

特集：観て考える，考えて観る—細胞内オルガネラの空間構造変化

オートファジーの膜動態を巡る謎

小 原 圭 介, 大 隅 良 典

オートファジーは、単に飢餓を乗り越えるためのリサイクル機構というだけでなく、細胞分化・細胞内浄化・病原菌駆除・細胞死など様々な生命現象に関わることが明らかとなってきた。このことは自己を分解する過程がいかに重要であるかを物語っている。「必要な部分を分解酵素から護りつつ大規模に自己を分解する」という難題をクリアするために、細胞は分解されるべき細胞質成分を一旦隔離してから分解コンパートメントへ輸送するという戦略をとっている。つまり「細胞質成分の隔離」はオートファジーを支える基幹プロセスである。この過程は「二重膜構造の新生」という非常にユニークな膜動態によってなされ、それに特化したかのような特殊なタンパク質の一群がある。それらの役者達がどうやって二重膜構造を新生するのか？ これまでに分かったことと残された謎の数々を紹介する。

1. はじめに

「オートファジー」という言葉は、ここ数年で広く知られるようになり、オートファジー関連の論文数は増加の一途をたどっている。オートファジーの定義は、「自己の細胞質成分を分解コンパートメント（液胞／リソソーム）で分解すること」である。近年、オートファジーが「栄養源のリサイクル」という基本的な役割の他にも、発生・分化、抗がん作用、神経変性疾患の抑制、などの高次機能を持つことが分かってきており¹⁾、オートファジー研究が広がる大きな要因となっている。高等植物ではオートファジーが植物体の老化や病害などに関与しており、農学的にも重要なテーマになっている。このように、様々な局面でオートファジーが多彩な生理的機能を果たしていることが明らかになる中で、その全てのケースにおいて基幹となる「細胞質成分の隔離」プロセスを解き明かすことがますます重要になってきた。後述するマクロオートファジーでは、この

過程は「二重膜構造の新生」というユニークな膜動態によって支えられている。そこには数々の謎が潜んでおり、それらを解き明かすことがオートファジーの根幹を理解することに繋がる。そこで本稿では、特にマクロオートファジーの膜動態に焦点をあて、研究の現状と未だ紐解かれていない謎を紹介する。

2. オートファジーの膜動態とそれを支える分子群

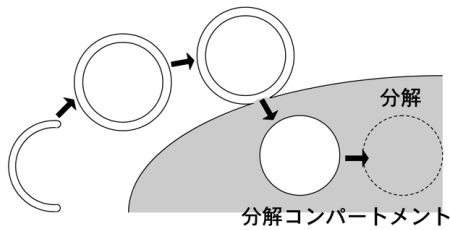
1) オートファジーの種類

細胞質成分を分解コンパートメントへ運ぶ方法は大きく分けて三つあり、それに基づいて「マクロオートファジー」「ミクロオートファジー」「シャペロン介在性オートファジー」という3種類に分類される(図1)。マクロオートファジーでは、囊状の膜構造がカップ状に伸長しながら細胞質成分を取り囲み、二重膜構造が形成される²⁾。その外膜で分解コンパートメントと融合し、内膜構造と内包されている細胞質成分を分解する。ミクロオートファジーでは分解コンパートメントの膜自身が陥入して、細胞質成分を直接取り込む³⁾。シャペロン介在性オートファジーでは、シャペロンタンパク質の関与により、分解されるタンパク質がリソソーム膜を通過して分解コンパートメント内へと送り込まれる⁴⁾。この経路は哺乳類のみで知られる。この中で、マクロオートファジーは大規模な分解に最も大きく

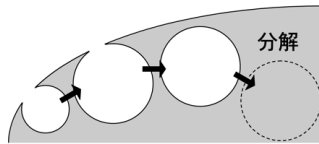
基礎生物学研究所分子細胞生物学研究部門 (〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中 38)

Key questions about membrane dynamics during autophagy
Keisuke Obara and Yoshinori Ohsumi (Division of Molecular Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Nishigonaka 38, Myodaiji-cho, Okazaki 444-8585, Japan)

マクロオートファジー macroautophagy



ミクロオートファジー microautophagy



シャペロン介在生オートファジー chaperone-mediated autophagy

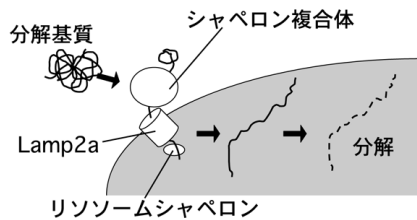


図1 オートファジーの種類

オートファジーは分解基質を分解コンパートメントへ運ぶ方法に基づいて3種類に分けられる。

貢献しており、他の二つは生理的役割の重要性はいまだはっきりしていない。そこで通常は、オートファジーという言葉はマクロオートファジーを指すことが多い。本稿ではこれ以降、マクロオートファジーを単にオートファジーと呼び、これに焦点を当てる。

2) オートファジーの膜動態—概要—

オートファジーの膜動態は、栄養飢餓にさらした出芽酵母を用いて詳しく調べられている。出芽酵母細胞を栄養欠損培地で培養すると、細胞質に「隔離膜」と呼ばれる囊状の膜構造が現れ、細胞質成分（時にはオルガネラを含む）を取り囲みながらカップ状に伸長し、縁が閉じて「オートファゴソーム」という二重膜構造になる（図2A）²⁾。オートファゴソームの直径は出芽酵母では平均約500nmである。動物細胞では、細胞種によっては1μmを超える。オートファゴソームは外膜で、分解コンパートメントである液胞と融合し、内膜構造と内包する細胞質成分を液胞内へと放出する。液胞内に放出された一重膜構造は「オート

