〔生化学　第79巻　第8号，pp. 749–760，2007〕

総　説

オートファジーの病態生理学的研究

小　松　雅　明

オートファジーは，隔離膜が伸長しオルガネラを含む細胞質成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体（オートファゴソーム）がリソソーム（酵母の液胞）と融合し，その内容物をリソソーム内の消化酵素が分解する大規模分解経路である．この現象は‘自食作用’とも言われ，主に飢餓時に発動される生存戦略と考えられてきた．実際，酵母オートファジー不能株は窒素源飢餓に対して致死となることや，オートファジー不能マウスは出生に伴う新生児飢餓時に低アミノ酸状態を引き起こすこと等が知られている．しかしながら，栄養素が十分に供給されている状態においても，低いレベルであるがオートファゴソーム形成やオートファジー依存的な長寿命タンパク質の分解が観察されており，この恒常的なオートファジーの重要性に関する知見が集積している．最近，筆者らは脳もしくは肝特異的にオートファジーが不能となる遺伝子改変マウスを作製し，基底レベルのオートファジーの動態を解析して，オートファジーが非分裂細胞に果たす病態生理について検討したので紹介する．

1. はじめに

真核生物の細胞内には二つの大規模なタンパク質分解系が存在する．一つはユビキチン・プロテアソーム系であり，もう一つはオートファジー・リソソーム系である．ユビキチンは76個のアミノ酸からなる小さなタンパク質であり，長短2個のαヘリックス構造と5個のβシート構造がββαββαβの順に並んだ二次構造を持ち，ユニークな立体構造（ユビキチンフォールド）を有するタンパク質である．ユビキチンはE1（活性化酵素）・E2（結合酵素）・E3（リガーゼ）が触媒するカスケード反応により，C末端グリシンのカルボキシル基が標的タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合する[1]．さらにユビキチン分子間での縮合反応を繰り返すことによって，多数のユビキチン分子が鎖状に伸長したポリユビキチン鎖が形成される．この標的タンパク質へのポリユビキチン化は，主にプロテアソームによる分解の目印（正確には標的タンパク質をプロテアソームへtraffickingするためのシグナル）となる．すなわち，ユビキチン・プロテアソーム系は，ユビキチン化を介した選択的なタンパク質分解経路である．様々な生体反応を不可逆的に調節することができるユビキチン・プロテアソーム系の発見（1980年前後）は，生命科学におけるエポックメイキングな出来事の一つとして注目されており（2004年ノーベル化学賞授賞），現在その生物学的重要性や病態に関連した研究は，拡大の一途を辿っている．

一方，細胞内でもう一つの大規模なタンパク質分解系を構成するリソソーム（多数の消化酵素を含むオルガネラ：酵母の液胞）の発見は1955年と古く（1974年ノーベル医学生理学賞受賞），またオートファジーという現象も1950年代後半から1960年代前半にすでに形態学的に観察されていた．オートファジー（autophagy）の語源はギリシャ語のauto（self）とphagy（eating）に由来し，日本語では‘自食作用’と呼ばれている．オートファジーの研究は，長い間，形態学的研究の時代が続き逼塞状況にあったが，1990年代初頭に多数の*ATG*（autophagy related）遺伝子群が酵母の遺伝学研究から分離されて以来今日に至るまで，

順天堂大学医学部生化学第一講座（〒113–8421 東京都文京区本郷2–1–1），東京都臨床医学総合研究所先端研究センター，科学技術振興機構さきがけ
Study on pathophysiology of autophagy
Masaaki Komatsu（Department of Biochemistry, Juntendo University School of Medicine, 2–1–1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8421, Japan）
本総説は2006年度奨励賞を受賞した．

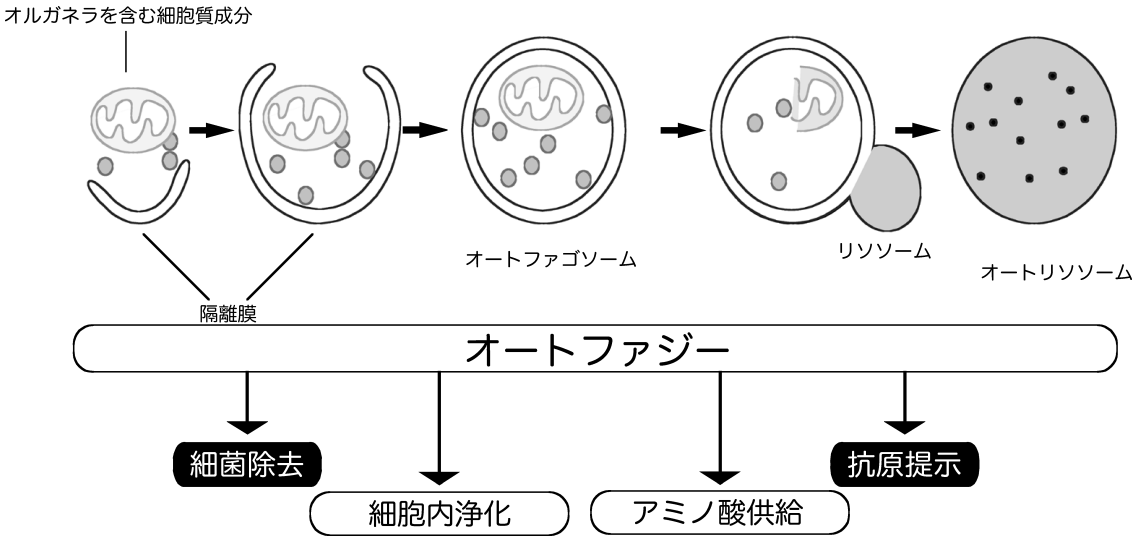

図1 オートファジー経路の模式図と主な生理機能
栄養飢餓やグルカゴンなどホルモンの刺激により，隔離膜と呼ばれる単膜構造体が伸長しオルガネラを含む細胞質成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体オートファゴソームが形成される．オートファゴソームは速やかにリソソーム・液胞と融合しオートリソソームとなり，その内容物はリソソーム・液胞内加水分解酵素によりアミノ酸にまで分解される．この分解経路の基本的な役割は，飢餓時におけるアミノ酸などの栄養素の供給であり，この機能は酵母からヒトの細胞に至るまで，普遍的に保存されている．他方，高等動物においては，細胞内に侵入した細菌除去などの自然免疫，抗原提示を介した獲得免疫の他，細胞内に生じた不必要タンパク質のクリアランス（細胞内浄化）等にも重要な役割を果たしている．

急速に進展してきた．その結果，驚いたことにオートファジーはその主な作動機構がユビキチンシステムと非常に類似していることが判明した．加えてその生理作用もユビキチン・プロテアソーム系と連携していることが示唆されており，現在，予想外の展開を見せ始めている．

さてオートファジー・リソソーム系による分解は，マクロオートファジー（後述），リソソームが陥没して細胞質タンパク質を分解するマイクロオートファジー，リソソーム膜タンパク質 LAMP2 と分子シャペロン Hsp70 の複合体を介して細胞質タンパク質を選択的にリソソームに取り込んでから分解するシャペロン介在性オートファジーに分類される[2]．それぞれの正確な分解量は不明であるが，タンパク質分解への貢献度が最も大きく，詳細に解析が進んでいるのはマクロオートファジー（以後必要がない限り，単にオートファジーと記す）である．マクロオートファジーは，マイクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーとは異なり，栄養飢餓やホルモン（trophic factor）などの刺激に応答して激しく誘導される．オートファジーは細胞外環境に応答して出現した隔離膜が伸長して細胞質成分をランダムに取り囲んだ脂質二重膜構造体（オートファゴソーム）が形成される過程と，生じたオートファゴソームにリソソームが融合して内容物を消化する過程から構成されている．このオートファジー・リソソーム系は，オートファゴソーム内にトラップされたタンパク質をアミノ酸にまで分解することができる基本的に非選択的な大規模分解系であり，新しい膜形成と連動している巧妙かつ複雑な細胞内分解機構である（**図1**）．

