

ど), ベシクルの形態変化や破壊などに関する研究例は限られている。したがって, モデル膜を用いた研究例だけをみても, ヒト IAPP のアミロイド凝集体と脂質膜との相互作用に関して, 実験条件に依存する面や, 未解明な領域があり, その全体像を十分に説明できるモデル構築には至っていないというのが現状であると思う。アミロイド凝集そのものが過渡的に形成され, その形やサイズが実験条件の違いにより大きく変わることや, アミロイド凝集の構造情報を高解像度で得ることが困難であることがその理由としてあげられる。また, 先に記述したように多くのアミロイド形成ペプチドの細胞毒性に関して, 共通の毒性機構が示唆されている¹⁰⁾。これについても, 脂質膜との相互作用という観点から, アミロイドという凝集体の本質は理解されていない。

最後に, 高齢化社会が急速に進んでいる日本の2型糖尿病患者数は, 約230万人と報告されている(2009年, 厚生労働省発表)。2型糖尿病は, 遺伝的要因も含まれるが, 食べ過ぎ, 運動不足, 肥満といった生活習慣が原因の糖尿病とされている。β細胞からインスリンと共に分泌されるIAPPが不溶性のアミロイドになると, β細胞そのものが減少してしまう。暴飲暴食をさけ, 適度な運動を心がけたいものである。

謝辞

剛体モデルを用いたシミュレーションでは, 筑波大学人間総合科学研究科D Hall先生に深謝いたします。

- 1) 李 映昊, 小澤大作, 後藤祐児 (2009) 生化学, 81, 677-687.
- 2) Jayasinghe, S.A. & Langen, R. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 2002-2009.
- 3) Höppener, J.W.M. & Lips, C.J.M. (2006) *Int. J. Biochem. Cell Biology*, 38, 726-736.
- 4) Larson, J.L. & Miranker, A.D. (2004) *J. Mol. Biol.*, 335, 221-231.
- 5) Gellermann, G.P., Appel, T.R., Tannert, A., Radestock, A., Hortschansky, P., Schroech, V., Leisner, C., Lütkepohl, T., Shtrasburg, S., Röcken, C., Pras, M., Linke, R.P., Diekmann, S., & Fändrich, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 6297-6302.
- 6) Apostolidou, M., Jayasinghe, S.A., & Langen, R. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 17205-17210.
- 7) Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G.C., & Yankner, B.A. (1994) *Nature*, 368, 756-760.
- 8) Gurlo, T., Ryazantsev, S., Huang, C.-j., Yeh, M.W., Reber, H. A., Hines, O.J., O'Brien, T.D., Glabe, C.G., & Butler, P.C. (2010) *Am. J. Pathol.*, 176, 861-869.
- 9) Haataja, L., Gurlo, T., Huang C.J., & Butler, P.C. (2008) *En-*

docr. Rev., 29, 303-316.

- 10) Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., & Glabe, C.G. (2003) *Science*, 300, 486-489.
- 11) Anguiano, M., Nowak, R.J., & Lansbury, Jr. P.T. (2002) *Biochemistry*, 41, 11338-11343.
- 12) Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., & Lal, R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 10427-10432.
- 13) Green, J.D., Kreplak, L., Goldsby, C., Blatter, X.L., Stolz, M., Cooper, G.S., Seelig, A., Kistler, J., & Aepli, U. (2004) *J. Mol. Biol.*, 342, 877-887.
- 14) Engel, M.F.M., Khemtouri, L., Kleijer, C.C., Meeldijk, H. J.D., Jacobs, J., Verkleij, A.J., de Kruijff, B., Killian, J.A., & Höppener, J.W.M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 6033-6038.
- 15) Sasahara, K., Hall, D., & Hamada, D. (2010) *Biochemistry*, 49, 3040-3048.