ファジックボディー」と呼ばれ、野生株では速やかに崩壊して内容物が分解される。高等動植物のオートファジーでも基本的には同様のプロセスをたどる^{5~7)}。動物細胞の場合、分解コンパートメントとして液胞のかわりにリソソームが存在する。リソソームはオートファゴソームより小さいので、むしろリソソームがオートファゴソームに融合し、加水分解酵素を放出してオートファゴソーム内膜構造を分解する、と言った方が理解しやすいかも知れない。

3) オートファジー膜動態の特徴

しばしば誤解されやすいが、オートファゴソーム形成は、ゴミ袋の口を広げて物を取り込むような一重膜形成過程ではなく、二重膜構造の新生過程である。取えて例えるならば、口を縫い合わせたゴミ袋の側面で物をくるむように取り囲む過程である。これこそがオートファゴソーム形成の最大の特徴であり、小胞輸送などの膜動態と異なる点である。小胞輸送過程では、ERなど既に閉じた膜構造から小胞が出芽するため、脂質の疎水性部分を細胞質に触れさせることなく、内腔成分の輸送を行える。しかし、オートファゴソームは閉じた構造の内腔成分ではなく、細胞質成分を新たに取り囲む必要がある。このプロセスを一重膜形成で行うとすると、伸長する膜の端の部分で脂質の疎水性部分が細胞質に露出してしまふ。脂質の疎水性部分を細胞質から保護しながら細胞質を取り囲む、というジレンマを解消するには、囊状の膜構造を伸長・変形させるしかなく、必然的に二重膜構造とならざるを得ないと考えられる（図2B）。

このようにオートファゴソーム形成は、非常にユニークなプロセスであるが、形成されるオートファゴソーム自体も興味深い特徴を備えている。凍結切断法の電子顕微鏡観察から、オートファゴソーム内膜にはほとんどタンパク質が存在しないことが分かった（図2C）⁸⁾。タンパク質を排除した膜がどのようにしてできるかは分かっていない。オートファゴソーム外膜に目を向けると、こちらもタンパク質はあまり含まれていないようだ。外膜は液胞／リソソームと融合するため、soluble NSF attachment protein receptor (SNARE) などの融合装置を備えているはずであるが、数はあまり多くないのかも知れない。また、超薄切片上で隔離膜のリン脂質の層は他の膜系に比べてはっきり観察にくい（図2D）²⁾。このように隔離膜やオートファゴソーム膜はかなり特異な性質を持つが、脂質組成など生化学的な解析はほとんど進んでいない。