2. 多彩な *ATG* 遺伝子群

現在までに，オートファゴソーム形成に必須な *ATG* 遺伝子群が出芽酵母において約 20 種類同定されている[3]（**図2**）．特筆すべきことは，これらの約半数がユビキチンによる翻訳後修飾反応系と類似した二つのタンパク質結合反応系（Atg8 及び Atg12 系）を構成していることである．ユビキチン様分子 Atg12 は，E1 様活性化酵素 Atg7 により ATP 依存的に活性化され，E2 様結合酵素 Atg10 に転移されてから最終的に標的タンパク質 Atg5 にイソペプチド結合される[4〜6]．Atg12-5 結合体は Atg16 と複合体を形成して隔離膜に局在し，隔離膜の伸長に必須である[7,8]．Atg8 は，Atg12 反応系と共通の E1 様酵素 Atg7 により活性化され，E2 様酵素 Atg3 に転移され，ホスファチジルエタノールアミン（PE）にアミド結合されるユニークなユビキチン様分子である[9]．Atg12-5 結合体形成は，LC3（Atg8 高等動物ホモローグ）の効率の良い PE 化や LC3 のオートファゴソームへの局在に必須であり，二つの反応系は連携していると考えられる[10]．隔離膜の伸長とともに Atg12-5 結合体は膜から解離するが，Atg8 や LC3 はオートファゴソームに存在することからオートファゴソームマーカーとして使用されている[11,12]．

この二つの反応系の他に，PI3 キナーゼ複合体，Atg1 キ

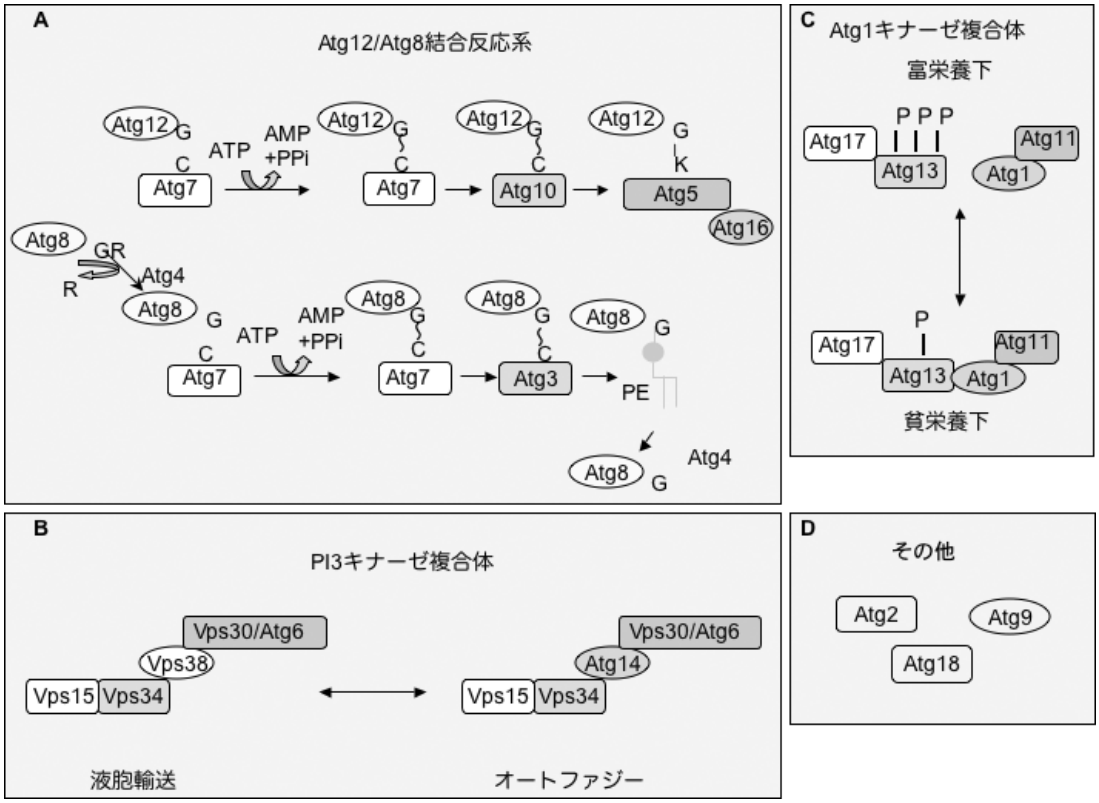

図2 オートファゴソーム形成に必須なAtgタンパク質群の類別と相互作用

A. Atg12，Atg8結合反応系．**B**. PI3キナーゼ複合体．富栄養下では，Vps38を介した複合体を形成し液胞輸送に働く．貧栄養下では，Atg14を介した複合体を形成しオートファジーに働く．**C**. Atg1キナーゼ複合体．富栄養下では，TOR依存的にAtg13が高度リン酸化されている．貧栄養下では，Atg13は脱リン酸化されAtg1と複合体を形成する．**D**. その他の複合体．

ナーゼ複合体，機能未知のAtg複合体などがオートファゴソーム形成に必須である．Vps15・34複合体（PI3キナーゼ）は，富栄養下においてVps38を介してVps30/Atg6と複合体を形成し液胞輸送に，貧栄養下ではAtg14を介してVps30と複合体を形成しオートファジーに働く[13]．富栄養下では，target of rapamycin（TOR）依存的に高度にリン酸化されたAtg13は，Atg1キナーゼ複合体から解離しているが，貧栄養下では，Atg13は脱リン酸化されAtg1と複合体を形成する[14]．Atg結合系やこれらの複合体が，どのように連携してオートファゴソーム膜形成を行うのかはまだ不明であるが，出芽酵母においてAtgタンパク質の多くは細胞内に1個から数個存在するpre autophagosomal structure（PAS）に集積することが明らかにされている[15]．PI3キナーゼ複合体はPASの形成に必須であり，オートファゴソーム形成の上流に位置すると考えられる．Atg1キナーゼの変異株（機能喪失）においても，Atg12-5，Atg8-PE結合体形成及びPAS形成は正常に進行することから，Atg1キナーゼ複合体はPASからのオートファゴソーム形成に働いていると考えられる．ほとんどの*ATG*遺伝子群は，真核生物に高度に保存されているが，複数のホモログが存在する場合もあり，これらは進化に適応して多様性を獲得してきたと考えられている．特に，Atg8の場合，ヒトでは数種類（LC3，GATE-16，GABARAP等）存在し，それらの多くがAtg7やAtg3などのAtgタンパク質結合システムを共有することは興味深い[16~18]．このことは，進化の過程でオートファジーが酵母における役割とは異なった多彩な機能を獲得していることを示唆する．また興味深いことに，ごく最近*ATG 16*の高等動物ホモログ*Atg16L*が，自己免疫疾患・クローン病に関連した遺伝子（有力なrisk factor）として同定された[19]．

3. 誘導的オートファジーの役割

オートファジーの最も重要な生理機能は，飢餓応答である．事実，出芽酵母のオートファジー不能変異株は，富栄養状態下では何ら表現型を示さないが，栄養源飢餓に抵抗性がなく致死となる[20]．また出芽酵母の胞子形成，細胞性粘菌のアメーバから子実体形成，線虫の耐性幼虫化，ハエの変態など飢餓が伴う現象に，オートファジーは必須である[21]．さらにLC3トランスジェニックマウスの解析から，オートファジーは胎生期には低いレベルであるが，出生に伴い一過的に上昇することが見いだされた．このことは，胎盤からの栄養供給が遮断される出生に伴う新生児飢餓時

