与する分子を明らかにすることができたからに他ならない。我々はオートファジーに関わる分子機構を解明することを目的としてこの分野にはじめて遺伝子学的な手法を導入した。形態学的な指標に基づき分離されたオートファジー不能変異 (*apg*) が多数分離された。これらの株はいずれも飢餓条件下にタンパク分解を誘導できず、飢餓条件下に生存率を維持できない。これらの形質の相補を指標として、現在までにオートファジーに関わる14個の遺伝子を同定した。これらの自食作用遺伝子 *APG* 群はそのほとんどが未知の遺伝子であった。現在これらの遺伝子産物 (*Apgp*) の系統的な解析が進み、オートファジーにおける個々のタンパク質の機能が明らかになりつつある。現在これらの遺伝子間相互作用、遺伝子産物の同定、発現調節、物理的相互作用さらに細胞内局在などについて解析を進めつつあり、ネットワークが構築されつつある。これら

の遺伝子産物の構造と機能を明らかにすることによってオートファジーが分子レベルで理解できると期待している。

オートファジーに必須な新しいタンパク質結合反応系の発見

昨年 *Apgp* の内4つのタンパク質が新しいタンパク質の結合反応に関与していることが明らかとなった。 *Apg12p* は186アミノ酸からなる親水性のタンパク質であるが、このタンパク質はC-末端のグリシン残基を介して *Apg5p* の中央にあるリジン残基の側鎖にイソペプチド結合を形成する。この結合体の生成は自食作用の進行に必須である。 *Apg12p* はユビキチンと相同性はないが、その反応はユビキチン経路と類似の反応からなっており、 *Apg7p*、 *Apg10p* はその *Apg12p* の活性化と結合反応に関与している (図3)。この全く新しいタンパク質結合反応系はヒトに至るまで真核生物に広く保存されている。現在この結合体の形成が自食作用のどのステップで機能しているかに関して解析が進んでいる。

自食作用の更なる理解を目指して

細胞内分解コンパートメントにおける分解機構は、我々が解析を進めている非選択的でバルクな分解のみならず選択的な酵素やオルガネラの除去機構も存在することが近年明らかになってきた。その機構としてオートファゴソーム形成が関与するマクロオートファジーとリソソーム/液胞

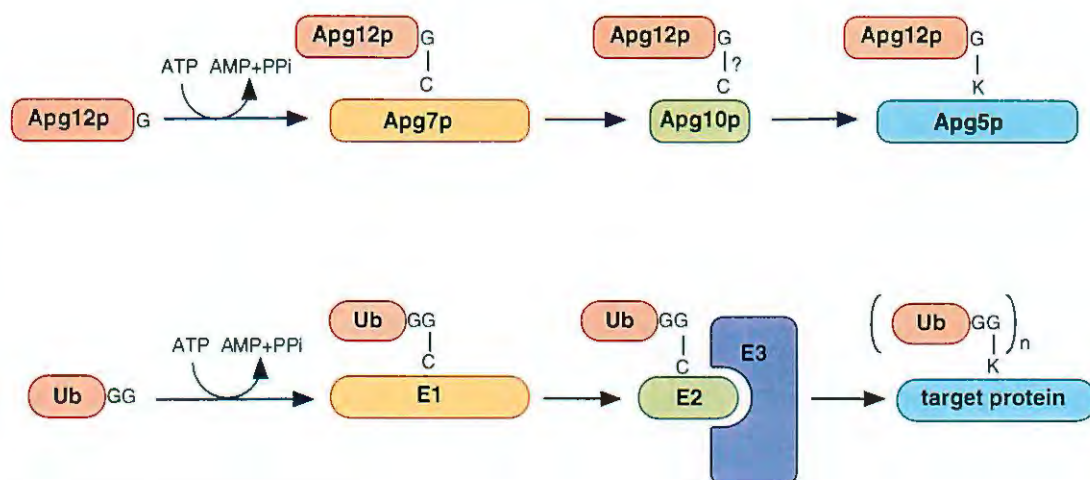


図3. *Apg12p* システムとユビキチンシステム

Apg12p のC-末端グリシン残基は、*Apg7p* によってATP依存的に活性化され、*Apg7p*、*Apg10p* のシステイン残基にチオエステル結合を形成した後、*Apg5p* の149番目のリジン残基とイソペプチド結合する。この結合システムはオートファジーに必須である。一連の反応は、ユビキチンがE1、E2、E3を介して標的タンパク質に結合するのとよく似ている。

膜の陥入によるミクロオートファジーも存在するらしい。液胞酵素アミノペプチターゼ I の液胞内移行に自食作用遺伝子群が必須であることが最近明らかとなった。非選択的な分解と液胞酵素の生合成経路が共通の分子装置を利用している点は極めて興味深い。

我々は自食作用を遺伝学、生化学、細胞生物学、分子生物学、形態学などを駆使して総合的に解明することを目指している。細胞内の膜動態を担う基本的な分子装置は、酵母からヒトに到るまで驚くほど進化の過程で保存されている。実際 APG 遺伝子の中には高等動植物生物にも明らかに相同遺伝子が存在することがゲノム解析の進展とともに明らかになって来た。酵母で得られた新しい知見は、高等動植物細胞のオートファジー機構の解明にも有力な手がかりを与えるに違いない。細胞にとって重要な細胞内分解のメカニズムは単一の経路によっているとは考えられず、高等真核生物に固有の機構や多細胞系に特有の制御系が存在するものと思われる。酵母をモデル系としつつ、高等動植物の示す栄養飢餓応答、細胞分化における細胞の再構築、アポトーシス、老化などの過程での自食作用の役割を明らかにすることを目標に解析を進めている。

参考文献

1. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y., (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and its conditions for induction. *J. Cell Biol.* 119, 301-311.
2. Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169-174
3. Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., and Ohsumi, Y., (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: Detection of autophagosomes and their characterization. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 903-913.
4. Baba, M., Ohsumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* 139, 1687-1695 (1997)
5. Noda, T. and Ohsumi, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963-3966 (1998)
6. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, T., Ishii, T., Gerge, M. D. Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. A novel protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-398 (1998)