4) オートファジー関連遺伝子

オートファジーを分子レベルで研究する端緒になったのは、出芽酵母を用いたオートファジー能欠損変異体の単離である。液胞内に放出されたオートファジックボディー

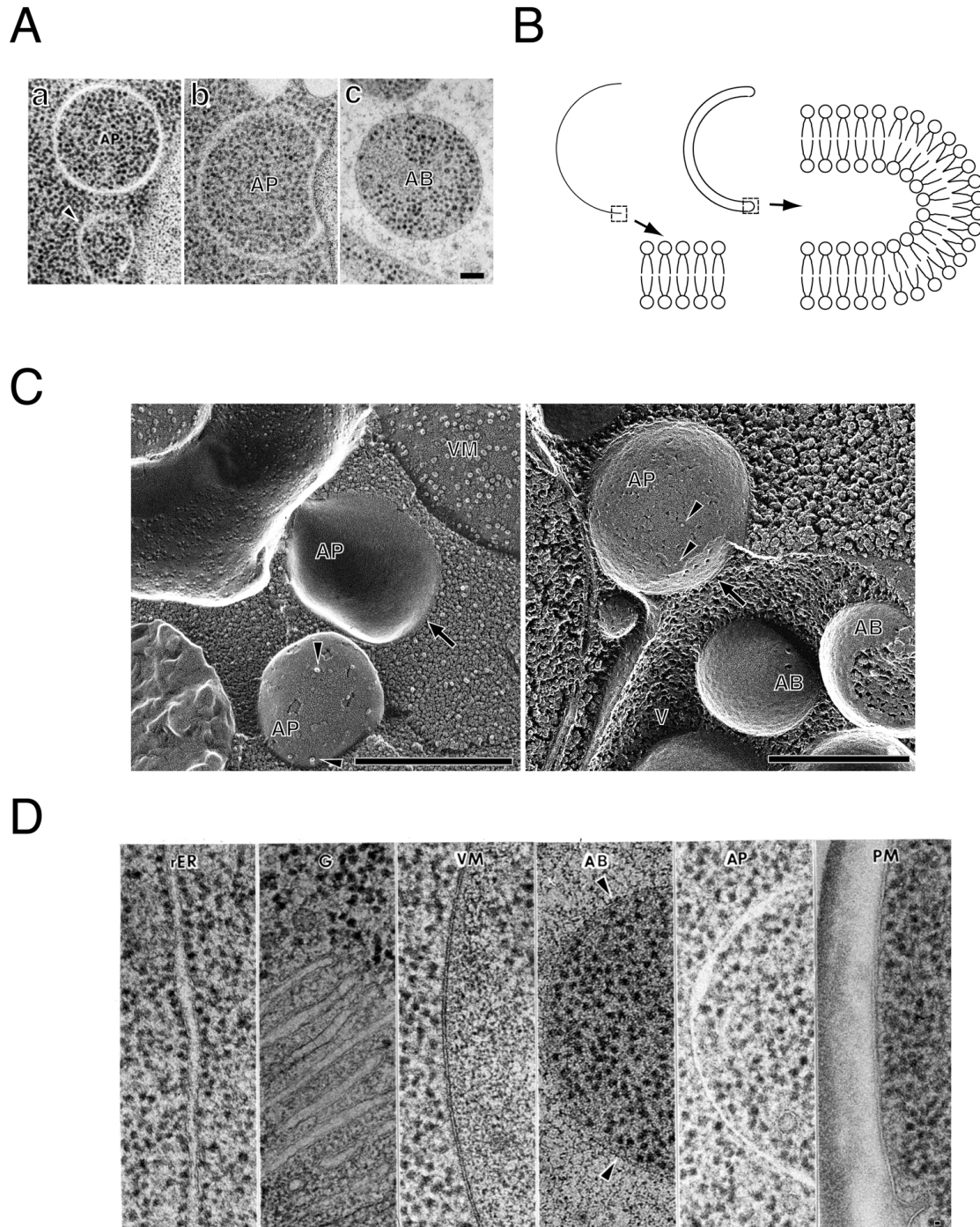


図2 オートファジーの膜動態

A: オートファジー膜動態の概要. a, オートファジーが誘導されるとカップ状の隔離膜 (矢じり) が細胞質を取り囲むように伸長し, 閉じた二重膜構造のオートファゴソーム (AP) が形成される. b, オートファゴソームは外膜で液胞膜と融合する. c, 内膜構造はオートファジックボディー (AB) として液胞内に放出される. (Bar: 100nm) B: 伸長中の隔離膜の縁. 四角で囲った部分の拡大図を示す. 細胞質の囲い込みを一重膜で行うとすると (左側), 脂質の疎水性部分を細胞質から保護できない. 二重膜で細胞質を取り囲むことにより (右側), 脂質の疎水性部分は細胞質から保護される. C: オートファゴソームの凍結断片の電子顕微鏡写真. オートファゴソーム (AP) の内膜, および液胞 (V) に放出されたオートファジックボディー (AB) の膜にはタンパク質がほとんど見当たらない (矢印). 外膜にはタンパク質が散見されるが (矢じり), 液胞膜 (VM) に比べると極端に密度が低い. (Bars: 500nm) D: 他の膜系との比較. オートファゴソーム (AP) やオートファジックボディー (AB) の膜は, 他の膜に比べてリン脂質の層が観察しにくい. (rER: 粗面小胞体, G: ゴルジ体, VM: 液胞膜, PM: 細胞膜, Bar: 10nm)

Reproduced from *The Journal of Cell Biology*, 1994, 124: 903-913 (Copyright 1994 The Rockefeller University Press) and *Cell Structure and Function*, 1995, 20: 465-471 (Copyright 1995 Japan Society for Cell Biology).

表1 ATG 遺伝子群とその機能

ATG 1	タンパク質キナーゼ
ATG 2	Atg18と複合体を形成
ATG 3	Atg8 特異的な E2 酵素
ATG 4	Atg8 のプロセッシングと脱 PE 化反応を担うシステインプロテアーゼ
ATG 5	Atg12と共有結合し、Atg12-Atg5 複合体となる
ATG 6	PtdIns3 キナーゼ複合体のサブユニット
ATG 7	Atg8, Atg12に共通の E1 酵素
ATG 8	PE と複合体を形成するユビキチン様タンパク質
ATG 9	膜貫通タンパク質
ATG 10	Atg12 特異的な E2 酵素
ATG 11	富栄養条件下の選択的オートファジー (Cvt 経路) の基質アダプター
ATG 12	Atg5 と複合体を形成するユビキチン様タンパク質
ATG 13	飢餓シグナルに応じて脱リン酸化され、Atg1 の活性化に関与
ATG 14	オートファジー特異的な PtdIns3 キナーゼ複合体のサブユニット
ATG 15	オートファジックボディーの崩壊に関わるリパーゼ様タンパク質
ATG 16	Atg12-Atg5 複合体と複合体を形成
ATG 17	飢餓条件下で Atg タンパク質集積の土台となる
ATG 18	Atg2 と複合体を形成する PtdIns(3)P 結合タンパク質
ATG 19	Cvt 経路の基質 ApeI の受容体
ATG 20	Cvt 経路に必要なソーティングネキシン
ATG 21	Atg18 のホモログで Cvt 経路に必要
ATG 22	オートファジックボディーの崩壊に関わる液胞膜タンパク質
ATG 23	Cvt 経路で小胞の形成に関与
ATG 24	Cvt 経路に必要なソーティングネキシン
ATG 25	ペルオキシソームの選択的オートファジー (ベキソファジー) に関与
ATG 26	ベキソファジーに必要なステロールグルコシルトランスフェラーゼ
ATG 27	Cvt 経路に必要
ATG 28	ベキソファジーに関与
ATG 29	Atg17 や Atg31 と複合体を形成
ATG 30	未登録
ATG 31	Atg17 や Atg29 と複合体を形成

太字は正常なオートファゴソーム形成に必須な因子

は、通常は速やかに崩壊するが、液胞内プロテアーゼを欠損させた株や PMSF (セリンプロテアーゼ阻害剤) 処理した細胞では蓄積し、ブラウン運動によって動き回る⁹⁾。そこで、液胞内のオートファジックボディーの蓄積を指標にして、突然変異体のスクリーニングが行われ、最初のオートファジー不能株 *apg1-1* が単離された¹⁰⁾。オートファジー不能株は窒素欠乏培地で速やかに死滅することが分かり、第一段階として窒素欠乏培地上での生存に注目してスクリーニングが行われた。原因遺伝子の同定が進められ、その後の複数グループの解析を併せ^{11,12)}、現在は統一された名前として **ATG 1**~**ATG 31** が報告されている (表1)。この中には、オートファジックボディーの崩壊に関与すると予想されるものやマイクロオートファジー、ペルオキシ

ソームの選択的分解に関わるものなども含まれる。オートファゴソーム形成に必須なものに限れば 18 個が存在する。同定された ATG 遺伝子のほとんどが機能未知の新規タンパク質をコードしていた。オートファジーに特化した一群の遺伝子が、静かに発見される時を待っていたかのようなのである。実際、ATG 遺伝子を破壊した株は、栄養源が豊富な培地では表現型を示さないものが多い。ATG 遺伝子の多くは、高等動植物にも保存されている^{13,14)}。