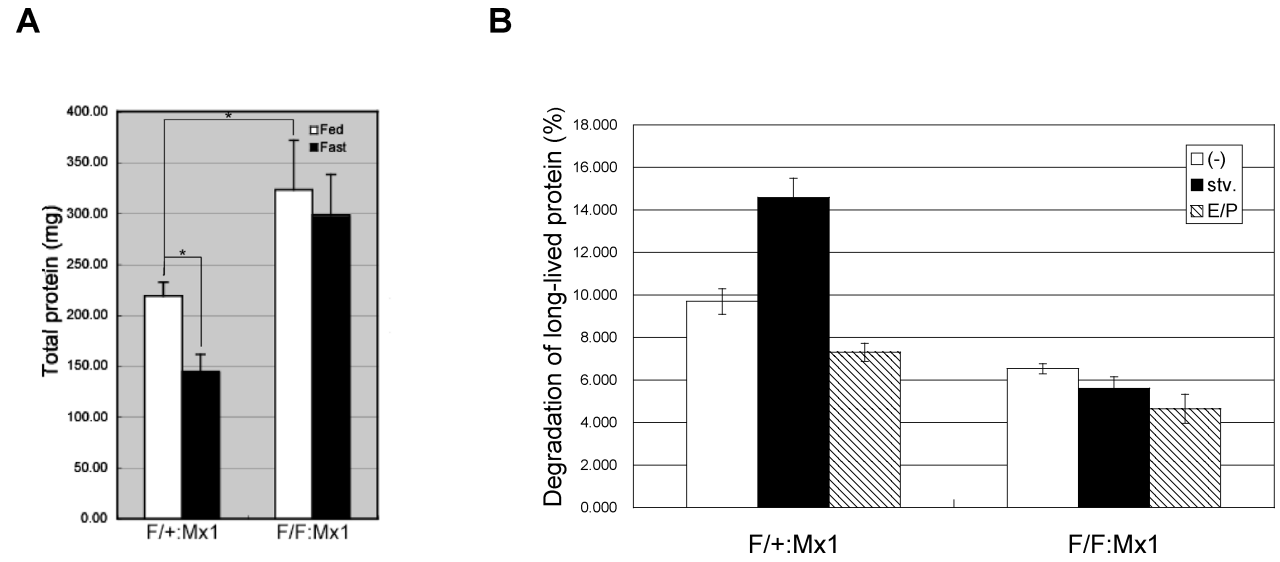

図3 飢餓時におけるオートファジー依存的タンパク質分解

A. コントロール（F/＋：Mx1）及び肝特異的オートファジー不能マウス（F/F：Mx1）の摂食下（Open bar：Fed）もしくは24時間絶食後（Closed bar：Fast）の総タンパク質量．**B**. F/＋：Mx1もしくはF/F：Mx1マウス肝細胞の長寿命タンパク質の分解．(—)；富栄養下（ウイリアムスE培地＋10% 血清），stv.；4時間貧栄養下（培養液から血清及びアミノ酸を除去），E/P；リソソーム酵素阻害剤であるE64d・Pepstatin-Aの存在下で測定．

に，オートファジーによる自己分解を介したアミノ酸供給が新生児のエネルギー恒常性に重要であることを示唆している．実際，*Atg 5* ノックアウトマウスは，哺乳させない条件下では，野生型マウスと比較して早期に死亡し，血漿，組織中のアミノ酸濃度も有意に低いことが報告された[22]．つまり，出生に伴う新生児飢餓時におけるオートファジーの亢進（主としてアミノ酸供給）が新生児のエネルギーの維持に重要であることを示唆している．

筆者らは，マウス個体におけるオートファジーの生理機能を調べるため，オートファジーに必須な二つのAtg結合システムの共通の活性化酵素 *Atg 7* 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス（$Atg7^{F/F}$）を作製した[23]．*Atg 7* の単純ノックアウトマウスは *Atg 5* ノックアウトマウスと同様に，出生後に低アミノ酸症状を呈して生後1日以内に死亡するので，成獣体におけるオートファジー研究は不可能である．興味深いことにオートファジー必須遺伝子 *ATG 6/VPS 30* の高等動物ホモログ *Beclin 1* のノックアウトマウスは胎生7.5日で致死であり[24,25]，*Atg 5* や *Atg 7* ノックアウトマウスと表現型が異なる．これは，Beclin1が，オートファジーの他にエンドサイトーシスなどの役割を担うためと考えられる[26]．そこで $Atg7^{F/F}$ マウスと，インターフェロンγもしくはその誘導体であるpolyinosinic acid-polycytidylic acid（pIpC）処理により肝臓においてCreリコンビナーゼを発現させることのできるMx1 Creトランスジェニックマウスとを交配させて，$Atg7^{F/F}$：Mx1マウスを作製した．この $Atg7^{F/F}$：Mx1マウスは，pIpC投与により肝臓特異的にAtg7を欠損させることができる．実際pIpCの腹腔内注入依存的に肝臓においてAtg7タンパク質の消失が確認され，Atg12-Atg5結合体やLC3（酵母のAtg8ホモログ）の脂質結合体（LC3-II）も検出されなかった．さらにLC3（オートファゴソームマーカー）の免疫染色及び電子顕微鏡観察によりオートファゴソーム形成の不全も確認された．これらの結果は，高等動物においてもAtg7がオートファゴソーム形成に必須であることを示している．

飢餓状態の肝臓では，グルコースからグルコース6-リン酸ができる反応が低下(解糖の抑制)する一方，グリコーゲンの分解によるグルコース6-リン酸の供給及びグルコース-6-ホスファターゼによるグルコース合成が亢進する．飢餓状態が続けば，筋肉タンパク質が分解され，生じたアラニンなどのアミノ酸の代謝物からオキサロ酢酸やピルビン酸がつくられ，グルコースが合成される(糖新生)．糖新生の最終段階の酵素（グルコース-6-ホスファターゼ）は主に肝臓にしか発現していないので，グルコースは肝臓でつくられ血流に放出され，脳や他の組織に運ばれる．この筋肉と肝臓の間におけるアミノ酸と糖のやり取りは，グルコース-アラニン回路と呼ばれる．このように肝臓は脳に恒常的にグルコースを供給する重要な臓器である．このため飢餓時には肝臓自身も自己タンパク質を積極的に分解しエネルギー生産に寄与しようとする．実際，野生型マウスを24時間絶食させると肝タンパク質量は30〜40% 程度減少する．一方，肝特異的 *Atg 7* 欠損マウスは，絶食に伴う肝タンパク質量の減少が観察されず（**図3A**），野生型マウスに比べ早期に死亡する（筆者ら未発表データ）．この

ことは，絶食時において糖新生などの肝機能を維持するためにオートファジーが重要な役割を担っていることを示唆している．また，飢餓時にはミトコンドリアなどのオルガネラの減少もタンパク質量の減少に比例して観察されることから，飢餓時にはオートファゴソームは非選択的に細胞質成分を取り囲むと考えられる．

