



研究室 URL :
<http://www.nibb.ac.jp/~enehen/index-j.html>



大隅 良典
教授



鎌田 芳彰
助手



野田 健司
助手



水島 昇
助手



吉本 光希
非常勤研究員

自然界において、生命体は常に栄養の枯渇に晒される危険を伴って生きており、飢餓環境をいかに生き延びるかは、生命にとって死活に関わる問題である。オートファジー（自食作用, Autophagy）はそのような栄養飢餓に対する適応機能の1つであり、我々はオートファジーの分子機構解明を目指して研究を進めている。

外界の栄養源が枯渇したとき、細胞は自己の構成成分をリソソーム/液胞内で分解し、その分解産物をリサイクルして飢餓耐性のための細胞の再構築に用いる。これがオートファジーと呼ばれる細胞応答である。オートファジー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。我々の肝細胞では、空腹時に活発なオートファジーが誘導され、血糖値の維持が計られている。酵母細胞は、窒素源の枯渇を引き金として胞子形成が誘導されるが、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、このような細胞内のバルクなタンパク質分解を担っている。

1. モデル細胞・酵母のオートファジー

酵母細胞は栄養飢餓に応答してオートファジーを誘導する（図1）。酵母のオートファジーは窒素（アミノ酸）、炭素、イオウ、リンなど様々な飢餓によって誘導される。

オートファジーをめぐる最大の問題はオートファジーに伴う膜動態の解明である。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、自食作用がどのように制御されているのかなど、興味深い課題に挑戦している。

2. オートファジーに関与する APG 遺伝子群

酵母は遺伝学的な手法にすぐれ、細胞内の複雑な現象を分子レベルで理解する上で先導的な役割を果たしてきた。我々はオー

トファジーに関わる分子機構を解明するため、酵母オートファジー不能変異株（*apg* 変異株）を分離し、それをもとに、オートファジーに関わる15個のAPG遺伝子を同定した。これらの遺伝子産物（Apgタンパク質）の解析を進めた結果、Apgタンパク質がいくつかの機能群を形成していることが明らかとなった。これらの機能群はユビキチン様のタンパク質修飾システム（後述）、タンパクキナーゼ複合体、ホスファチジルイノシトール3リン酸キナーゼ複合体などからなり、全ての反応系が正常に動作することがオートファジーの進行に必須である。しかし、それぞれの反応系がどのように相互作用して最終的にオートファゴソーム形成に働いているのかはほとんど分かっていない。我々はApgタンパク質の空間的局在を調べ、多くのApgタンパク質がPre-autophagosomal structure (PAS)と呼ばれる液胞近傍の限局した領域に集積していることを示した。現在、Apgタンパク質間の機能ネットワークを明らかにすべく、オートファジーに関わる因子間の遺伝的・物理的相互作用の解析を進めている。

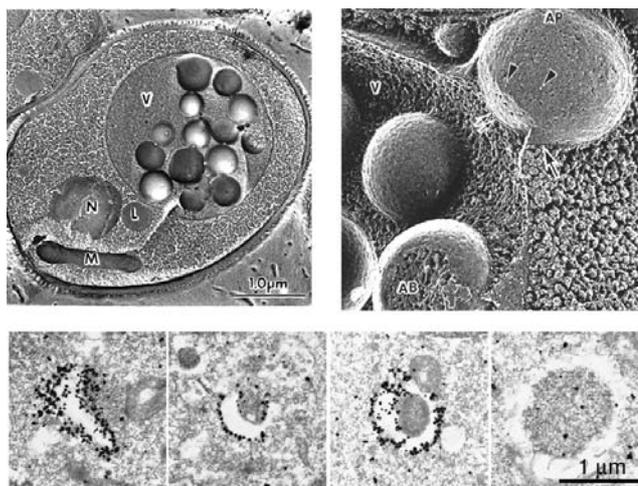


図1 飢餓条件下の液胞蛋白分解酵素欠損株のフリーズレプリカ像
 (上) 液胞内に細胞質の一部を囲んだ球形の膜構造、自食体が多数蓄積する。

(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造をしていることが判る。

3. オートファジーに必須なユビキチン様タンパク質

我々は4つのApg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を見出した。Apg12pタンパク質 (Apg12p) はC 端の Gly 残基を介して Apg5p の中央にある Lys 残基の側鎖と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 (E1 酵素) と結合反応 (E2 酵素) に関与している (図2)。さらに最近 Apg8p は、プロテアーゼ Apg4p によって C 末端 Arg が切断された後 Apg7p によって活性化を受け、特異的 E2 酵素 Apg3p に結合した後、最終的に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 (図2)。この全く新しいユビキチン様の反応系は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過程で機能しているかに解析を進めている。

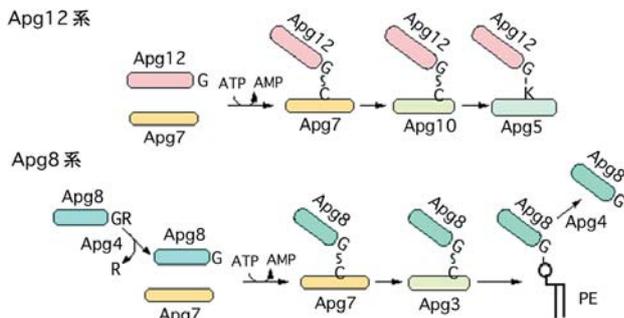


図2 Apg12p システムと Apg8p システム

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 に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。

4. 酵母から高等動植物へ

オートファジーは多細胞生物ではさらに多面的な生理的意義をもつとの予想のもとに、我々は酵母で得られた知見を、哺乳動物・種子植物へと発展させた研究も行っている。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。哺乳動物の Apg8p ホモログである LC3 は、動物細胞オートファゴソームの初めてのマーカータンパク質として多くの解析に用いられている。また、我々は Apg5p ノックアウト ES 細胞を構築し、Apg12p 結合系が哺乳動物でもオートファジーに必須であり、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。さらに Apg5p を GFP により蛍光標識することによって、生きた細胞の中で球状のオートファゴソームが形成されていく様子を実時間観察することにも成功した。

高等動物におけるオートファジーの意義は未だ不明な点が多い。我々はほぼ全身のオートファゴソームが蛍光標識されるトランスジェニックマウスを作製し、飢餓応答、発生過程などにおけるオートファジーの状況を網羅的に観察している。APG 遺伝子破壊マウスの作成・解析も行っており、哺乳動物個体を対象とした研究を進めている。

一方、植物の生活環において、液胞での分解は重要な役割を果たしていることが予想され、実際 APG 遺伝子を欠損したシロイヌナズナは、飢餓応答に異常をきたし、枯死の進行が促進されていることが明らかになった。また、植物においても Apg8p ホモログを GFP で蛍光標識することによってオートファジーを簡便に可視化する系を確立し、APG 遺伝子欠損植物の表現型解析と組み合わせることにより植物個体におけるオートファジーの生理的意義について解明しつつある。

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. 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.
5. Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Ohsumi, Y., (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene *Plant Physiol.* **129**, 1181-93.