5) オートファジー関連タンパク質のグループ分け

Atg タンパク質はほとんどが機能未知であったが、現在では、オートファゴソーム形成に必須な 18 個については、五つの機能グループに分けられている (図3)。

〈Atg1 タンパク質キナーゼ複合体〉

Atg1 はセリン・トレオニンタンパク質キナーゼの一種であり、Atg13 や Atg17 と複合体を形成し、その活性が制御される^{15,16)}。Atg1 のキナーゼ活性はオートファジーに必要である。Atg17 は複数のコイルドコイル構造を有し、Atg タンパク質が集積する土台となっている^{17,18)}。最近、Atg29 と Atg31 が Atg17 と結合していることが分かった^{19,20)}。Atg17, Atg29 および Atg31 の欠損株でもオートファジー活性が僅かに残るため¹⁷⁾、これらは必須な装置というよりは、Atg タンパク質の集積を通してオートファジーを効率良く進行させる点に働いている可能性がある。しかし、少なくとも Atg17 欠損株では正常な大きさのオートファゴソームが形成されないため、正常なオートファゴソーム形成に必要なものとして分類される。

〈PtdIns 3-キナーゼ複合体〉

オートファゴソーム形成には脂質をリン酸化する反応も必要である²¹⁾。Vps34 は、生体膜リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトールをリン酸化してホスファチジルイノシトール 3-リン酸 [PtdIns(3)P] を産出する脂質キナーゼである²²⁾。Vps34 は少なくとも 2 種類の複合体 (複合体 I および II) を形成しており、そのうち複合体 I がオートファゴソーム形成に必須である^{21,23)}。複合体 I には Atg14 という特異的なサブユニットが組み込まれており、複合体 I の細胞内局在を制御することで、オートファジーに特化した機能を賦与している²⁴⁾。複合体 II には Vps38 が特異的なサブユニットとして組み込まれる。複合体 II はエンドソームを介した液胞酵素の輸送に必要である。最近、酵素反応の産物である PtdIns(3)P が、隔離膜およびオートファゴソーム膜に濃縮されていることが分かった²⁵⁾。

〈ユビキチン様タンパク質 Atg12 の結合系〉

Atg12 はユビキチン様タンパク質であり、ユビキチン結合反応系によって Atg5 と共有結合する²⁶⁾。この反応系では Atg7 が E1, Atg10 が E2 酵素として働く。Atg12 は Atg5 にしか結合しないと考えられ、E3 酵素は必要ないのかも