4. オートファジーと神経変性疾患

オートファジーは，上記の飢餓応答以外に多様な生理作用に関係していること（図1）が明らかになっているが，近年，ハンチントン舞踏病，パーキンソン病，アルツハイマー病などの神経変性疾患との関係が特に注目されている．これらの神経変性疾患では，特定のタンパク質からなる不溶性の凝集体（病理学的には封入体と呼ばれている）が蓄積することが共通の特徴となっている．例えば，ハンチントン舞踏病のポリグルタミン（polyQ），アルツハイマー病のβアミロイド，パーキンソン病のα-シヌクレインなどである．凝集体形成の過程は，変異タンパク質の折りたたみ（フォールディング）異常，可溶性オリゴマー形成，そして可溶性オリゴマーの不溶化・蓄積の三段階よりなると考えられる．また酸化ストレスなどの外的要因がこれらのプロセスを加速することも示唆されている．さて凝集体形成が病態発症の鍵となる現象であることが示唆されてきたが，最近の報告によると，封入体の形成は神経細胞に対して保護的役割を担っており，凝集体形成前の可溶性オリゴマーに細胞毒性があるとの考え方が支配的になってきつつある[27,28]．ここでは，オートファジーによる病態発症原因遺伝子産物，即ち凝集易様性の変異タンパク質の分解に関わる知見を紹介する．

ハンチントン舞踏病は，ハンチントン遺伝子のエキソン1にCAGコドンの反復よりコードされるpolyQの増長によって引き起こされる常染色体性優性遺伝疾患である．polyQの長さ37分子を境にして，これより長いpolyQを持つ変異ハンチントンは，不溶化・凝集体化しやすく分解されにくくなる．実際，変異体ハンチントンを持つハンチントンモデルマウスは，神経細胞の核や細胞質に凝集体を形成する[29]．従ってハンチントン舞踏病の発症には，変異ハンチントンのクリアランス（浄化）機構に破綻をきたしていると考えられる．オートファジーによるpolyQの除去機構に関して，Rubinsztein のグループが詳細に検討している．彼らは，培養細胞に過剰発現させた変異ハンチントンの分解が，オートファジーの阻害剤3-メチルアデニンで阻害されること，逆にオートファジーを誘導するmTORキナーゼの阻害剤ラパマイシンによって促進することを見いだした[30]．そしてラパマイシン処理は，変異polyQの細胞毒性による細胞死を軽減させた．しかしラパマイシン処理は不溶化したpolyQの分解に効果は無く，オートファジーによる分解は可溶性polyQ及びpolyQオリゴマーの分解に限られる可能性が示唆されている．さらに，彼らはpolyQ凝集体がmTORの巻き込み及び不活化を引き起こしてオートファジーを誘導することを，モデル動物を用いて報告した[31]．このことは，病態発症因子であるpolyQ自身が，オートファジーを誘導し生体防御に働くという興味深い仮説である．一方，インスリン及びインスリン様成長ホルモンのシグナルカスケードに関与するIRS-2が，polyQによりmTOR非依存的に活性化され，次いでクラスIII PI3キナーゼが活性化されると，オートファジーが誘導されpolyQを除去することが報告された[32]．神経変性疾患の神経細胞内にはオートファゴソーム様構造体が多数確認される[33〜36]が，これらの異常な構造体の観察が，オートファジー系の亢進か逆にその破綻を反映しているのか否かについては，さらなる解析が必要と思われる．

家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物の一つであるα-シヌクレインは，点突然変異でアミノ酸置換された3家系が知られている．α-シヌクレインはシナプス前終末に局在する機能未知のタンパク質であり，ほとんど全てのパーキンソン病患者のドーパミンニューロン内に観察される封入体（Levy body）の主要構成成分である．変異polyQと同じように，変異シヌクレインは凝集体を形成しやすい[37,38]．これは，変異によるαヘリックス構造のβシート構造への変化が，不溶化・凝集体形成に影響したものと考えられている．変異polyQはプロテアソームで分解されにくいことが報告されている[39]が，変異シヌクレイン（A53T及びA30P）はプロテアソームおよびオートファジーの両分解系で排除されることが示されている[40]．しかし不溶化したαシヌクレインはオートファジーによって分解されにくいようである[41]．

一方，アルツハイマー病とオートファジーの関係については，患者脳の神経細胞内やアルツハイマー病モデルマウス神経細胞にオートファゴソーム様構造体が多数観察されているものの明確ではない[34,42,43]．アルツハイマー病の病理学的特徴は細胞表層における老人班の形成であるが，その主成分であるβアミロイド（アミロイド前駆体タンパク質APPがプロセシングされて生じたアミノ酸39–42個からなるペプチド）がオートファジー経路で生成されるとの報告がある[44]．しかし，アルツハイマー病のもう一つの特徴である神経原線維変化（リン酸化されたtauタンパク質が細胞質で凝集したもの）とオートファジーの関係については，ほとんど分かっていない．

神経変性疾患は，特定の神経細胞が障害され神経変性を誘導することは明確であるが，その発症メカニズムは明確でない．しかし，この神経細胞死に関連して，オートファジーによるオルガネラと異常タンパク質の分解除去（不良品の浄化機構）が密接に関係していることが示唆されてい

