

オートファジーにおける膜新成のメカニズム —ユビキチン様タンパク質 Atg8 が統御するユニークな膜動態—

1. はじめに

細胞は、栄養の不足を感知すると、飢餓応答の一つとして、オートファジー（自食作用）を発動する。オートファジーとは、酵母から高等動物まで真核生物に共通して存在する、リソソームあるいは液胞を分解の場とした、自己の構成成分の大規模な分解系である¹⁾。オートファジーは、栄養飢餓時には、必須成分の合成やエネルギーの生産に必要な材料を分解産物として供給するリサイクルシステムとして機能する。また、哺乳類では、オートファジーは平常時にも基底レベルで起きており、様々な変性疾患の原因となりうる異常タンパク質の蓄積を防いでいる。さらに、オートファジーは、その大規模な分解系としての特性を生かし、オルガネラの量的制御や質的管理にも重要な役割を果たす。発生や分化、老化、細胞死、抗原提示、細菌やウイルスの感染等、実に多彩な生命現象にオートファジーが関与するとの報告も相次いでいる。

一方で、オートファジーの分子機構、中でも特にオートファゴソームの形成機構については、未解決の問題が多く残されている。オートファジーのメカニズムの解明には、出芽酵母を用いた研究が先導的な役割を果たしてきた。本稿では、まずその現状を概観し、続いて、Atg8というユニークなユビキチン様タンパク質の機能について、最近得られた知見²⁾を紹介したい。

2. オートファジーにおける膜動態

オートファジーは、オートファゴソームと呼ばれる被分解物の隔離に特化した特殊なオルガネラの新規構築を伴う(図1)^{3,4)}。オートファジーが誘導されると、細胞質に膜小胞を押し潰したような形の膜構造が現れ、これが伸張し、隔離膜と呼ばれる膜嚢となる。隔離膜は、細胞質の一部やオルガネラをも取り込みつつ伸張し、二重の膜で囲まれた直径500nm~1 μ mの球状構造であるオートファゴソームが形成される。オートファゴソームの外膜はリソソーム/液胞の膜と融合し、内包物は内膜ごとリソソーム/液胞内部の消化酵素の作用で分解される。

電子顕微鏡像において、オートファゴソームの膜は、顕

著に薄く、タンパク質粒子に乏しいという、他のオルガネラ膜とは異なる特徴を示している^{3,4)}。また、動物細胞においては、Atg5（次項参照）とGFPとの融合タンパク質をマーカーとし、まさに、“どこからともなく”現われた隔離膜が連続的に伸張し、オートファゴソームとなる様が、蛍光顕微鏡下でリアルタイムに捉えられている⁵⁾。これら観察結果は、オートファゴソームの膜が、既存のオルガネラ膜の単純な変形や変換ではなく、オートファジーの誘導に応じて新規に構築されるものであることを示唆している。しかしながら、「膜の材料となる脂質分子が、細胞内の何処からどのようにして集められ、隔離膜を形作り、伸張させるのか」といった、オートファゴソーム形成のサブステップともいえる膜動態の骨子は今も謎に包まれている。細胞内膜輸送系、特に小胞体からの輸送小胞の形成が、オートファゴソームの形成に重要であるとの興味深い報告があるが^{6,7)}、その機序を含めた的確な理解にはさらなる解析が必要である。

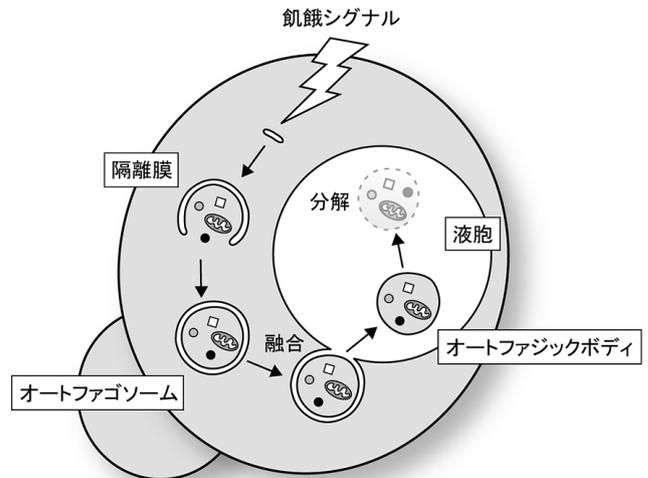


図1 出芽酵母におけるオートファジーの進行過程

オートファジーが誘導されると、細胞質に隔離膜が現れ、細胞質の一部やオルガネラを取り込みつつ伸張し、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームの外膜は液胞の膜と融合し、内包物が内膜ごと分解される。液胞が大きく発達した酵母や植物の細胞では、液胞内酵素を不活化することで、液胞内に蓄積したオートファゴソームの内膜構造（オートファジックボディ）を容易に観察することができる。オートファジックボディの蓄積量(数)や大きさは、細胞質でのオートファゴソームの形成効率や大きさを反映するため、その観察はこれら情報を簡便に得る方法として有用である。