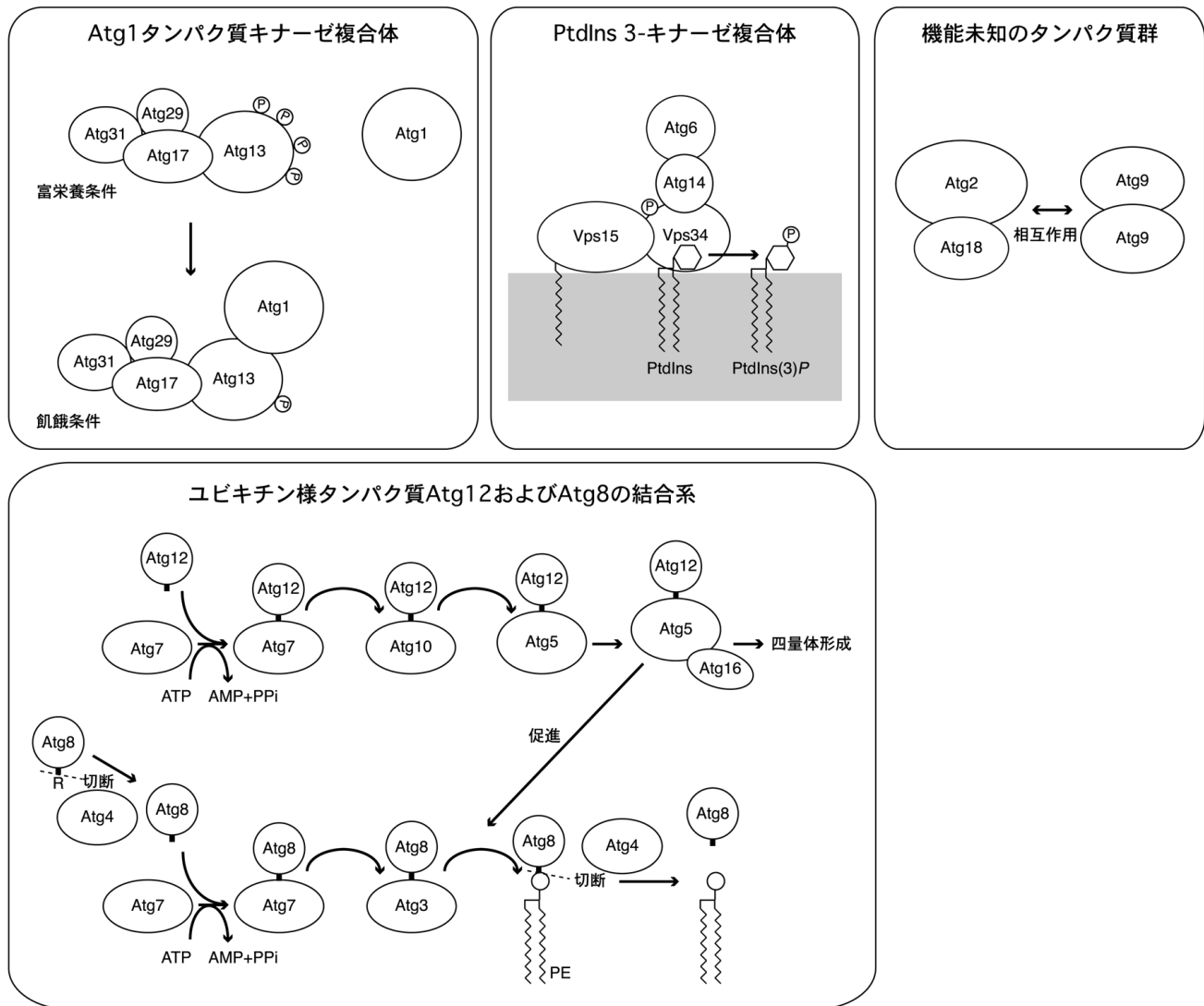


図 3 五つの Atg タンパク質機能群

正常なオートファゴソーム形成に必要な Atg タンパク質群は、機能をもとに五つのグループに分けられる。詳細は本文参照。

知れない。Atg12-Atg5 結合体は、Atg5 が Atg16 と結合することによって Atg12-Atg5/Atg16 複合体となり、さらに Atg16 がその複合体同士を繋ぎ合わせ、最終的に Atg12-Atg5/Atg16 複合体が四つ結合した巨大複合体になる^{27, 28)}。それぞれの因子の大半は、この複合体の状態で存在している。最近、Atg5 の結晶構造が解かれた。驚くことに Atg12 の結合相手である Atg5 はユビキチン様ドメインを二つ持っていた²⁹⁾。つまり、巨大複合体全体では Atg12 も含めて計 12 個のユビキチン様ドメインが存在することになる。Atg5-GFP の局在が動物細胞で観察され、主に伸長中の隔離膜の外側に局在しオートファゴソームの完成と共に膜上から離れることが分かった⁵⁾。この挙動は、輸送小胞の出芽時に働くコートタンパク質を想起させるが、今後検証すべき大きな課題である。また、最近 Atg12-Atg5/Atg16 複合体が、次に述べる Atg8 結合系において E3 酵素のよう

な働きをしていることが分かってきた³⁰⁾。この複合体の中で Atg12-Atg5 の部分のみで E3 様の機能を持っているので³⁰⁾、Atg16 との複合体形成は細胞内局在の制御など E3 様の働きとは別の点に効いているのだろう。

〈ユビキチン様タンパク質 Atg8 の結合系〉

オートファゴソーム形成には、もう一つのユビキチン様タンパク質 Atg8 が必須である。新生された Atg8 は、システインプロテアーゼである Atg4 によって、C 末端のアルギニン残基が切り落とされ、グリシンが露出する。Atg8 はその後 E1 酵素 Atg7、E2 酵素 Atg3、そして Atg12-Atg5/Atg16 複合体による E3 様の作用を受けて、ホスファチジルエタノールアミン (PE) という脂質と末端グリシン残基で共有結合する^{31, 32)}。Atg8 と PE の共有結合は、Atg4 によって切断され、Atg8 は再び PE との結合系へと回る。Atg8-PE は隔離膜やオートファゴソーム膜に存在すること

が知られている³³⁾.

〈機能未知のタンパク質群 Atg2, Atg18, Atg9〉

Atg9はAtgタンパク質の中で唯一の膜貫通タンパク質である³⁴⁾. その機能は、ほとんど分かっていない. Atg2とAtg18は複合体を形成する¹⁸⁾. Atg2は170kDaを超える巨大なタンパク質だが、既知のドメイン構造などが見当たらず、機能はほとんど分かっていない. Atg18はPtdIns(3,5)P₂に結合する³⁵⁾. Atg18は、他のAtgタンパク質と違って、液胞形態の制御にも関わっている. PtdIns(3,5)P₂を生成できない変異株では、液胞形態が異常になるもののオートファジーは起こることから、PtdIns(3,5)P₂への結合は液胞形態の制御に関わり、オートファジーには必須ではないと考えられる³⁵⁾. 一方、Atg18はPtdIns(3)Pにも結合する可能性が示されている^{36,37)}. PtdIns(3)Pへの結合はオートファジーに関与していると思われる. Atg2とAtg18はAtg9の細胞内局在を制御しているとの報告もあるが³⁸⁾、直接的な関与なのかどうかはまだ分かっていない.

Atgタンパク質の多くは高等動植物でも保存されている^{13,14)}. 形態学的な研究も併せて考えると、オートファゴソーム形成の基本的な仕組みは、真核生物で広く保存されているのであろう.

3. オートファジーの膜動態を巡る謎

オートファジー膜動態の基本的な事象とそれに関わる分子群を見てきた. それでは、それらの役者達が一体どのようにして二重膜構造を新生するのか、といった問題に移ろう. 一言で二重膜構造の新生といっても、そこには幾つもの要素があり、ほとんどの部分が未知のまま残っている. 主要な要素を挙げると「オートファゴソーム形成の場」、「膜の伸長や曲率形成」、「内膜と外膜の質的な分化」、「脂質の供給源」等々いくつもの謎が待ち構えており、それらは互いに関連しあった問題でもある. これらの問題を解くには、タンパク質同士の相互作用、脂質とタンパク質の連携、時間的な関係、ひいては他のオルガネラとの関係も視野に入れたダイナミックな思考が要求される. まだ分からないことは多いが、夜が徐々に明けゆく時のなぜだかワクワクした雰囲気を感じて頂ければ幸いである.

1) オートファゴソーム形成の場

オートファゴソームが細胞内のどこで作られるかは、解かれていない大きな問題である. 出芽酵母の電子顕微鏡写真からは、液胞近傍の比較的限られた場所でオートファゴソームが形成される様子がうかがえる²⁾. したがって、オートファゴソーム形成に直接関わる因子や膜などの材料が濃縮される場所が液胞近傍にあると考えられる. しか

し、その決まった場所でオートファゴソームが形成され続けるのか、もしくはそのような場所が新たに出現するのか、もともと複数あるのか、といったことははっきりしていない. 液胞同士の融合に関わるYpt7というGタンパク質を欠損させた細胞では断片化した小さな液胞が散在する. この株では、オートファゴソームと液胞の融合も阻害され、オートファゴソームはそれぞれの液胞に貼り付くかのように細胞質に散在している³⁹⁾. オートファゴソームは形成されるとすぐに液胞と融合すると考えられるので、少なくともこの株では、それぞれの液胞周辺で独立にオートファゴソームが形成されている可能性がある. これまでの電子顕微鏡観察の結果を総合すると、出芽酵母では液胞近傍でオートファゴソームが形成されやすいのは確からしい.

