

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4年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。

栄養飢餓ストレスとオートファジー

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、最も重要な課題であるに違いない。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、飢餓条件下にいかに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つであっただろう。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、多細胞系における生理的意義はさらに多面的であることが予想される。

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誘導され、血糖値の維持が図られている。神経細胞においてもオートファジーが盛んに起こっ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。このような細胞内のバルクなタンパク質分解の主要な経路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特異的に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。

酵母のオートファジーの発見

我々は、酵母細胞が種々の栄養飢餓に应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外界の栄養飢餓を感知してオートファジーを誘導していると思われる。飢餓シグナル伝達経路の解明は残された重要課題である。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が飢餓シグナル伝達をになっていることを見だし、現在オ

ートファジーその下流因子の同定を進めつつある。

オートファジーの未解決かつ最大の問題の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、いまだ解明されていない膜現象である(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膜が何に由来し、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、オートファジーがどのように制御されているのかなど、興味深い課題に挑戦している。

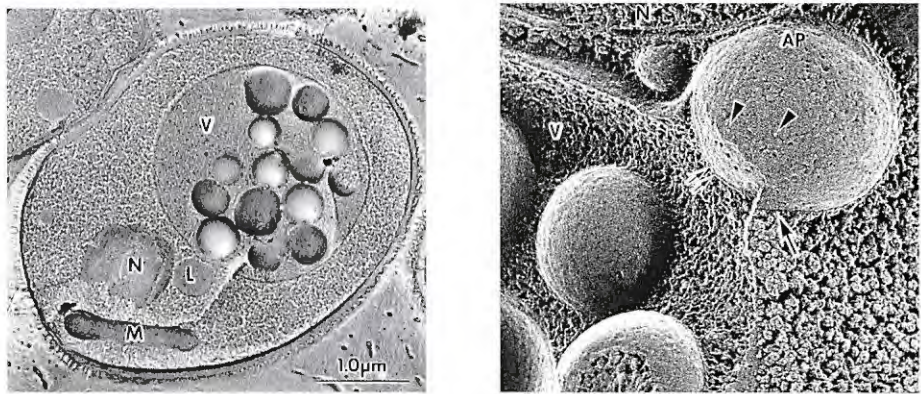


図1. 飢餓条件下の酵母(液胞蛋白分解酵素欠損株)のフリーズレプリカ像
(左) 液胞内に細胞質の一部を囲んだ球形の膜構造、自食体が多数蓄積する。
(右) 細胞質に形成された二重膜構造、オートファゴソームはその外膜で液胞膜と融合し液胞内にオートファジックボディを放出する。オートファゴソームの膜は、内膜にほとんど膜内粒子が認められない特異な構造をしていることが判る。

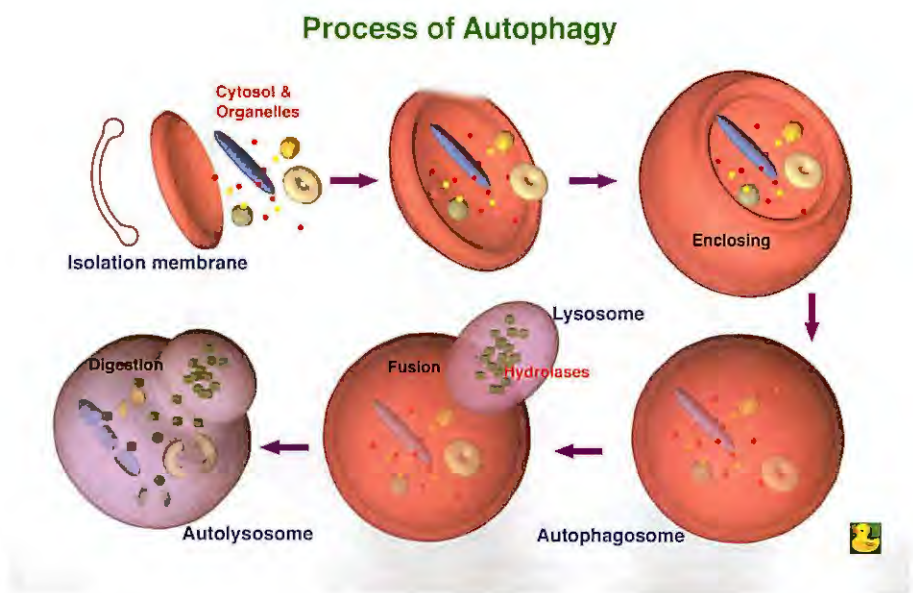


図2. オートファジーの膜動態の模式図

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の解明を目的として、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株(*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15個の遺伝子を同定した。これらのオートファジーAPG遺伝子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