3. オートファゴソームの形成に必須の因子： Atg タンパク質群

オートファゴソームの形成は、ATG (autophagy-related genes) と名付けられた特異な遺伝子群を必要とする。出芽酵母においては、これまでに18個のATG遺伝子が同定され、その大部分のホモログが高等動植物にも存在することが確認されている。遺伝子産物であるAtgタンパク質は、五つの機能単位(1) Atg1タンパク質キナーゼとその制御因子、2) Atg14を特異的サブユニットとして含むホスファチジルイノシトール3-キナーゼ複合体、3) ユビキチン様タンパク質 Atg12タンパク質修飾反応系、4) ユビキチン様タンパク質 Atg8脂質修飾反応系、5) 膜タンパク質 Atg9とその細胞内動態に関わる Atg18/Atg2複合体)からなることが明らかとなってきた⁸⁾。各々がオートファゴソームの形成過程で果たす役割について、さらに解析が進められている。一方、GFPとの融合タンパク質の網羅的な細胞内局在解析から、Atgタンパク質が構成する機能単位は、互いに緊密に連携しつつ、液胞膜近傍の輝点として認識されるオートファゴソーム形成の“場”を巡り、離合集散、実に動的にオートファゴソームの形成を支えている様子が浮かび上がってきている⁹⁾。

オートファゴソーム形成の分子装置が、ユビキチン様の

結合反応系を二つも含むことは、大変興味深い¹⁰⁻¹²⁾。Atg12は、Atg7とAtg10(それぞれ、ユビキチン化反応におけるE1、E2酵素に相当する)による逐次反応を経て、C末端グリシンのカルボキシル基を介してAtg5のリジン残基とイソペプチド結合を形成する。これに対し、Atg8は、Atg7(Atg12と共通のE1酵素)とAtg3(E2酵素)の働きで、驚くべきことに、リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン(PE)の親水性頭部のアミノ基と結合し、膜にアンカーされる(図2A)。これら二つのユビキチン様タンパク質は、おそらくそれぞれの結合体として、隔離膜に局在する。動物細胞では、LC3(Atg8ホモログ)は比較的一様に隔離膜に局在するのに対し、Atg5は湾曲した隔離膜の外側に偏って局在するという差異も報告されている^{13,5)}。両結合体共に、オートファゴソームが完成すると、その膜から遊離する(Atg8/LC3は一部取り残される)。Atg8-PE/LC3-PE結合体のオートファゴソームからの遊離には、Atg4という脱結合酵素が関与する¹²⁾。さらに、Atg12-Atg5結合体には、Atg8とPEとの結合反応を促進する作用があることも明らかとなりつつある。隔離膜伸張の実働部隊と考えられる、これら二つのユビキチン様タンパク質結合体の機能に注目が集まっている。

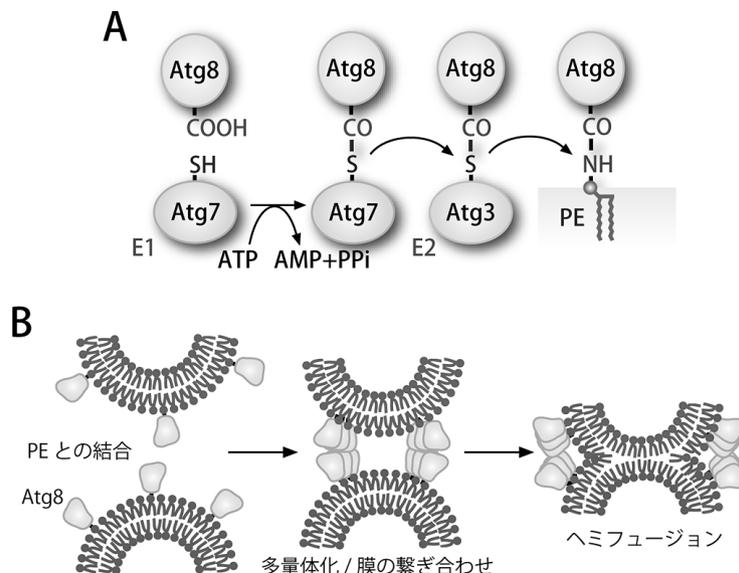


図2 Atg8-PEによる膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンの模式図

A: Atg8は、ユビキチン様の結合反応を介して、PEと結合する。
B: Atg8は、PEと結合すると、多量体を形成し、自身がアンカーされた膜を繋ぎ合わせ、ヘミフュージョンという特殊な融合状態に導く。