哺乳類細胞では、細胞のあちこちでオートファゴソームが同時多発的に形成されることが多い⁴⁰⁾. そこに何か足場となるような構造があるのか、特定のオルガネラに関連しているのかは分かっていない. 出芽酵母と高等動物細胞では、細胞体制やサイズが異なり、オートファゴソーム形成の場に関しては多様性があるのかも知れない. しかし、後述するようにAtg8-PEは、出芽酵母でも高等動物細胞でも隔離膜やオートファゴソーム膜に濃縮されるので^{6,7,33,40)}、Atg8-PEが濃縮する場所という必要条件是共通しているだろう.

出芽酵母では液胞近傍にAtgタンパク質が集積する pre-autophagosomal structure (PAS) という構造が存在する (図4a)⁴¹⁾. この構造は、電子顕微鏡では未だに捉えられておらず、その性質は謎に包まれている. PASにはオートファゴソーム形成に必須な18個のタンパク質全てが、少なくとも部分的には局在する¹⁸⁾. プロテインキナーゼであるAtg1を欠損させると多くのAtgタンパク質がPASに過剰に蓄積してしまうので¹⁸⁾、Atg1はAtgタンパク質の離合

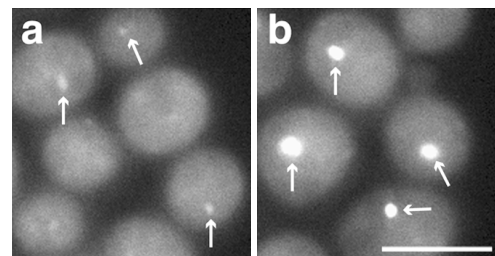


図4 Pre-autophagosomal structure (PAS)

Atgタンパク質は液胞近傍のPASと呼ばれる構造に集積する. a, 窒素飢餓処理2時間後のAtg17-GFPの局在. ATG1遺伝子を $atg1\Delta$ 株に入れ戻した細胞の写真. Atg17-GFPはPAS(矢印)に局在する. b, 窒素飢餓処理2時間後のAtg17-GFPの局在. 空ベクターを $atg1\Delta$ 株に導入した細胞. Atg17-GFPがPASに異常に蓄積しているのが分かる. a, bの写真は同一の撮影条件で取得され、同様の画像処理を経ているため輝度の比較が可能である. (Bar: 5 μ m)

集散に何らかの形で関わっているらしい (図 4b). Atg1 の温度感受性変異株では、制限温度下で PAS に過剰に蓄積した GFP-Atg8 が、許容温度に移すことで次々と輝点として PAS から分離し、その後液胞内が GFP の蛍光で光り出す⁴¹⁾. PAS で作られたオートファゴソームが PAS から分離して液胞と融合する、という解釈がなされた. しかし、オートファゴソームに局在しない Atg タンパク質も同じように許容温度で PAS から分離していくことが最近分かってきた (筆者ら未発表). したがって、分離していったのは Atg タンパク質の集合体であり、それを基にオートファゴソームが形成される可能性もある. 出芽酵母では、オートファゴソームの直径は約 500nm であり、光学顕微鏡下では GFP-Atg8 の輝点が PAS なのか、隔離膜やオートファゴソームなのか、あるいは全く別のものなのかを判別することができない. それぞれを特異的に標識するマーカーが必須になってきている. 最近では、多くの Atg タンパク質が PAS 以外に、他のオルガネラにも相当な量で局在することが分かってきた (筆者ら未発表). それらとオートファゴソーム形成の関係を調べるのが急務である.

PAS に局在する部分に関しては Atg タンパク質間のヒエラルキーが調べられ、Atg11 と Atg17 がタンパク質集積の土台になっていることが分かった¹⁸⁾. Atg11 は特に栄養条件が豊富でオートファジーが起こっていない時に主要な土台として働く⁴²⁾. 栄養飢餓にさらされると Atg17 の土台としての働きが重要になってくるようだ¹⁸⁾. そのためか Atg11 を欠損させた株でもオートファジーは正常に起こる⁴³⁾. 最近の研究では、PAS は同じ Atg タンパク質が常に存在する静的な構造ではなく、常に入れ替わりを繰り返し、柔軟に質的变化を起こせるダイナミックな構造であることが示され始めている. 高等動植物細胞では、今のところ PAS に相当する構造は報告されていない.

2) 隔離膜の伸長・曲率の形成

オートファゴソームによって細胞質を取り囲むには、嚢状の構造を伸長・変形させて二重膜構造を作らなければならないことは先に述べた. 最近、隔離膜を伸長させる仕組みに関連した興味深い報告がなされた. Atg8-PE 化反応を *in vitro* で再現したところ⁴⁴⁾, 形成された Atg8-PE が Atg8-PE 同士の結合を通して、自身がアンカーされている膜同士を近接させ、ヘミフュージョン (hemifusion: 脂質二重層のうち外側の層のみが融合する現象) を引き起こすことが分かった⁴⁵⁾. また、膜同士の近接作用が弱い Atg8 変異タンパク質を細胞内で発現させるとオートファジックボディーが小さくなる. これらの結果は、Atg8-PE が膜同士の近接化とヘミフュージョンを通して、隔離膜へ脂質を供給していることを示唆している. Atg8-PE は Atg4 による切断を受けることでリサイクルされる. このようなサイク

ルを通して Atg8-PE が隔離膜へ次々と脂質を供給する姿が想像されるが、今後の検証が待たれる.