笹原 健二

(神戸大学大学院医学研究科構造生物学分野)

Amyloid fibril formation of islet amyloid polypeptide in the presence of lipid membrane and membrane disruption

Kenji Sasahara (Division of Structural Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan)

投稿受付: 平成22年7月29日

オートファジーによるミトコンドリア分解機構

はじめに

ミトコンドリアは, 酸化的リン酸化によるエネルギー産生のほか, 脂肪酸β酸化やアポトーシスの制御など, 細胞にとって重要な役割を果たしている。一方, ミトコンドリアは細胞内で最大の活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) 産生器官でもあることから, 自身が産生したROSにより絶えず酸化ストレスに暴露されている。ミトコンドリア内では抗酸化酵素によりROSの影響を軽減し, また傷害を受けたミトコンドリアDNAやタンパク質を修復・分解することで品質管理を行っている。こうした品質維持能力を上回る傷害をミトコンドリアが受けた場合, 細胞はオートファジーを利用して機能不全に陥ったミトコンドリアをまるごと分解していると考えられている。若年性パーキンソン病の原因遺伝子である *PARK2* と *PINK1/PARK6*

がそれぞれコードするタンパク質 Parkin と PTEN-induced putative kinase protein 1 (PINK1) がオートファジーによるミトコンドリア分解 (マイトファジー) に関連していることが明らかとなり¹⁾, 近年, マイトファジーは非常に注目を浴びている. ここでは, マイトファジーの分子機構を中心に, 最新の知見を私たちの研究成果を交えながら紹介したい.

1. オートファジー

一般にオートファジーは, 細胞質におけるタンパク質やオルガネラの非選択的な分解機構を意味する. 飢餓などの細胞ストレスによってオートファジーが誘導されると, 隔離膜と呼ばれる脂質二重膜が非選択的に細胞質やオルガネラを取り囲む. そして, 膜が伸展しオートファゴソームと呼ばれる小胞になり, 分解の場であるリソソーム (酵母の場合は液胞) と融合し, 取り込んだ物質を分解する. 分解によって生成されたアミノ酸は, 飢餓などのストレスに対応するために必要なタンパク質の合成に再利用される²⁾. こうしたオートファジー機構は, 酵母から哺乳類までほとんど全ての真核生物に保存されている. これまでに酵母を用いた研究から, 35 のオートファジー関連遺伝子 (autophagy-related gene: ATG 遺伝子) が同定されており, これらの遺伝子がコードするタンパク質の機能解析からオートファジーの分子機構が明らかになってきている. 一方で, 哺乳類の研究から, オートファジーは飢餓への防御反応としてだけではなく, 発生, 分化, 細胞内の恒常性維持などの生理的機能や発がん抑制, 免疫応答, 糖尿病抑制などの疾患予防に寄与していることが明らかになっている³⁾.

オートファジーにはこのような細胞質成分の非選択的な分解のみならず, 特定のオルガネラやタンパク質を選択的に取り込み分解する機構がある. 前述の非選択的なオートファジーをここではバルクオートファジーと記し, 選択的オートファジーとの区別を明確にしたい. 選択的オートファジーとして, ミトコンドリア, ペルオキシソーム, 小胞体, リボソーム, タンパク質凝集体, リケッチアやサルモネラなどの細胞内侵入病原体を選択的に分解する, マイトファジー, ペキソファジー, レティキュロファジー, リボファジー, アグリファジー, ゼノファジーが存在する. また, 出芽酵母で観察される aminopeptidase I (Ape1) と α -mannosidase (Ams1) を選択的に液胞に運び込む Cvt (cytoplasm to vacuole targeting) pathway がこれまでに報告されている⁴⁾. 中でも特に出芽酵母における Cvt pathway と

メタノール資化性酵母におけるペキソファジーは盛んに研究されてきた^{5,6)}. その結果, 1) 選択的オートファジーにはバルクオートファジーに必要な ATG 遺伝子の大部分が必要なこと, すなわち選択的オートファジーもバルクオートファジーとほぼ同じ分子機構を利用していること, 2) バルクオートファジーには関与しない Atg11 が, 選択的オートファジーの積荷となるペルオキシソームや Cvt complex (Ape1 と Ams1 の複合体) を認識するためのレセプターとして機能していることが明らかになっている.