最近Apg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Gly残基を介してApg5pの中央にあるLys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オートファジー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オートファジーのどのステップで機能しているかに関して解析を進めている。

オートファジー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、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。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/液胞膜の陥入によるミクロオートファジーと呼ばれる2つの機構が存在する。また液胞酵素アミノペプチターゼIの液胞内移行にAPG遺伝子群が必須である。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。

酵母から高等動植物へ

酵母で同定されたオートファジー関連遺伝子の多くは、高等動植物にも相同なものが存在することがゲノム解析の進展と共に明らかになってきた。そのうちのいくつかは機

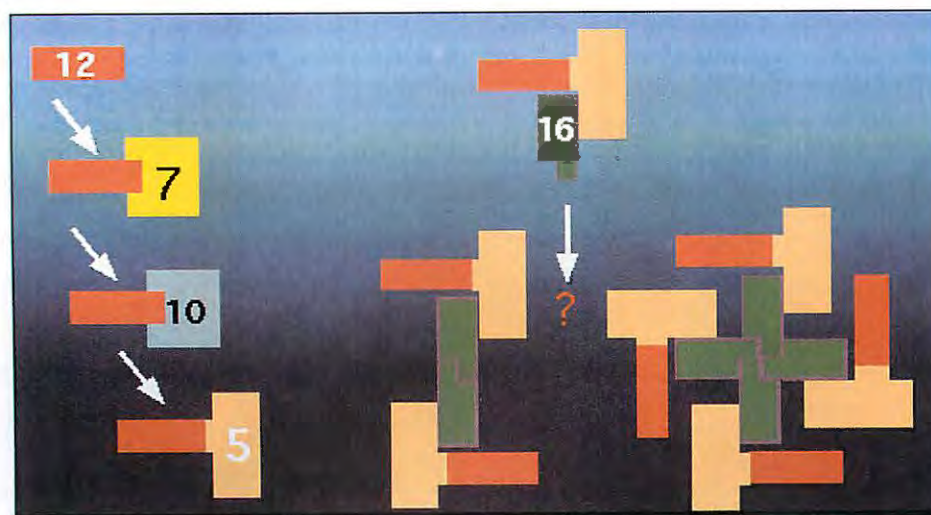


図3. Apg12pシステム

能的にもオートファジーに関わっていることを見出している。我々はこれらの相同遺伝子を手がかりに、高等動植物におけるオートファジーの分子機構と多細胞系に特有の役割の検討も行っている。これらのプロジェクトのひとつにおいて、酵母オートファジー遺伝子産物であるCsc1pに相同なマウスSKD1蛋白質が、哺乳動物においてエンドソームの形態と輸送機能を制御していることを明らかにした。すなわち、SKD1の優性阻害変異体を培養細胞に発現させると、巨大化した異常エンドソームが出現し、そこにエンドサイトーシスで取り込まれた外部分子や受容体が蓄積し、それらの正常な細胞内輸送が阻害されたのである。おそらくSKD1は、エンドソームの輸送機能を介してオートファジーを制御していると考えられる。

このように酵母で得られた知見は、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な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オートファジーの役割を明らかにすることを目標に研究を進めている。現在APG遺伝子をノックアウトしたマウス、アラビドプシスの解析が進行している。

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. Baba, M., Takeshige, K., Baba, N. and Ohsumi, Y. (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: Detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.* 124, 903-913.
3. Noda, T. and Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963-3966.
4. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, T., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (1998) A novel protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398.
5. Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagic pathway. *EMBO J.* 18, 3888-3896.
6. Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435-446.