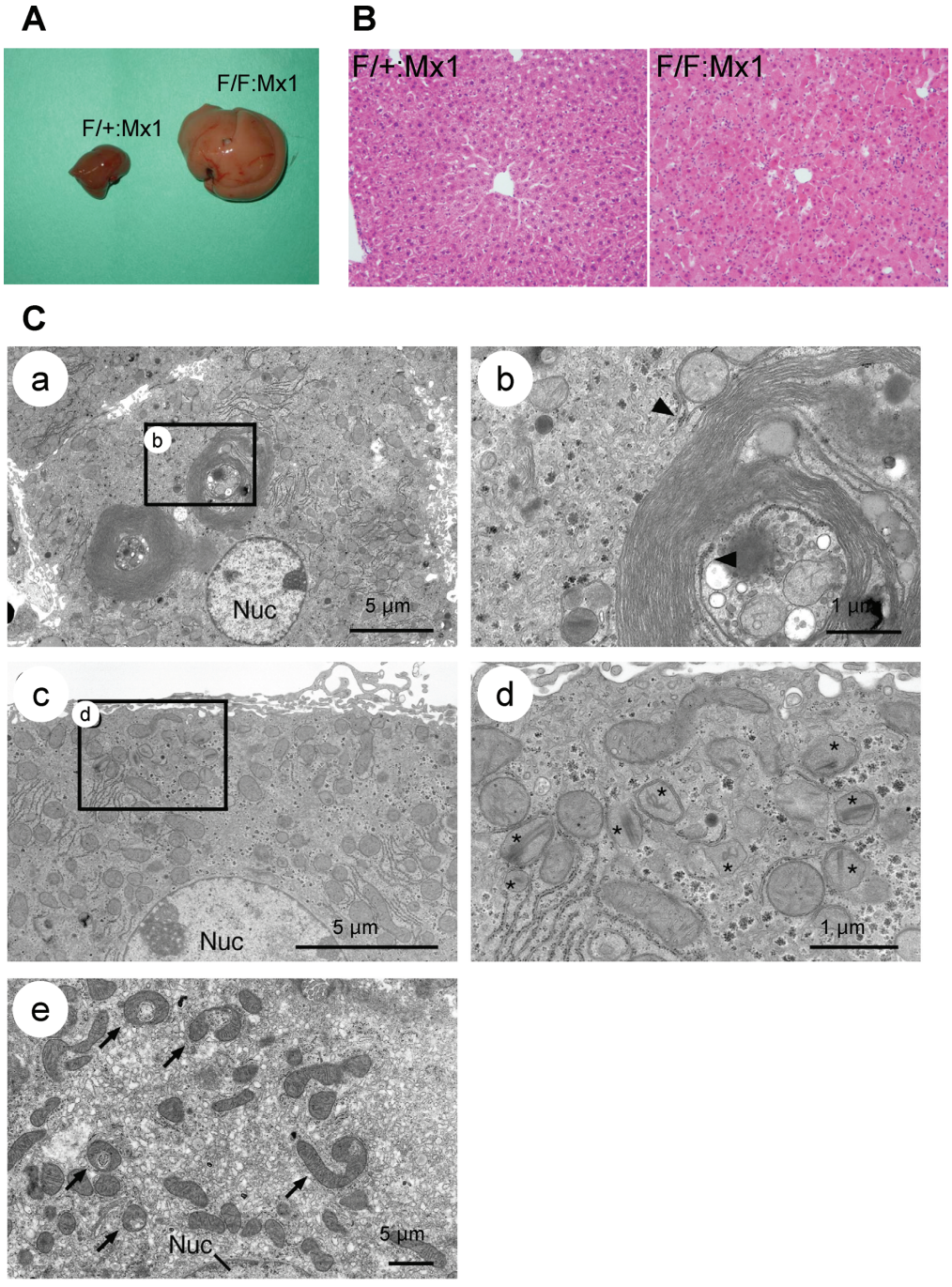

図 4　オートファジー不能肝の形態学的観察

A. オートファジー不能肝（F/F：Mx1）は肝肥大を起こす（pIpC 注入後 90 日のマウス肝臓）．**B**. コントロール（F/＋：Mx1）及びオートファジー不能肝（F/F：Mx1）切片の，ヘマトキシリン-エオシン染色像．オートファジー不能肝では，肝細胞の膨潤や空砲変性が確認される．**C**. オートファジー不能肝細胞内に小胞体が渦を巻いた concentric membranous structures（a 及び b），ペルオキシソーム（c 及び d　アスタリスク）や変形したミトコンドリア（e　矢印）の蓄積が観察される．

図 6　神経特異的オートファジー不能マウス（F/F：Nes）の病態

A. コントロールマウス（F/＋：Nes）と比較して，F/F：Nes の海馬錐体神経細胞層（左パネル矢印）の萎縮や小脳プルキンエ細胞（右パネル矢印）の脱落が確認される．**B**. 抗ユビキチン抗体によるウエスタンブロット．F/F：Nes 脳においてユビキチン化タンパク質の蓄積が確認される．**C**. F/F：Nes 脳の抗ユビキチン抗体による免疫染色像．オートファジーが欠損すると，様々な部位においてユビキチン陽性封入体が検出される．

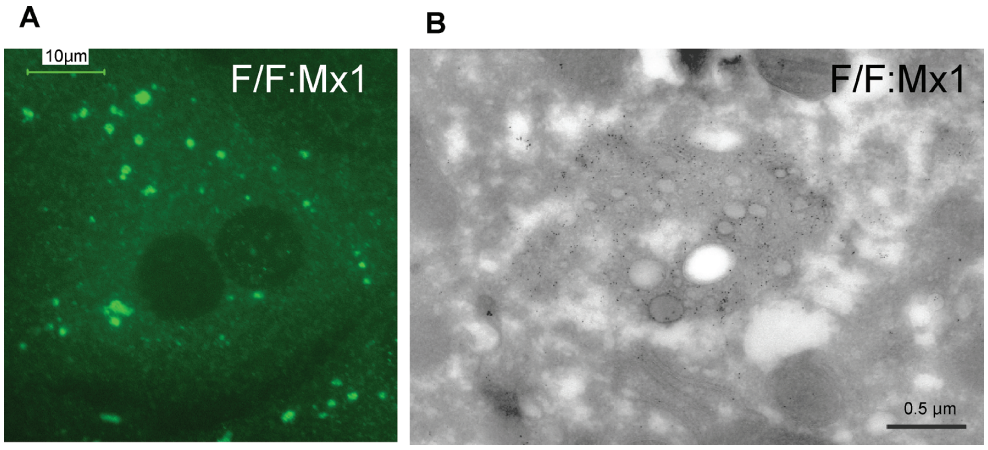

図5　オートファジー不能肝細胞におけるユビキチン陽性封入体の形成
A. オートファジー不能肝細胞の抗ユビキチン抗体による免疫蛍光染色像．様々な大きさのユビキチン陽性封入体が観察される．**B**. オートファジー不能肝細胞の抗ユビキチン抗体による免疫電子顕微鏡像．オートファジー不能肝細胞内に観察されるユビキチン封入体は，脂肪滴や膜構造体を含む．

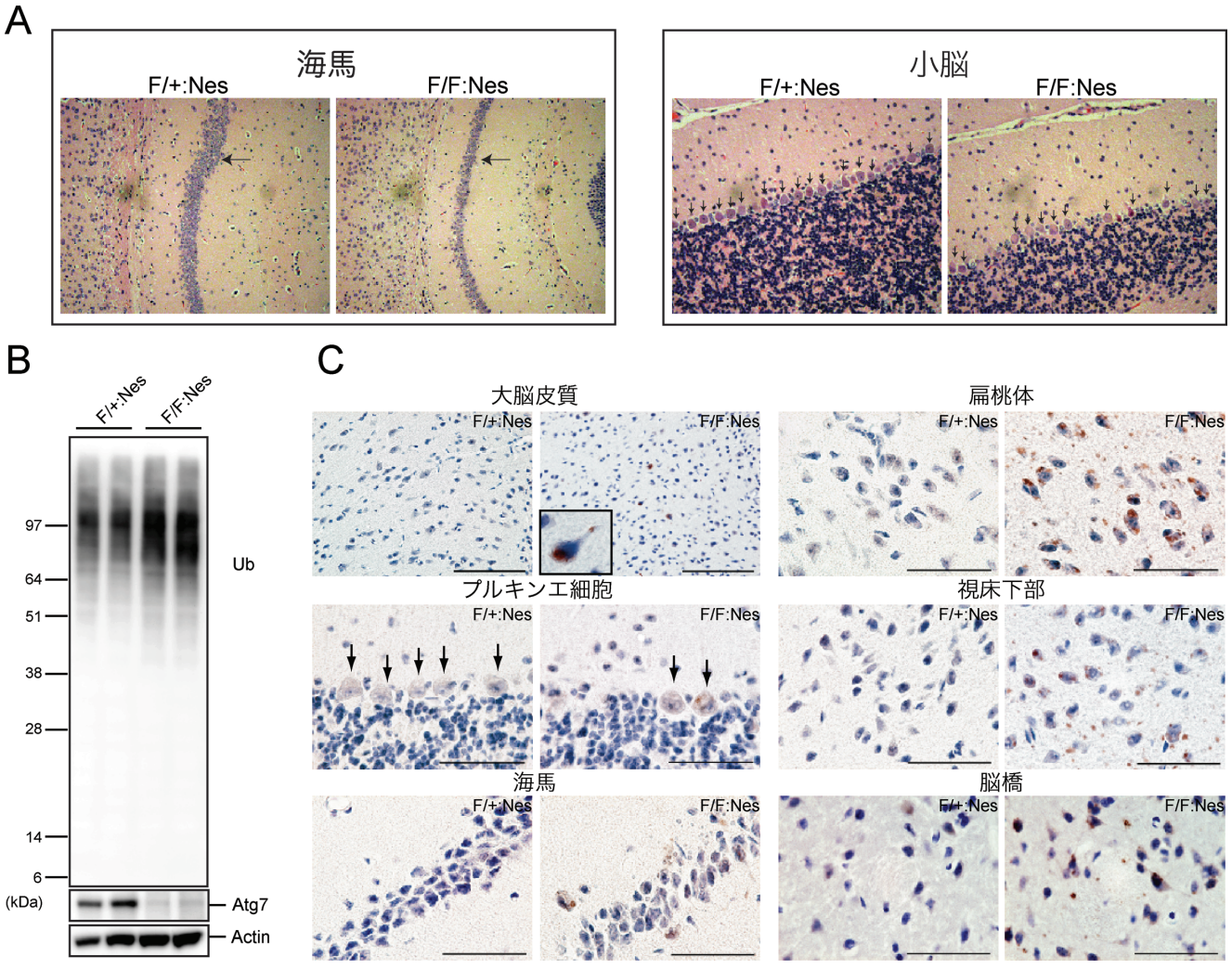

図6

る．しかしこれまでは間接的な証拠しか報告されておらず，その詳細は不明であった．我々は，オートファジーを条件的に不能にすることができる遺伝子改変マウスを作製し，この問題に挑んできた．その結果，オルガネラや異常タンパク質の分解に恒常的オートファジーが重要な役割を果たしていること，そしてオートファジーの欠陥が肝障害や神経変性疾患に関係することを初めて突き止めた．