2. マイトファジーは選択的にミトコンドリアを分解している

1957 年に Clark らが哺乳類細胞で, 1992 年に Takeshige らが出芽酵母で, いずれも電子顕微鏡観察によりミトコンドリアがオートファジーによって分解されることを報告している^{7,8)}. しかしながら, ミトコンドリア分解がオートファジーにより選択的に行われているかを含め, マイトファジーの分子機構はこれまで殆ど明らかにされていなかった. 我々はマイトファジーの分子機構を解明するため, 出芽酵母でマイトファジーを観察する Om45-GFP processing assay を確立した⁹⁾. green fluorescent protein (GFP) は安定した構造をとるタンパク質で, 液胞内で比較的長期間分解を受けずに残存できる. ミトコンドリア外膜に高発現している 1 回膜貫通型の膜タンパク質 Om45 の C 末端に GFP を結合したキメラタンパク質 (Om45-GFP) が発現するように染色体上で組換えを行うと, Om45-GFP は効率よくミトコンドリアに局在する. マイトファジーが誘導され, ミトコンドリアが液胞に運び込まれると Om45 は早期に分解を受け安定な GFP だけが切り出される. 液胞内に蓄積した GFP は蛍光顕微鏡で観察できるだけでなく, 図 1 に示すようにウエスタンブロッティングで観察することが可能であり, 切り出された GFP の量が誘導されたマイトファジーの程度を反映する.

このアッセイ法を用いてさまざまな条件でマイトファジー誘導を試みたところ, 二つの効率的なマイトファジー誘導条件が見いだされた. 一つ目は, 乳酸やエタノールなどの非発酵性炭素源のみを加えた培地 (解糖系で ATP を合成できない培地) で酵母を前培養し, 次にグルコースを炭素源とした飢餓培地 (アミノ酸などの窒素源を除いた培地) で培養した場合である. 非発酵性炭素源培地にて前培養するとミトコンドリアの電子伝達系が唯一の ATP 合成経路となるため, 酵母内のミトコンドリアの量が数～十数倍に増加する. このミトコンドリアが増えた状態の酵母

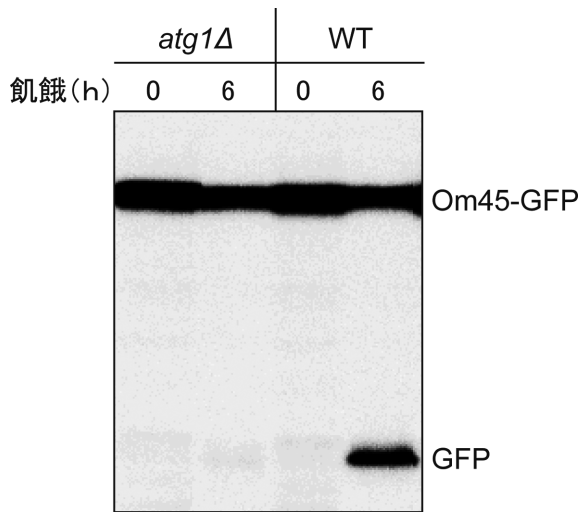


図1 Om45-GFPを用いたマイトファジーの観察

Om45-GFPが発現した *atg1Δ* 株と野生株 (WT) を乳酸培地で培養し、対数増殖期になったところで飢餓培地に交換し6時間培養した。回収した菌体を抗GFP抗体でウエスタンブロットした。オートファジー不能の *atg1Δ* 株ではマイトファジーが起らず、GFPの切り出しが認められない。

を、グルコースを炭素源とした飢餓培地にて培養すると、解糖系でのATP合成に切り替わるため、ミトコンドリアが不要となる。この不要となったミトコンドリアをマイトファジーが効率よく分解しているものと考えている。面白いことにATP合成にミトコンドリアが必要な乳酸を炭素源とした飢餓培地では、バルクオートファジーはグルコースの時と同程度誘導されているにもかかわらずマイトファジーは殆ど誘導されない。このことから、ATP合成におけるミトコンドリアの寄与に応じて、マイトファジーはバルクオートファジーと独立してミトコンドリア分解を制御していると考えられる⁹⁾。二つ目は、非発酵性炭素源培地で定常期に到達するまで培養を続けた場合である。増殖期ではATPの需要が高く細胞内でミトコンドリアが増加する。定常期に入るとATPの需要が減少するためミトコンドリアが不要となりマイトファジーによって分解されるものと考えている⁹⁾。

さらに、マイトファジーと既知のATG遺伝子との関連を調べた結果、ペキソファジーやCvt pathwayと同様に、ほとんどのATG遺伝子がマイトファジーには必須であり、また積荷を認識するアダプターであるAtg11もマイトファジーで機能していることが明らかとなった⁹⁾。これらのことから、出芽酵母におけるマイトファジーは選択的オートファジーの一種であると位置づけられるようになった。

