

細胞内エネルギー変換研究部門

生命体は絶え間ない合成と分解によって維持されている。分解の機構はまだほとんど理解されていない。個々のタンパク質を識別して分解する機構と、バルクに非選択的に分解する機構が存在する。後者の主要な経路であるマクロオートファジーは、栄養源が枯渇したとき細胞が自己の構成成分をリソソーム/液胞内で分解する機構である。このオートファジー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。肝細胞では、空腹時に活発にオートファジーが誘導され、血糖値が維持される。酵母細胞は、窒素源の飢餓を引き金として孢子形成という細胞分化を誘導し、このとき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、高度に組織化された複雑な膜動態によって担われている。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、まだ未知のことが多く残されている。我々はオートファジーの分子機構と生理的意義の解明を目指して研究を進めている。

1. 酵母のオートファジーの発見

我々は、酵母が種々の飢餓に反応して自己の細胞質成分を液胞に送り込み、大規模に分解すること、その機構が高等動物細胞のオートファジーと同様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N, C, S, リン酸など様々な飢餓によって誘導される。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 Tor キナーゼが栄養源の関知に重要な役割を担って

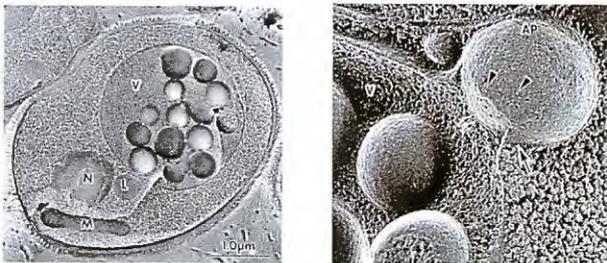


図 1. 飢餓条件下の液胞蛋白分解酵素欠損株のフリーズレプリカ像

(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。

いることを見だし、その下流因子の同定を進めている。

自食作用の最大の未解決の問題の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なコンパートメントを形成する機構であり、全く未知の膜現象である(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、オートファゴソームが液胞/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膜が容易に分解されるのか、オートファジーの制御など、興味深い課題に挑戦している。

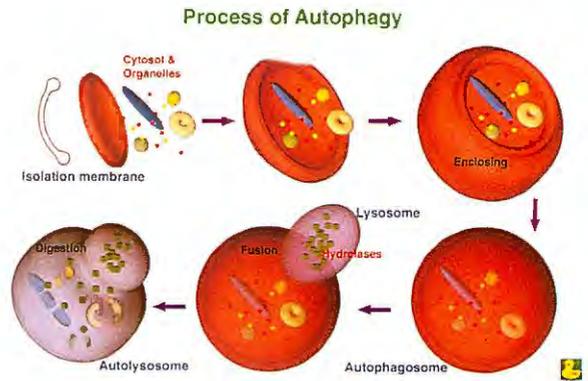


図 2. 自食作用の膜動態の模式図

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。

2. オートファジーに関与する遺伝子群

酵母は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。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学的な手法を導入し、形態学的な指標によりオートファジー不能変異株 (*apg*) を多数分離した。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。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。*Apg1p* キナーゼ複合体や、オートファジーに特異的な PI3 キナーゼ複合体、二つのユビキチン様結合系(下記)等を発見した。現在これらの相互作用、発現調節、複合体形成、細胞内局在などにつ

いて解析を進めており、これらのネットワークが構築されつつある。これらの解析を通じ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。

細胞内分解コンパートメントにおける分解には、バルクで非選択的な分解のみならず特定の酵素やオルガネラを選択的に除去する機構も存在するらしい。前述のマクロオートファジーの他にリソソーム/液胞膜の陥入によるマイクロオートファジーと呼ばれる機構が存在する。最近マイクロオートファジーにも *APG* 遺伝子が必要であることが示されつつあり、これらを統合したモデルが構築される必要がある。

3. オートファジーに必須な新しいユビキチン様タンパク質の発見

Apgp の内 7 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* は小さな親水性のタンパク質であり、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自食作用の進行に必須である。こ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* がその *Apg12p* の活性化と結合反応に関与している (図 3)。さらに最近 *Apg8p* は、末端 Arg が *Apg4p* によって切断された後 *Apg7p* によって活性化を受け、特異的 E2 酵素 *Apg3p* に渡され、最終的に膜リン脂質ホスファチジルエタノールアミンに結合することが発見された。これらの全く新しいユビキチン様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を進めている。

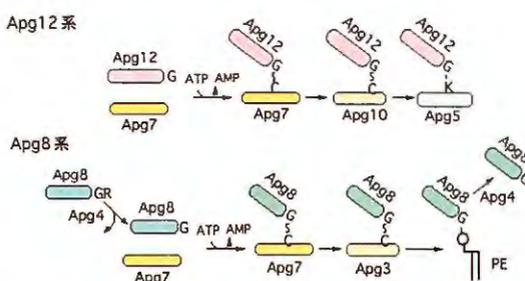


図 3. *Apg12p* システムと *Apg8p* システム

Apg12p と *Apg8p* の C-末端 Gly 残基は、*Apg7p* によって ATP 依存的に活性化され、それぞれ *Apg10p*、*Apg3p* とチオエステル結合を形成した後、*Apg5p* の 149 番目の Lys 残基、ホスファチジルエタノールアミンとアミド結合を作る。この結合システムはオートファジーに必須である。

4. 酵母から高等動植物へ

酵母で同定された *APG* 遺伝子の多くは、高等動植物にもホモログ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。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。哺乳動物の *Apg8p* ホモログである LC3 は細胞質に存在する I 型から、翻訳後修飾によって II 型となり、オートファゴソームに局在化することを見いだした。II 型への変換はオートファゴソーム形成と相関している。ついで *Apg5* ノックアウト ES 細胞を構築し、*Apg12* 結合系が哺乳動物でもオートファジーに必須であり、*Apg5* がオートファゴソームの前構造である隔離膜の伸長に関わっていることを見いだした。

細胞にとって重要な細胞内分解のメカニズムは多細胞系ではさらに複雑で、高等真核生物に固有の機構や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研究を進めている。現在 *APG* 遺伝子を破壊したマウスやアラビドプシスの作成、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. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, T., Ishii, T., Gerge, M. D. Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998) A novel protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395-398
3. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kiminami, E., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000) Ubiquitination-like system mediates novel protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492
4. 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
5. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001) Dissection of autophagosome formation using *Apg5*-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657-668