5. 恒常的オートファジーの役割―オルガネラ分解

高等動物においては，飢餓状態のみならず栄養が豊富な状態においてもオートファジーは基底レベルすなわち低いレベルで恒常的に起こっていると考えられる．実際，肝細胞などでは富栄養下（栄養素が十分に供給されている状態）でもオートファゴソームの形成や（リソソームが大きく寄与している）長寿命タンパク質の分解も確認されている．一方，*Atg7* を欠損した肝細胞では，貧栄養下（栄養素が供給されない飢餓状態）のみならず富栄養下においても長寿命タンパク質の分解が有意に阻害される（図3B）．そこで，肝特異的 *Atg7* 欠損マウスを用いて摂食時におけるオートファジーの役割の解析を行った．長期的にオートファジーを欠損させた肝臓は，肝細胞の膨張を伴った進行性の肝肥大を起こし（**図**4A，B），一部に空砲を伴った細胞死が確認された．その肝細胞内には，小胞体膜が渦をまいた concentric membranous structures，変形したミトコンドリア，ペルオキシソームの蓄積が観察され，オートファジーが選択的にオルガネラを分解している様子が明確に観察された（図4C）．実際，野生型および肝特異的 *Atg7* 欠損マウスに，di（2-ethylhexyl）phthalate（DEHP）を投与して肝細胞内にペルオキシソームを誘導すると，野生型マウスにおいては DEHP 投与の中止に伴いペルオキシソームの急速かつ選択的な分解が確認されたのに対し，肝特異的 *Atg7* 欠損マウスではその分解がほとんど確認されなかった[23]．また，肝特異的 *Atg7* 欠損マウスの肝臓では野生型マウスで頻繁に観察される典型的なグリコーゲン野が見られず，小胞体間に発達したグリコーゲン顆粒が観察された．このことは，肝臓におけるグリコーゲンの合成と分解にオートファジーが積極的に関与することを意味しているが，その詳細は不明である．

一方，細胞分化の過程に見られるオルガネラ消失とオートファジーの関連が，*Atg5* ノックアウトマウスを用い解析された[45]．カメラのレンズの役割をしている目の水晶体内部は繊維細胞からできており，この細胞にはオルガネラが存在しない．水晶体の前面部は上皮細胞により覆われており，この上皮細胞が水晶体の赤道面で，繊維細胞へ分化し始め，その過程で全オルガネラを失う．このオルガネラ消失は水晶体の透明性獲得のために必要であり，この分解にはオートファジーが関与している可能性が指摘されてきた．さらに最近，繊維細胞における核の分解に，リソソームに存在すると考えられる DNase II-like acid DNase（DLAD）が必須であることが示された[46]．このことは，水晶体繊維細胞の核の分解がオートファジー-リソソーム系によって遂行されることを示唆している．しかし胎生17.5日の水晶体上皮細胞においてオートファゴソーム形成の誘導は認められたものの，予想に反して *Atg5* ノックアウトマウスにおいても水晶体繊維細胞の核・オルガネラ分解は正常に進行していた．また，赤血球は網状赤血球からの分化に伴い脱核とともにミトコンドリアなどの細胞内オルガネラが細胞内消失することが知られているが，やはり *Atg5* ノックアウトマウスの赤血球においてもオルガネラ分解は正常であった．これらのことは，オートファジーに依存しないオルガネラ分解系が存在することを示唆している．

6. 恒常的オートファジーの役割―タンパク質分解

一般的にユビキチン化されたタンパク質は，プロテアソーム（真核生物の ATP 依存性プロテアーゼ複合体）により速やかに分解される．この分解系の破綻は，パーキンソン病やハンチントン舞踏病などに代表される神経変性疾患やがんの発症原因となると考えられている[47]．一方，リソソームとの融合障害によるオートファゴソームの過度の蓄積が神経変性疾患・ミオパチーにおいて確認されること[42~44,48,49]や，上述のように神経変性疾患の原因遺伝子産物がオートファジーによって分解されることが報告され[31,40,50]，オートファジーの異常とユビキチン陽性封入体を伴う病態発症の関連が強く示唆されてきた．そこで，オートファジー不能肝の切片を用い，ユビキチン抗体による免疫染色を行った結果，驚いたことに，*Atg7* 欠損肝において多数のユビキチン抗体陽性の封入体が観察された（**図**5A）．この封入体は細胞質に存在し，脂肪滴や膜構造体を含んでいた（図5B）．この現象は，*Atg7* を数日欠損させた肝細胞において既に確認されることから，オートファジー不全による二次的な影響とは考え難い．

他方，栄養素が他の臓器から供給されるために飢餓になり得ない特異的な臓器である脳におけるオートファジーの生理機能を明らかにする目的で，我々は条件付き *Atg7* 欠損マウス（$Atg7^{F/F}$）と，神経前駆体細胞に発現している Nestin 遺伝子のプロモーターに Cre リコンビナーゼを連結させて作出した Nestin-Cre トランスジェニックマウスとを交配させ，脳特異的オートファジー不能マウス $Atg7^{F/F}$：Nes マウスを作製した[51]．$Atg7^{F/F}$：Nes マウスはメンデルの法則に従って出生したが，生後2週目より成長遅延が起こり，28週目までに全て死亡した．また，2週齢以降に反射異常や振戦，4週齢において自発運動量低下や協調運動障害などの神経変性疾患様症状を呈した．さらに形態学的解析により，大脳皮質の萎縮，大脳皮質および海馬の錐体

神経や小脳プルキンエ細胞の脱落（**図** 6A），大脳皮質や小脳顆粒層においては有意な細胞死が確認された．さらにプルキンエ細胞特異的オートファジー不能マウスにおいてもプルキンエ細胞の激しい脱落が確認されること（Komatsu M., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press）から，少なくともオートファジーの欠損したプルキンエ細胞は，細胞自律的に細胞死が起きていると考えられる．

次に神経特異的オートファジー欠損マウス脳における，ユビキチン陽性封入体の形成を検討した．その結果，脳の部位により差があるものの，調べた全ての神経細胞においてユビキチン陽性封入体が検出された（図 6B および C）．この封入体の数や大きさは，加齢に伴い増強された．特筆すべきことに，オートファジー不能脳において，プロテアソームの機能は質的・量的に変動しなかった（プロテアソームの阻害が代償的にオートファジーを誘導することと対照的である）．これらほぼ全ての表現型は，原らにより作製された神経特異的 *Atg 5* ノックアウトマウスでも確認された[52]．これらの結果は，オートファジーは単に飢餓時の栄養源確保という生存戦略だけでなく定常状態においてもタンパク質の分解を担うことで細胞の恒常性を保っていること，さらに神経変性疾患に関連した変異遺伝子産物（ハンチントン舞踏病のハンチンチン，パーキンソン病のα-シヌクレイン，筋萎縮性側索硬化症 ALS の SOD など）の発現がなくてもオートファジーの減弱のみで神経変性を引き起こすことを示している．また，アストログリア細胞には封入体はほとんど確認されず，細胞種によりオートファジーの役割の違いが示唆された．実際，活発に増殖しているマウス繊維芽細胞ではオートファジーの欠損による異常はほとんど観察されないことから，恒常的オートファジーは神経細胞や肝細胞などの非分裂細胞においてより重要であると考えられる．