3. 新規オートファジー関連因子の同定と解析

Okamotoらと我々は同時期に、マイトファジー関連遺伝子同定を目的として、出芽酵母遺伝子破壊株ライブラリーを用いてマイトファジー不能株のスクリーニングを行い、それぞれ複数のマイトファジー関連遺伝子を同定した。両グループから同時に、マイトファジー必須遺伝子としてATG32 (*ECM37*) が報告された^{10,11)}。

ATG32は、マイトファジーには必須であるがペキソファジー、Cvt pathwayやバルクオートファジーには関与しないため、マイトファジー特異的な遺伝子であると考えられる。ATG32がコードするAtg32は529アミノ酸からなり、1箇所の膜貫通ドメインを持つミトコンドリア外膜のタンパク質である。また、Atg32は選択的オートファジー共通のレセプタータンパク質Atg11と結合することが明らかになっている。特にこの結合はマイトファジー誘導によって促進されるため、Atg32はマイトファジーが捕捉するためのミトコンドリア上の目印として機能していると考えられている^{10,11)}。さらに、Atg32は隔離膜形成に必須のAtg8と結合するW/YxxL/V/Iモチーフを持っており、Atg8-Atg32結合もマイトファジー過程に重要な役割を果たしていることが示唆されている¹⁰⁾。

我々が同定したもう一つのマイトファジー関連遺伝子ATG33 (*YLR356W*) がコードするタンパク質Atg33もミトコンドリア外膜に局在し、ペキソファジー、Cvt pathwayやバルクオートファジーには全く関与しないことが明らかになっている。興味深いことに、この破壊株では飢餓で誘導されるマイトファジーは野生株と同程度誘導される一方、定常期で誘導されるマイトファジーは有意に抑制される¹²⁾。Atg33のマイトファジーにおける機能は現在のところ明らかでないが、定常期で誘導されるマイトファジーに特異的に関与することから、何らかの傷害が蓄積した、あるいは老化したミトコンドリアの選別因子の一つではないかと考えている。

4. 出芽酵母におけるマイトファジーの分子機構

PriaultらはF₁F₀-ATPaseのフォールディングに関与するタンパク質Fmc1をコードする遺伝子FMC1 (formation of mitochondrial complexes 1) をコンディショナルノックアウトすると、嫌気性培養下でマイトファジーが誘導されることを、NowikovskyらはミトコンドリアのK⁺/H⁺イオン交換活性のあるミトコンドリア内膜タンパク質Mdm38をコードする遺伝子MDM38 (mitochondrial distribution and

