



www.nibb.ac.jp/enehen/index-j.html

分子細胞生物学研究部門

自自然界において、生命体は常に栄養の枯渇の危険性に晒されており、飢餓環境下でいかに生き延びるかは、極めて重要な問題である。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構の1つであり、広く真核生物に保存されている。生物は外界の栄養源の飢餓を感知すると、自己細胞の細胞質の構成成分やオルガネラをリソソーム/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。オートファジーの生理的な役割は未知の領域であり、現在様々な系で解析が進められている。例えば我々の肝細胞では、空腹時に活発なオートファジーが誘導され、血糖値の維持が図られている。酵母細胞では、窒素源の枯渇を引き金として胞子形成が誘導されるが、このように細胞内の構造を大きくつくりかえるためには既存のタンパク質の大規模な分解が不可欠であり、オートファジーは、このようなタンパク質分解を担っている。我々の研究室はオートファジーの分子機構解明を目指して様々な視点から研究を進めている。

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ตอบสนอง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課題はオートファジーに伴う膜動態の解明である。オートファジーの膜動態は従来解析が進んできた小胞輸送系

とは明らかに異なっており、細胞内に新たなコンパートメント、オートファゴソームを形成する過程が誘導される。細胞質の一部を取り囲む二重膜の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、オートファジーの進行がどのように制御されているのかなど、興味深い課題が山積しており、我々の研究は常に挑戦を求められている。液胞内の分解機構はさらに多様であり、本来非選択的と考えられるオートファジーが、選択的な分解やオルガネラ分解に係わる可能性についても解析が進められている。

オートファジーに関する APG 遺伝子群

酵母は遺伝学的な手法に優れ、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

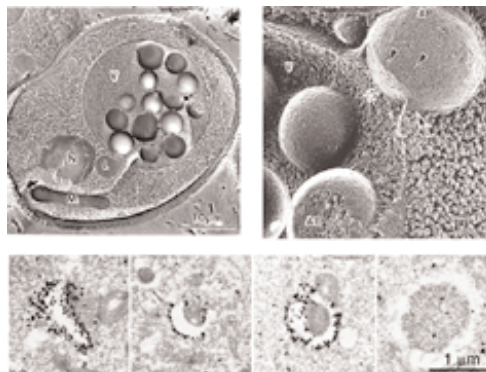


図1 飢餓条件下の液胞蛋白分解酵素欠損株のフリーズレプリカ像

(上) 液胞内に細胞質の一部を囲んだ球形の膜構造、オートファジックボディが多数蓄積する。

(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。

(下) Atg5の免疫電顕による動物細胞のオートファゴソーム形成過程

きた。我々はオートファジーの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。現在これらオートファジー関連遺伝子をATGと呼ぶことが国際的に合意されている。これらの遺伝子産物（Atgタンパク質）の解析を進めた結果、Atgタンパク質が4つの機能群を形成していることが明らかとなった。これら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未だほとんど分かっていない。我々はAtgタンパク質の空間的局在を調べ、多くのAtgタンパク質がPre-autophagosomal structure (PAS)

と呼ばれる液胞近傍の領域に集積していることを示した。現在、Atg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。またこれらタンパク質の構造機能相関にも焦点を当てた研究を進めている。

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Atg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。Atg12タンパク質（Atg12p）はC末端の

Gly 残基を介して Atg5p 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オートファジーの進行に必須である。Atg12p 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、Atg7p、Atg10p はその Atg12p の活性化 (E1 酵素) と結合反応 (E2 酵素) に関与している (図2)。第2のユビキチン様タンパク質 Atg8p は、プロテアーゼ Atg4p によって C 末端 Arg が切断された後 Atg7p によって活性化を受け、特異的 E2 酵素 Atg3p 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 (図2)。これら2つの新しいユビキチン様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注目して解析を進めている。

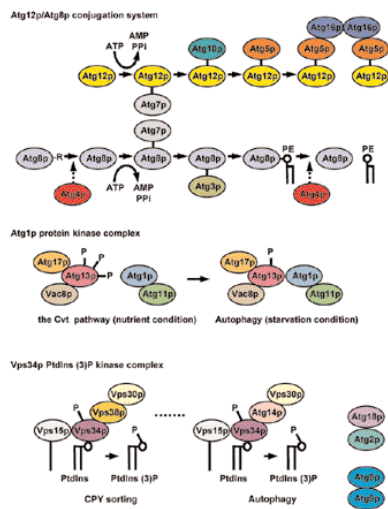
酵母から高等動植物へ

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 ATG 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 Atg8 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指標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 Atg5 ノックアウト ES 細胞を構築し、Atg12 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 Atg5-GFP の実時間観察により、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捉え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。また ATG 遺伝子破壊マウスの解析も平行して行っている。

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 ATG 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る。さらに、植物においても GFP-Atg8p によりオートファジーを可視化する系を確立し、植物個体においてもオートファジーの生理的意義が解明されつつある。



参考文献

1. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y., Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and its conditions for induction. *J. Cell Biol.* **119**, 301-311. (1992)
2. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, T., Ishii, T., Gerge, M. D. Klionsky, N. D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. A novel protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, **395**, 395-398. (1998)
3. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kiminami, E., Noda, T., and Ohsumi, Y. Ubiquitination-like system mediates novel protein lipidation. *Nature*, **408**, 488-492. (2000)
4. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhsa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657-668. (2001)
5. Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Ohsumi, Y. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol.* **129**, 1181-93. (2002)

図2 Atg タンパク質の機能

オートファゴソーム形成に関わる16個の Atg タンパク質群は相互作用をする4つの機能単位からなっている。

STAFF



大隅 良典
教授



鎌田 芳彰
助手



野田 健司
助手



鈴木 邦律
助手



藤木 友紀
研究員

技術課技術職員

壁谷 幸子

博士研究員

関藤 孝之
花田 孝雄
中戸 川仁
一村 義信
吉本 光希
馬場 美鈴
大根田 守介
小原 圭介
尾板 英子
小野寺 純

総合研究大学院大学院生

陰山 卓哉

松井 誠
特別共同利用研究員
川俣 朋子
技術支援員
三輪 雅美
今村 優子
竹内 有香
事務支援員
附柴 久美
原 洋子