PtdIns 3-キナーゼ複合体とオートファゴソームのサイズについても関連性が示唆されている. PtdIns 3-キナーゼ複合体のサブユニットである Atg14 の C 末端領域を欠失させると、オートファジックボディーが小さくなる²⁴⁾. PtdIns 3-キナーゼ複合体や産物である PtdIns(3)P が直接オートファゴソームのサイズを調節している可能性もあるが、PtdIns 3-キナーゼ複合体は Atg8 の局在に影響を与えるので¹⁸⁾, Atg8 の局在などを通して、オートファゴソームのサイズを間接的に調節している可能性もある. 隔離膜やオートファゴソーム膜に PtdIns(3)P が濃縮されていることが明らかになっており興味深い²⁵⁾.

曲率形成の問題は膜伸長とも密接に絡み合う問題である. 一般に、膜の曲率を調節する仕組みは幾つかある⁴⁶⁾. 輸送小胞などは、コートタンパク質が物理的に曲率を規定する. BAR ドメインと呼ばれるドメインがバナナ状の形をとり、膜の曲率を調節するという報告もある. タンパク質が楔のように打ち込まれれば正の曲率が生まれ得る. 脂質自身の関与もあり、親水性と疎水性領域の大きさのバランスにより、正や負の曲率が生じる. オートファゴソームの曲率を規定する仕組みはほとんど分かっていないが、幾つか興味深い報告がある. 伸長中の隔離膜では Atg12-Atg5/Atg16 が主に外側に局在し、オートファゴソームの完成と共に膜から外れる⁵⁾. その挙動は輸送小胞のコートタンパク質に似ている. 一方、Atg8-PE は隔離膜上に局在しており、曲率形成に直接的に関与する可能性がある. Atg12-Atg5/Atg16 が Atg8-PE の結合反応において E3 酵素様の働きをしていることは述べた. 隔離膜の外側に濃縮された Atg12-Atg5/Atg16 が外膜表面で Atg8-PE 結合反応を促進し、Atg8-PE の濃度を高めることで曲率に何らかの影響を与えている可能性もある. いずれも魅力的な説だが推測の域を出ておらず、今後の検証が待たれる.

隔離膜やオートファゴソームの曲率を論じる上で、忘れてはいけないのは、オートファゴソームが二重膜構造だということである. 一重膜構造である輸送小胞は、コートタンパク質が外側の膜の曲率を規定すれば十分である. しかし、細胞質を取り囲むように二重膜構造を形成するには、内膜を陥入させることが必要であろう. 内膜と内包される細胞質成分は、オートファジックボディーとして液胞内に放出される. オートファジックボディーの崩壊を阻害すると、オートファジックボディーから GFP-Atg8 由来の蛍光が観察される. そこでは、Atg8 のほとんどは PE と結合していないフリーの状態であることが知られている³³⁾. Atg8-PE とフリーの Atg8 の存在比は、Atg8 と PE の結合反応と Atg4 による脱 PE 化反応のバランスの上に成り立っている. 伸長中の隔離膜の内側の膜で脱 PE 化反応が促進され

ば、内側の膜にコーン型の脂質である PE が残され、負の曲率を生み出す可能性がある。したがって、Atg8-PE の脱 PE 化反応が伸長中の隔離膜の内側の膜で起こるのか、それともオートファゴソームの完成を待って起こるのかは重要な問題であるが、正確なことは分かっていない。

Atg1 もオートファジックボディーにかなりの量が存在する。Atg1 がタンパク質キナーゼであることを考えると、このことは意外に感じられる。僅かではあるが Atg2 もオートファジックボディーによって液胞に運ばれるようだ。これらが内膜の曲率形成に関わっているかどうかは今後の問題である。

3) 内膜・外膜の質的分化

隔離膜伸長の初期段階で、外膜と内膜は正と負の反対の曲率を持っており、この時点で既に内膜・外膜の分化が始まっている。隔離膜の伸長に伴い Atg12-Atg5/Atg16 複合体は主に外側に局在するようになる⁵⁾。Atg12-Atg5/Atg16 複合体が外側の曲率を感知して局在するようになるのか、逆に Atg12-Atg5/Atg16 複合体の局在により外側の曲率が決まるのかは分かっていない。両者に正のフィードバックが存在する可能性もあるが、詳細は分かっていない。

PtdIns(3)P に特異的に結合する FYVE ドメインを用いて PtdIns(3)P の動態を追跡したところ、オートファジックボディー膜に PtdIns(3)P が豊富に含まれることが分かった²⁵⁾。このことはオートファゴソーム内膜に PtdIns(3)P が大量に含まれていることを示している。興味深いことに、FYVE ドメインのシグナルは完成したオートファゴソーム外膜上にはあまり検出されなかった。外膜には相対的に PtdIns(3)P が少ないのか、それとも検出上の技術的な問題に起因するのかは、さらなる検証が必要である。まさに伸長中の隔離膜における PtdIns(3)P の分布も今後明らかにされる必要がある。

オートファジックボディーは液胞内に放出されると速やかに崩壊する。この過程にはリパーゼ様ドメインを持つ Atg15 が関わっているが⁴⁷⁾、Atg15 が実際にリパーゼ活性を持つかどうかは分かっていない。一方、外膜は液胞膜と融合するが、その部分が崩壊して液胞が破れることはない。内膜と外膜で脂質組成や加水分解酵素への感受性が異なっているかどうかは興味深い問題であり、オートファゴソームの精製が強く望まれる。

4) 脂質の供給源

オートファゴソーム膜の脂質がどこから供給されるのかについては諸説あるが、どれも決定的ではない。ER、ゴルジ体、エンドソームなど、様々なオルガネラが一度は候補に挙げられている。出芽酵母では分泌経路の初期に働く因子群がオートファジーに関わるという報告もあるが⁴⁸⁾、い