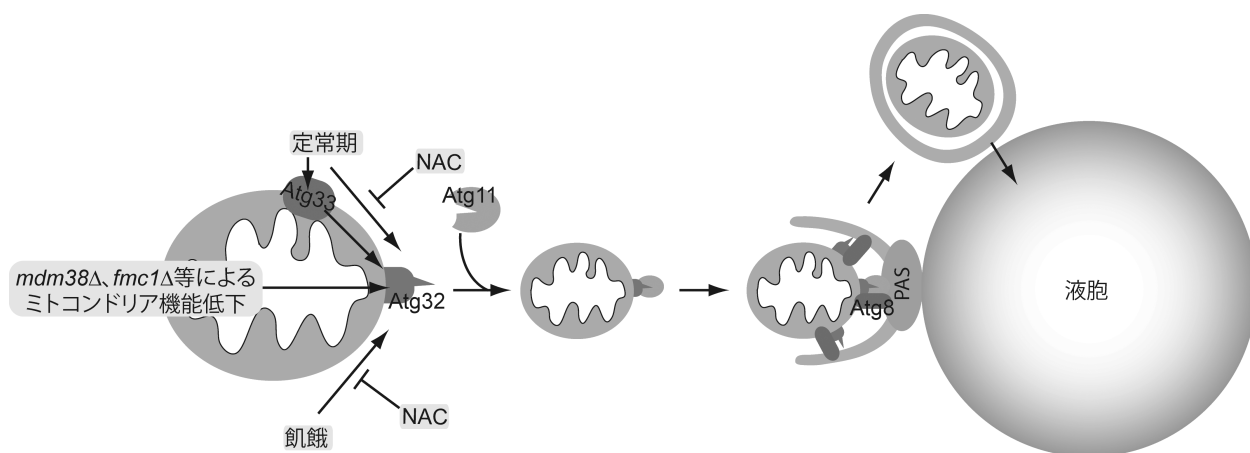


図2 出芽酵母におけるマイトファジーの分子モデル

マイトファジーはミトコンドリアの機能障害や飢餓、非発酵性培地で定常期に達した時に誘導される。特に定常期での誘導には Atg33 の関与が示唆されている。マイトファジーが誘導されると、Atg11 がミトコンドリア外膜の Atg32 と結合し、ミトコンドリアを PAS に局在させる。PAS で Atg32 はさらに Atg8 と結合し隔離膜を伸張していく。最終的にオートファゴソームで隔離されたミトコンドリアは液胞に運ばれ分解される。

morphology 38) をノックアウトすると、ミトコンドリアが膨張し、最終的にはマイトファジーで除去されることを報告している^{13,14)}。これらの結果は、ミトコンドリア傷害がマイトファジーを誘導することを示唆している。一方、抗酸化剤である *N*-acetylcysteine (NAC) やシステインがマイトファジーを抑制することも明らかにされている^{10,15)}。このことは、ミトコンドリア傷害の指標でもある ROS がマイトファジー誘導に関与していることを示唆している。

図2にこれまでの報告から明らかになっているマイトファジーの分子モデルを示す。1) *mdm38Δ* や *fmc1Δ* によってもたらされるミトコンドリアの傷害はマイトファジー誘導因子の一つである。また、マイトファジーは、非発酵性培地で培養後の飢餓や、非発酵性培地で定常期に到達させることでも誘導される。この誘導は、NAC などの抗酸化剤によって抑制される。2) マイトファジーが誘導されると、ミトコンドリア外膜の Atg32 が Atg11 によって認識され、Atg11 と Atg32 が結合する。3) Atg11 がミトコンドリアを、隔離膜形成の場である pre-autophagosomal structure (PAS) に局在化させる。ここでの Atg8-Atg32 結合が隔離膜形成に関与している。4) PAS でオートファゴソームに取り込まれたミトコンドリアは、最終的に液胞内に取り込まれ分解される。

5. 哺乳類細胞におけるマイトファジー

2008 年に Youle らのグループから若年性パーキンソン病の原因遺伝子の一つ *PARK2* にコードされているタンパ

ク質 Parkin がマイトファジーに関連していることが報告されて以降¹⁾、哺乳類細胞におけるマイトファジーは近年非常に注目を浴びている。若年性パーキンソン病関連遺伝子 *PINK1/PARK6* がコードするタンパク質 PINK1 は、膜電位が低下したミトコンドリア上のみ安定に局在し、このミトコンドリア上の PINK1 がユビキチンリガーゼである Parkin と結合することでミトコンドリア上のタンパク質をユビキチン化する¹⁶⁾。このミトコンドリア上タンパク質のユビキチン化が引き金となり、膜電位が低下したミトコンドリアはマイトファジーによって分解される。この現象は、マイトファジーが哺乳類におけるミトコンドリアの品質管理に重要な役割を担っていることを強く示唆している。

おわりに

出芽酵母の研究から、ミトコンドリアのオートファジーによる選択的な分解機構が明らかになりつつある。一方で、哺乳類細胞の研究から、マイトファジーが機能低下したミトコンドリアを除去するというミトコンドリア品質管理に貢献していることが明らかになってきている。残念ながら、酵母で発見された Atg32 などのマイトファジー因子は哺乳類には保存されておらず、逆に酵母ではマイトファジーがミトコンドリアの品質管理に関係していると証明できる決定的な証拠が得られていない。マイトファジーは、酵母からヒトまで保存された現象であり、両者の研究から得られた成果が結びついたとき、マイトファジー研究は飛

躍的に発展していくと思われる。ミトコンドリア機能障害に起因した疾患は数多くあり、近い将来マイトファジー研究がこうした疾患治療に貢献できるのではないかと我々は考えている。