7.　選択的オートファジー

神経細胞内のユビキチン陽性封入体形成は，パーキンソン病やハンチントン舞踏病などに代表される神経変性疾患の特徴である．一方，オートファジー不能肝細胞や神経細

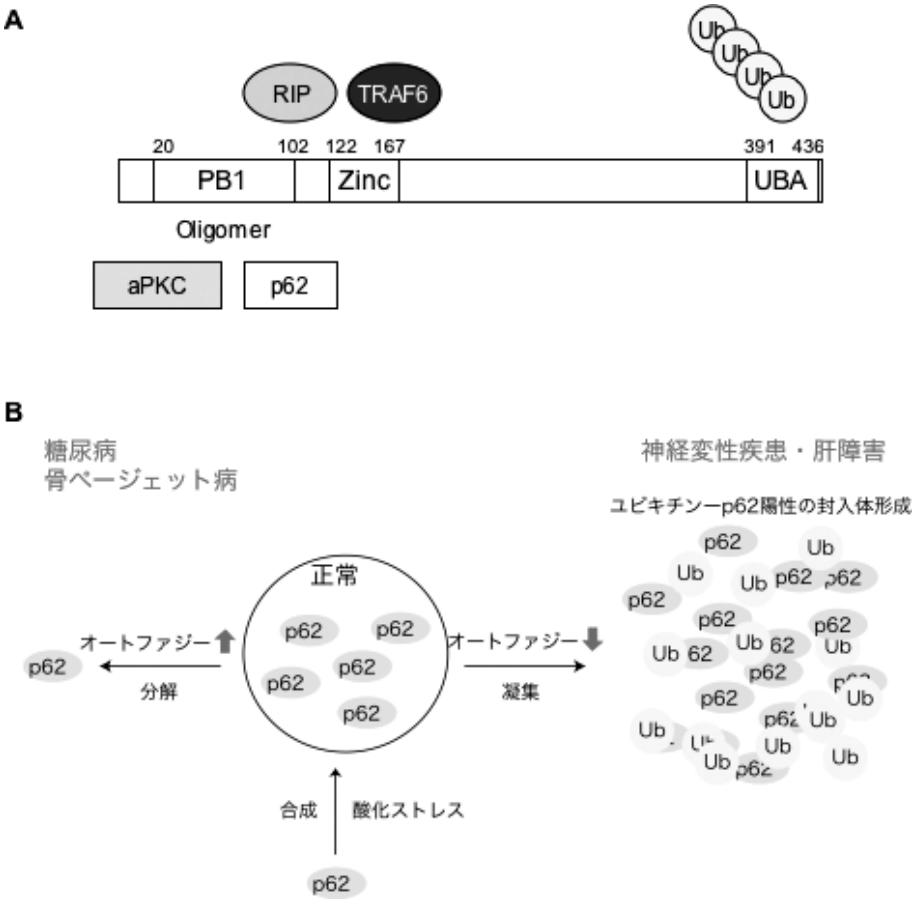

図 7　p62 タンパク質の模式図

A. p62 は，PB1，ジンクフィンガードメイン，UBA ドメインなど多数のドメインを介し，aPKC，RIP1，TRAF6，ユビキチン鎖と相互作用する．**B**. オートファジーによる p62 の代謝および p62 の発現調整は，ユビキチン陽性封入体形成を制御しうる．また，肥満，破骨，肝機能維持とも関連する可能性がある．

胞における封入体形成は，オートファジーによる非選択的な分解の阻害がミスフォールド・アンフォールドした異常タンパク質の蓄積を起こし，その結果としてユビキチン陽性の封入体が形成される可能性を強く示唆している．しかしながら，その分子メカニズムは全く不明である．筆者らは超高感度プロテオミクス法により，オートファジーにより選択的に分解される分子 p62/A170/Sqstm1 を同定した．同様の結果が，ごく最近報告された[53]．p62 は，Phox and Bem1p（PB1）ドメイン，ジンクフィンガードメイン，ubiquitin-associated domain（UBA）を介してユビキチン鎖を含む多様な分子群と相互作用する[54]（**図 7A**）．興味深いことに，このタンパク質はアルコール性肝炎やパーキンソン病，筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の細胞内において検出される封入体の主要構成分子である[55,56]．p62 は PB1 ドメインを介してオリゴマーを形成する性質を有し，その結果，細胞内で量が増加すれば不溶性の凝集を引き起こすタンパク質である．実際，オートファジー不能肝細胞や神経細胞において，p62 は異常蓄積し p62-ユビキチン陽性の封入体を形成した．我々は遺伝学的解析から，p62 の封入体形成に関する役割を検討し，p62 がユビキチン化したタンパク質を選択的にオートファジー経路に輸送させる可能性，さらにオートファジーが欠損すると形成されるユビキチン化タンパク質凝集体の中心的な分子である可能性を示唆した（小松ら，投稿中）．

一方，p62 は，TNFα や IL-1/RANK-L シグナル伝達を RIP1 や TRAF6 などと相互作用することで調節すると考えられる[57]．実際，p62 ノックアウトマスは，RANK-L 刺激による破骨に異常を示し[58]，ERK シグナル異常による過剰脂肪分化により遅発性の肥満・糖尿病を引き起こす[59]．これらの多様な表現型は，p62 が自身の異なったドメインを介して多くのタンパク質と相互作用することができることを反映していると思われる．このように p62 は多機能タンパク質として多面的な生理機能を担うことができると思われるが，その詳細な分子機構は依然として不明であり，今後のさらなる検証が必要である．

8. おわりに

本総説では，タンパク質分解の視点から誘導的オートファジーによる自己分解を介した生存戦略，基底レベルのオートファジーによるタンパク質品質管理に焦点をあてて述べてきた．しかしながら，基礎生物学研究所の大隅良典教授らによる *ATG* 遺伝子の同定以降，分子生物学的手法や遺伝学的手法によりオートファジーは侵入細菌除去，ウイルス増殖，抗原提示，細胞分化，細胞死と生物の根幹を担う現象に関わることが相次いで報告されている．今後の研究の発展が期待される．

本研究は今から約 7 年前に順天堂大学医学部生化学第一講座の木南英紀教授からオートファジーのマウス遺伝学を勧められ開始した．当時，我々はマウス遺伝学のツールを持っていなかったため，東京都臨床医学総合研究所・分子腫瘍学研究部門（現・先端研究センター）の田中啓二部長（現・東京都臨床医学総合研究所・所長代行）の研究室に出入りさせて頂き，千葉智樹研究員（現・筑波大学大学院生命環境科学研究科教授）や村田茂穂研究員にご教授いただいてマウスを作製した．開始当時は，単純ノックアウト（KO）マウスにするか，コンディショナル KO にするか，を議論したようなことを覚えているが，結果的にコンディショナル KO にしたことが幸運であった（現在は，単純 KO も作製しているが…）．もし，先に単純 KO を作製していたならば，変性タンパク質の蓄積に気づかなかったかもしれない．オートファジー研究には，モニター系（LC3 抗体を用いたウエスタンブロットや GFP-LC3 によるオートファゴソーム形成の判定）が確立しつつあるとは言え，電子顕微鏡による形態学的解析に頼るところが少なくない．また，脳病態の解析も素人では容易に判別できない．これら形態学的解析にご協力頂いた大阪大学医学部機能形態学講座の和栗聡助教授（現・福島県立医科大学医学部解剖組織学講座教授）及び内山安男教授に，この場を借りて感謝いたします．また，上野隆先生，江崎淳二先生，谷田以誠先生，岩田淳一先生，辰巳加奈子さん，曽友深君，河野亜華さんをはじめ苦労をともにした共同研究者に感謝致します．最後に，若輩ものの私に，研究方針や考え方を根気強くご指導頂いた田中啓二先生，木南英紀先生に深甚の謝意を表します．