まだに脂質の供給源を突き止めるには至っていない。このように、供給源がはっきりしないのは、供給源となりうる膜構造物が複数あり、細胞の状態によってその比率が変わる、ということを反映している可能性もある。隔離膜やオートファゴソームを純粋に単離する試みは今のところ成功していない。近年、膜貫通タンパク質である Atg9 がミトコンドリアから脂質を供給している、という仮説が提唱されているが⁴⁹⁾、そもそも Atg9 がミトコンドリアに局在するという確かな証拠はない。

4. おわりに

オートファゴソーム形成には未知の部分が多く残されていることを感じて頂けたと思う。Atg タンパク質群が時空間的に巧みに連携し、脂質分子も一体となって新たな膜構造を作り出す過程を解明するには、*in vitro* 系を用いた素過程の解明、丹念な電子顕微鏡観察、ライブイメージング、隔離膜やオートファゴソームの精製、構造生物学的アプローチなど総合力が試される。本稿では触れなかったが、栄養状態のセンシング機構、選択的なオートファジー、新たな生理的機能の探索、創薬や疾病治療への応用、などの方面への展開も期待される。10年後にどのような絵が描かれているか楽しみな領域である。

文 献

- 1) Mizushima, N. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 1535-1541.
- 2) Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., & Ohsumi, Y. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 903-913.
- 3) de Duve, C. & Wattiaux, R. (1966) *Annu. Rev. Physiol.*, **28**, 435-492.
- 4) Dice, J.F. (2007) *Autophagy*, **3**, 295-299.
- 5) Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 657-667.
- 6) Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004) *Plant Cell*, **16**, 2967-2983.
- 7) Toyooka, K., Moriyasu, Y., Goto, Y., Takeuchi, M., Fukuda, H., & Matsuoka, K. (2006) *Autophagy*, **2**, 96-106.
- 8) Baba, M., Osumi, M., & Ohsumi, Y. (1995) *Cell Struct. Funct.*, **20**, 465-471.
- 9) Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992) *J Cell Biol.*, **119**, 301-311.
- 10) Tsukada, M. & Ohsumi, Y. (1993) *FEBS Lett.*, **333**, 169-174.
- 11) Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., & Wolf, D.H. (1994) *FEBS Lett.*, **349**, 275-280.
- 12) Harding, T.M., Morano, K.A., Scott, S.V., & Klionsky, D.J. (1995) *J Cell Biol.*, **131**, 591-602.
- 13) Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2002) *Cell Struct. Funct.*, **27**, 421-429.
- 14) Bassham, D.C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L.J., & Yoshimoto, K. (2006) *Autophagy*, **2**, 2-11.
- 15) Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., & Ohsumi, Y. (1997) *Gene*, **192**, 245-250.

- 16) Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000) *J. Cell Biol.*, **150**, 1507–1513.
- 17) Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M., & Ohsumi, Y. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 2544–2553.
- 18) Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007) *Genes Cells*, **12**, 209–218.
- 19) Kawamata, T., Kamada, Y., Suzuki, K., Kuboshima, N., Aki-matsu, H., Oota, S., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2005) *Bio-chem. Biophys. Res. Comm.*, **338**, 1884–1889.
- 20) Kabeya, Y., Kawamata, T., Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **356**, 405–410.
- 21) Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 519–530.
- 22) Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., & Emr, S.D. (1993) *Science*, **260**, 88–91.
- 23) Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 22284–22291.
- 24) Obara, K., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1527–1539.
- 25) Obara, K., Noda, T., Niimi, K., & Ohsumi, Y. (2008) *Genes Cells*, in press.
- 26) Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998) *Nature*, **395**, 395–398.
- 27) Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999) *EMBO J.*, **18**, 3888–3896.
- 28) Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 18619–18625.
- 29) Matsushita, M., Suzuki, N.N., Obara, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 6763–6772.
- 30) Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., & Ohsumi, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 37298–37302.
- 31) Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000) *J. Cell Biol.*, **151**, 263–276.
- 32) Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000) *Nature*, **408**, 488–492.
- 33) Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 435–446.
- 34) Noda, T., Kim, J., Huang, W.P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., & Klionsky, D.J. (2000) *J. Cell Biol.*, **148**, 465–480.
- 35) Dove, S.K., Piper, R.C., McEwen, R.K., Yu, J.W., King, M.C., Hughes, D.C., Thuring, J., Holmes, A.B., Cooke, F.T., Michell, R.H., Parker, P.J., & Lemmon, M.A. (2004) *EMBO J.*, **23**, 1922–1933.
- 36) Strømhaug, P.E., Reggiori, F., Guan, J., Wang, C.W., & Klionsky, D.J. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3553–3566.
- 37) Krick, R., Tolstrup, J., Appelles, A., Henke, S., & Thumm, M. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 4632–4638.
- 38) Reggiori, F., Tucker, K.A., Stromhaug, P.E., & Klionsky, D.J. (2004) *Dev. Cell*, **6**, 79–90.
- 39) Ishihara, T., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3690–3702.
- 40) Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kiri-sako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5720–5728.
- 41) Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. *EMBO J.*, **20**, 5971–5981.
- 42) Shintani, T. & Klionsky, D.J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 29889–29894.
- 43) Kim, J., Kamada, Y., Stromhaug, P.E., Guan, J., Hefner-Gravinnk, A., Bevan, A., Scott, S.V., Ohsumi, Y., Dunn, Jr., W.A., & Klionsky, D.J. (2001) *J. Cell. Biol.*, **153**, 381–396.
- 44) Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40584–40592.
- 45) Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007) *Cell*, **130**, 165–178.
- 46) McMahon, H.T. & Gallop, J.L. (2005) *Nature*, **438**, 590–596.
- 47) Epple, U.D., Suriapranata, I., Eskelinen, E.L., & Thumm, M. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5942–5955.
- 48) Hamasaki, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2003) *Cell Struct. Funct.*, **28**, 49–54.
- 49) Reggiori, F., Shintani, T., Nair, U., & Klionsky, D.J. (2005) *Autophagy*, **1**, 101–109.