- 1) Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., & Youle, R.J. (2008) *J. Cell Biol.*, **183**, 795–803.
- 2) Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 458–467.
- 3) Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., & Klionsky, D.J. (2008) *Nature*, **451**, 1069–1075.
- 4) Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., Dunn, W.A., Jr., Levine, B., van der Klei, I., & Seglen, P.O. (2007) *Autophagy*, **3**, 413–416.
- 5) Shintani, T., Huang, W.P., Stromhaug, P.E., & Klionsky, D.J. (2002) *Dev. Cell*, **3**, 825–837.
- 6) Farre, J.C., Manjithaya, R., Mathewson, R.D., & Subramani, S. (2008) *Dev. Cell*, **14**, 365–376.
- 7) Clark, S.L., Jr. (1957) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 349–362.
- 8) Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992) *J. Cell Biol.*, **119**, 301–311.
- 9) Kanki, T. & Klionsky, D.J. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 32386–32393.
- 10) Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 87–97.
- 11) Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., & Klionsky, D.J. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 98–109.
- 12) Kanki, T., Wang, K., Baba, M., Bartholomew, C.R., Lynch-Day, M.A., Du, Z., Geng, J., Mao, K., Yang, Z., Yen, W.L., & Klionsky, D.J. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4730–4738.
- 13) Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F.M., di Rago, J. P., & Martinou, J.C. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 1613–1621.
- 14) Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R.J., & Schweyen, R.J. (2007) *Cell Death Differ.*, **14**, 1647–1656.
- 15) Deffieu, M., Bhatia-Kissova, I., Salin, B., Galinier, A., Manon, S., & Camougrand, N. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 14828–14837.
- 16) Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M.R., & Youle, R.J. (2010) *PLoS Biol.*, **8**, e1000298.

廣田 有子¹, 青木 義政², 神吉 智丈²

(¹ 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野,

² 九州大学病院検査部)

Mitophagy: selective degradation of mitochondria by autophagy

Yuko Hirota, Yoshimasa Aoki and Tomotake Kanki (Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

構造変化を介した GPI アンカーによるタンパク質の細胞内輸送・局在制御

1. はじめに

GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカーは真核細胞で進化的に保存された構造を持つ糖脂質であり、翻訳後修飾としてタンパク質に結合し、タンパク質を細胞膜にアンカーする役割を持つ。GPI アンカーによるタンパク質の細胞内輸送・局在の制御を理解するために、まず GPI アンカーの生合成、構造変化について概略する (図 1, 図 2)。GPI アンカーは小胞体で約 10 ステップを経てホスファチジルイノシトール (PI) に *N*-アセチルグルコサミン (後でグルコサミンに変化する), 脂肪酸 (主にパルミチン酸), 三つのマンノース, 三つのエタノールアミンリン酸が順次結合し, 小胞体内腔側で完成型の GPI アンカーとなる。

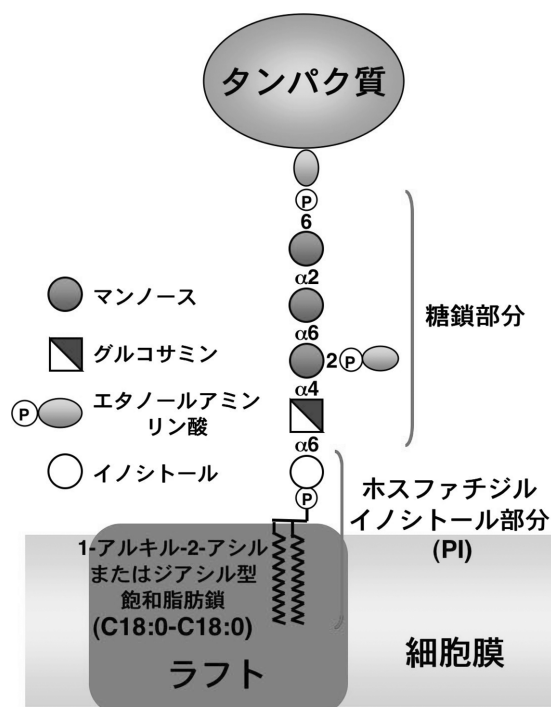


図 1 細胞表面の GPI アンカー型タンパク質の基本構造
細胞表面の GPI アンカー型タンパク質は、輸送過程に受けた構造変化の結果、2 本の飽和脂肪酸鎖を持ちラフトに親和性を持つようになる。また真ん中のマンノースに結合していたエタノールアミンリン酸の除去は小胞体の出口への効率的なソーティングに必要である。