4. ユビキチン様タンパク質 Atg8 の機能について

筆者が所属する大隅良典教授のグループでは、*in vitro*での実験系を構築し、二つのユビキチン様タンパク質結合体の機能解明に取り組んでいる。以下では、Atg8とPEとの結合体の機能について、最近得られた成果を紹介する。まず、一村らは、Atg8とPEとの結合反応を*in vitro*で再構成することに成功した¹⁴⁾。すなわち、Atg8、Atg7、Atg3のリコンビナントタンパク質を、PEを含むリポソームと混合し、ATP存在下で保温すると、Atg8がリポソーム上のPEと効率良く結合体を形成する。これに伴い、リポソームが速やかに凝集体を形成することが明らかとなった²⁾。すなわち、Atg8-PEには、自身がアンカーされた膜同士を繋ぎ合わせる機能があることが明らかとなった(図2B)。さらに、Atg8-PEには、繋ぎ合わせたリポソームをヘミフュージョンと呼ばれる特殊な融合状態に導く機能があることも明らかとなった(図2B)²⁾。ヘミフュージョンとは、2枚の膜を構成する脂質二重層のうち、外側の一層(外葉)同士のみが融合することをさす。ヘミフュージョンは、SNAREタンパク質やインフルエンザのHAタンパク質等が媒介する膜融合においては、完全な融合へ移行する前の中間状態とされている¹⁵⁾。興味深いことに、SNARE及びHAは、どちらも膜貫通領域を介して膜にアンカーされているが、その膜貫通領域を約半分欠失させたり、完全に欠失させて、代わりに脂質で膜にアンカーされるように改変すると、融合反応がヘミフュージョンの状態では停止する。膜の内葉を融合させるには、タンパク質の膜貫通領域が内葉にまで及ぶ必要があると解釈されるが、Atg8はPEを介して膜の外葉にアンカーされていることを考慮すると、Atg8-PEが引き起こす膜融合がヘミフュージョンであるという結果は合理的に思える。著者らは、Atg8がPEと結合するとホモ多量体を形成することを見だし、この多量体化が膜の繋ぎ合わせに重要であることを示唆する結果も得ている²⁾。膜の繋ぎ合わせは、別々の膜にアンカーされたAtg8-PE間の相互作用で説明されるが、その際の多量体のアレンジメントや、Atg8-PEによるヘミフュージョンのメカニズムについては、さらなる解析が必要である。

続いて、著者らは、PEとの結合体は形成するが、リポソームの凝集及びヘミフュージョンの活性が顕著に低下したAtg8の変異体を、オートファジー欠損変異として複数分離することに成功した²⁾。膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンは、細胞内でのオートファゴソーム形成におけるAtg8の機能を有意に反映した現象であることが示唆され

た。さらに、Atg8変異株におけるオートファゴソームの形成を、オートファジックボディ(図1)の蓄積を指標に評価した。膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンに重要なAtg8のアミノ酸残基二つを置換した変異株では、ATG8欠失株同様、液胞内にオートファジックボディの蓄積はほとんど見られなかった。Atg8による膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンは、オートファゴソームの形成に必須の機能であると考えられる。一方、膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンの機能が部分的に低下したAtg8変異株では、野生株に比べ、顕著に小さなオートファジックボディが蓄積することが明らかとなった。Atg8による膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンは、オートファゴソームの大きさが決定される段階、すなわち、隔離膜の伸張段階で必要とされる機能であることが示唆された。

Atg8による膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンは、どのようにして隔離膜の伸張に関与するのだろうか? この重要な問いに答えるには、まだ多くの情報が不足している。たとえば、*in vitro*ではリポソームを用いているが、細胞内では、Atg8は何処でPEと結合し、どのような脂質構造(特定のオルガネラ膜、膜小胞、脂肪滴、あるいはミセルのような構造体も考慮し、このように表現した)上に存在するのかを明らかにする必要がある(隔離膜以外にも、Atg8-PEを含む脂質構造が存在することは、免疫電子顕微鏡解析や変異解析から示唆されている)。また、ヘミフュージョンでは、そもそも膜の伸張に直結し得ないという問題もある。たとえば、隔離膜の伸張メカニズムとして、隔離膜への膜小胞の融合がしばしば想定されるが、Atg8がそのような反応に関わるならば、他のタンパク質あるいは膜を構成する脂質分子の助けを借りて、ヘミフュージョンが完全な膜融合に移行する必要がある。まったく未知のメカニズムを介して、ヘミフュージョンが隔離膜の伸張に関与する可能性も残されている。いずれにせよ、Atg8-PEだけで膜新成のメカニズムが成立するとは考え難い。他の分子や膜動態系、とりわけ、当然のことながら、他のAtgタンパク質の機能や動態と併せて理解を深めていくことが必要であろう。

