



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

分子細胞生物学研究部門

オートファジーに関与する ATG 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、酵母の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 16 個の *APG* 遺伝子を同定した。最近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た。これらの遺伝子産物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 (PI3) キナーゼ複合体からなり、全ての反応系が正常に作動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いつに時間的空間的に制御され、オートファゴソーム形成過程で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 タンパク質の細胞内局在を系統的に調べ、多くの Atg タンパク質が Pre-autophagosomal structure (PAS) と呼ばれる液胞近傍の構造体に集積していることを明らかにしてきた。現在、PAS 形成における Atg タンパク質間の機能ネットワークを明らかにすべく、局在解析、遺伝的・物理的相互作用、Atg タンパク質の構造機能相関に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タンパク質キナーゼ Atg1 の制御機構、オートファジーの膜動態に関わる PI3 キナーゼについても詳細な解析を進めている。

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、飢餓環境下に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 (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細胞の再構築に用いる。細胞内のタンパク質は常に合成と分解のバランスの上に成り立っており、バルクのタンパク質分解を担うオートファジーの生理的な役割は生命活動の様々な局面に重要な働きをしていることが近年明らかとなっている。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孢子形成が誘導されるが、このように細胞分化には既存のタンパク質のオートファジーによる大規模な分解が不可欠である。細菌感染、様々な病態との関係も注目を集めている。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手法を駆使して研究を進めている。

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応答してオートファジーを誘導する。酵母のオートファジーは窒素 (アミノ酸)、炭素、イオウ、リン酸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、どのように形態形成されるのか、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、興味深い課題が数多く残されており、常に挑戦が求められている。

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、結合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 1)。Atg12 の構造解析、ドメイン解析が進みつつある。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 1)。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 2 つの系の相互関係、結合体形成の意味を *in vitro* 再構成系を用いて解析を進めている。

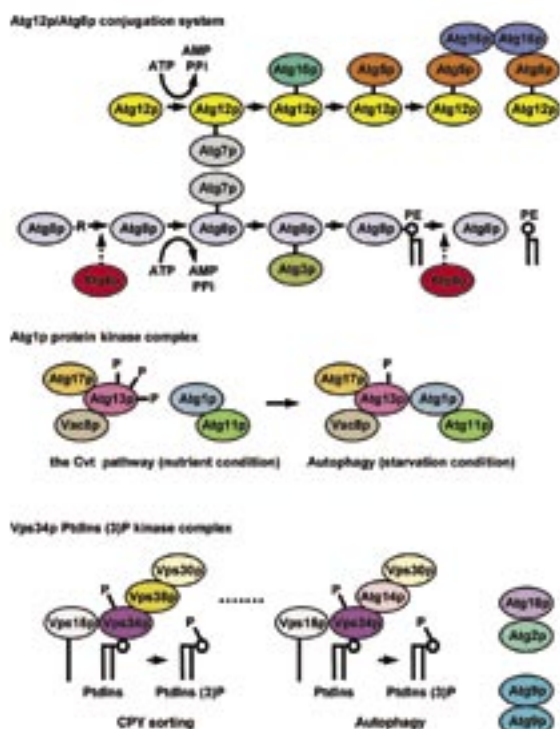


図 1. Atg タンパク質の機能
オートファゴソーム形成に関わる 16 個の Atg タンパク質群は相互作用をする 4 つの機能単位からなっている。

酵母におけるオートファジーの生理機能

オートファジーがいかなる生理機能を果たしているかについても、分解基質の選択性の問題、ミトコンドリアの分解への関わり、飢餓下の細胞死などについて検討を開始した。

多細胞系のオートファジー

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、高等動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、生細胞の中でオートファゴソームが形成される過程の可視化にも成功した。

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 (図 2)。

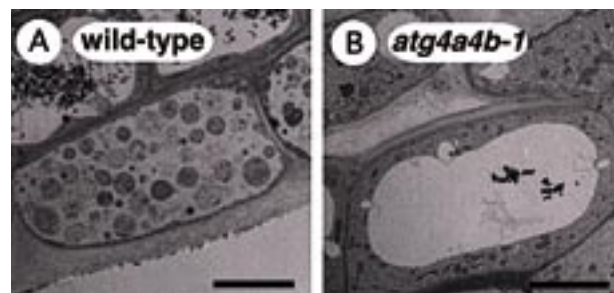


図 2. *atag4a4b-1* 変異株はオートファジー能を欠損している
野生株 (A) と *atag4a4b-1* 変異株 (B) の根にコンカナマイシン A を処理した。野生株の液胞の中にはミトコンドリアやゴルジ体や小胞体といったオルガネラに加え、細胞質を含むオートファジックボディが多数観察されるが、*atag4a4b-1* 変異株では観察されない。バーは 10 μ m。

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., Tokuhiya, 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. Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16, 2967-2983.

STAFF



大隅 良典
教授



鎌田 芳彰
助手



鈴木 邦律
助手



中戸川 仁
助手



小原 圭介
研究員

助手 (休職中)
野田 健司

技術課技術職員
壁谷 幸子

博士研究員

関藤 孝之
吉本 光希
藤木 友紀
花田 孝雄

大根田 守
小野寺 純
尾板 英子
奥 公秀

特別協力研究員
馬場 美鈴

特別協力研究員
馬場 美鈴

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
市川 理恵
近藤 千香

事務支援員
附柴 久美
原 洋子