文　献

1）Hershko, A. & Ciechanover, A.（1998）*Annu. Rev. Biochem*., **67**, 425–479.
2）Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T.（2002）*Cell Struct. Funct*., **27**, 421–429.
3）Ohsumi, Y.（2001）*Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., **2**, 211–216.
4）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.
5）Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., & Ohsumi, Y.（1999）*Embo J*., **18**, 5234–5241.
6）Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., & Kominami, E.（1999）*Mol. Biol. Cell*, **10**, 1367–1379.
7）Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y.（1999）*Embo J*., **18**, 3888–3896.
8）Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., & Ohsumi, Y.（2002）*J. Biol. Chem*., **277**, 18619–18625.
9）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.

10) Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001) *J. Cell Biol*., **152**, 657–668.
11) Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000) *Embo J*., **19**, 5720–5728.
12) Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 1101–1111.
13) Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001) *J. Cell Biol*., **152**, 519–530.
14) Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000) *J. Cell Biol*., **150**, 1507–1513.
15) Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001) *Embo J*., **20**, 5971–5981.
16) Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., & Kominami, E. (2001) *J. Biol. Chem*., **276**, 1701–1706.
17) Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T., & Kominami, E. (2002) *J. Biol. Chem*., **277**, 13739–13744.
18) Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004) *J. Cell Sci*., **117**, 2805–2812.
19) Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., Gunther, S., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Hasler, R., Sipos, B., Folsch, U.R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C.G., Krawczak, M., & Schreiber, S. (2007) *Nat. Genet*., **39**, 207–211.
20) Tsukada, M. & Ohsumi, Y. (1993) *FEBS Lett*., **333**, 169–174.
21) Levine, B. & Klionsky, D.J. (2004) *Dev. Cell*, **6**, 463–477.
22) Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., & Mizushima, N. (2004) *Nature*, **432**, 1032–1036.
23) Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., & Chiba, T. (2005) *J. Cell Biol*., **169**, 425–434.
24) Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., & Levine, B. (2003) *J. Clin. Invest*., **112**, 1809–1820.
25) Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., & Heintz, N. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15077–15082.
26) Takacs-Vellai, K., Vellai, T., Puoti, A., Passannante, M., Wicky, C., Streit, A., Kovacs, A.L., & Muller, F. (2005) *Curr. Biol*., **15**, 1513–1517.
27) Sanchez, I., Mahlke, C., & Yuan, J. (2003) *Nature*, **421**, 373–379.
28) Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., & Finkbeiner, S. (2004) *Nature*, **431**, 805–810.
29) Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., & Bates, G.P. (1997) *Cell*, **90**, 537–548.
30) Ravikumar, B., Duden, R., & Rubinsztein, D.C. (2002) *Hum. Mol. Genet*., **11**, 1107–1117.
31) Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C. J., & Rubinsztein, D.C. (2004) *Nat. Genet*., **36**, 585–595.
32) Yamamoto, A., Cremona, M.L., & Rothman, J.E. (2006) *J. Cell Biol*., **172**, 719–731.
33) Okamoto, K., Hirai, S., Iizuka, T., Yanagisawa, T., & Watanabe, M. (1991) *Acta Neuropathol. (Berl)*, **82**, 340–345.
34) Cataldo, A.M., Hamilton, D.J., Barnett, J.L., Paskevich, P.A., & Nixon, R.A. (1996) *J. Neurosci*., **16**, 186–199.
35) Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E. C., & Agid, Y. (1997) *Histol. Histopathol*., **12**, 25–31.
36) Kegel, K.B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J.G., Aronin, N., & DiFiglia, M. (2000) *J. Neurosci*., **20**, 7268–7278.
37) Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., & Nussbaum, R.L. (1997) *Science*, **276**, 2045–2047.
38) Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., & Riess, O. (1998) *Nat. Genet*., **18**, 106–108.
39) Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., & Goldberg, A.L. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 95–104.
40) Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., & Rubinsztein, D.C. (2003) *J. Biol. Chem*., **278**, 25009–25013.
41) Sarkar, S., Floto, R.A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L.J., & Rubinsztein, D.C. (2005) *J. Cell Biol*., **170**, 1101–1111.
42) Wilson, C.A., Murphy, D.D., Giasson, B.I., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., & Lee, V.M. (2004) *J. Cell Biol*., **165**, 335–346.
43) Esselens, C., Oorschot, V., Baert, V., Raemaekers, T., Spittaels, K., Serneels, L., Zheng, H., Saftig, P., De Strooper, B., Klumperman, J., & Annaert, W. (2004) *J. Cell Biol*., **166**, 1041–1054.
44) Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., Jiang, Y., Duff, K., Uchiyama, Y., Naslund, J., Mathews, P.M., Cataldo, A.M., & Nixon, R.A. (2005) *J. Cell Biol*., **171**, 87–98.
45) Matsui, M., Yamamoto, A., Kuma, A., Ohsumi, Y., & Mizushima, N. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **339**, 485–489.
46) Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y., & Nagata, S. (2003) *Nature*, **424**, 1071–1074.
47) Ciechanover, A. & Brundin, P. (2003) *Neuron*, **40**, 427–446.
48) Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K., & Saftig, P. (2000) *Nature*, **406**, 902–906.
49) Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J.E., Oh, S.J., Koga, Y., Sue, C.M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., DiMauro, S., & Hirano, M. (2000) *Nature*, **406**, 906–910.
50) Fortun, J., Dunn, W.A., Jr., Joy, S., Li, J., & Notterpek, L. (2003) *J. Neurosci*., **23**, 10672–10680.
51) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., & Tanaka, K. (2006) *Nature*, **441**, 880–884.
52) Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006) *Nature*, **441**, 885–889.
53) Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., & Johansen, T. (2005) *J. Cell Biol*., **171**, 603–614.

54) Wooten, M.W., Hu, X., Babu, J.R., Seibenhener, M.L., Geetha, T., Paine, M.G., & Wooten, M.C.（2006）*J. Biomed. Biotechnol*., **2006**, 62079.
55) Kuusisto, E., Salminen, A., & Alafuzoff, I.（2001）*Neuroreport*, **12**, 2085–2090.
56) Nakano, T., Nakaso, K., Nakashima, K., & Ohama, E.（2004）*Acta Neuropathol.*（*Berl*）, **107**, 359–364.
57) Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Albert, A., & Campuzano, S.（2006）*Mol. Cell*, **23**, 631–640.
58) Duran, A., Serrano, M., Leitges, M., Flores, J.M., Picard, S., Brown, J.P., Moscat, J., & Diaz-Meco, M.T.（2004）*Dev. Cell*, **6**, 303–309.
59) Rodriguez, A., Duran, A., Selloum, M., Champy, M.F., Diez-Guerra, F.J., Flores, J.M., Serrano, M., Auwerx, J., Diaz-Meco, M.T., & Moscat, J.（2006）*Cell Metab*., **3**, 211–222.