5. おわりに

膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンという機能がAtg8に備わっているという発見は、大きな驚きであった。これまで、ユビキチンや他のユビキチン様タンパク質は、結合の標的となるタンパク質の安定性や機能、局在等を制御する、あくまで修飾分子と見なされてきた。これに対し、

Atg8は、自身が明確な機能を持っており、タンパク質と脂質という違いはあれど、標的分子によってその機能が制御される。Atg8に関する研究は、ユビキチン様タンパク質の機能の多様性に、概念的にも新たなケースを提示したと言えよう。このユニークなユビキチン様タンパク質が統御する膜動態に注目し、さらに解析を進めることで、オートファゴソーム形成を支える特異な膜動態の解明に突破口が開けるものと期待している。

- Mizushima, N. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 1535–1541.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007) *Cell*, **130**, 165–178.
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., & Ohsumi, Y. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 903–913.
- Baba, M., Osumi, M., & Ohsumi, Y. (1995) *Cell Struct. Funct.*, **20**, 465–471.
- 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.
- Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3690–3702.
- Hamasaki, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2003) *Cell Struct. Funct.*, **28**, 49–54.
- Suzuki, K. & Ohsumi, Y. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 2156–2161.
- Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007) *Genes Cells*, **12**, 209–218.
- 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.
- 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.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000) *J. Cell Biol.*, **151**, 263–276.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5720–5728.
- Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40584–40592.
- Chernomordik, L.V. & Kozlov, M.M. (2005) *Cell*, **123**, 375–382.

中戸川 仁

(自然科学研究機構 基礎生物学研究所
分子細胞生物学研究部門)

科学技術振興事業団 さきがけ「代謝と機能制御」領域

Mechanisms of membrane biogenesis in autophagy
Hitoshi Nakatogawa (Division of Molecular Cell Biology,
National Institute for Basic Biology, 38 Nishigonaka Myo-
daijicho, Okazaki, Aichi 444-8585, Japan)

ヒストンシャペロン CIA によるヌクレオソームの構造変換とヌクレオソームの半保存的複製モデル

1. はじめに

ヌクレオソームとは、約 200 塩基対の DNA とヒストンタンパク質からなる複合体で、真核生物の DNA の基本構造である。ヌクレオソームの中心部 (nucleosome core particle) は 4 種類のヒストン H2A, H2B, H3, H4 が 2 分子ずつ集まってできるヒストン八量体に 146 塩基対の DNA が約 1.7 回巻き付いた構造をとっており、これが約 50 塩基対のリンカー DNA を介して繰り返りつながっている。ヌクレオソームが密に凝集して転写がほとんど不活性化された状態、ヌクレオソームの凝集が緩み DNA が露出しやすくなって転写が活性化された状態は、それぞれ顕微鏡観察によって見出されたヘテロクロマチン、ユークロマチンにほぼ対応している。DNA がヒストンに巻き付いたままだと、その領域の DNA を介した転写、DNA 複製、DNA 修復などの核内反応は阻害される。これらの反応を進行させるには、ヌクレオソームを破壊し、DNA を露出させる機構が必須である。したがって、真核生物には、ヌクレオソーム構造の形成と破壊を調節することで核内反応を制御する仕組みがあると考えられる。

ヌクレオソームの構造変換は、ATP 依存的クロマチンリモデリング複合体やヒストンシャペロンなどの作用によって引き起こされる。ATP 依存的クロマチンリモデリング複合体は、ATPase サブユニット、ヒストン認識サブユニットなどを含む複合体で、SWI/SNF, ISWI, RSC, CHD, SWR と呼ばれる様々な複合体が知られている。これらの複合体には、ATP 依存的にヒストンと DNA との相互作用を変化させ、ヌクレオソームから DNA を部分的に引きはがして核内因子の結合 DNA 領域を露出させる働きや、ヌクレオソーム間の間隔を変化させる働きがある。一方ヒストンシャペロンは ATP 非依存的にヌクレオソームの形成および破壊を促進する因子群である。この中にはヒストンの保管や輸送に関わるものも知られている。これまでに約 10 種類に及ぶヒストンシャペロンが同定されており、ヌクレオプラスミン, NAP1, FACT はヒストン H2A-H2B 複合体に、ヌクレオフォスミン, TAF-I, CAF-1, HIRA, CIA, FKBP, N1/N2 はヒストン H3-H4 複合体に