

哺乳類オートファジー ～マーカータンパク質の発見から膜の起源論争まで～

吉 森 保

真核生物に普遍的な細胞機能オートファジーは、細胞内物流システム・メンブレントラフィックの一種である。一過性に形成される膜構造オートファゴソームが細胞質中の分子や構造物を囲い込み、消化オルガネラであるリソソームに輸送する。分解・リサイクルあるいは囲い込みという作用により、オートファジーは驚くほど多彩な生理的役割を担う。哺乳類オートファジーの研究分野は、酵母オートファジー遺伝子の同定が起爆剤となり、2000 年のオートファゴソーム結合タンパク質発見を皮切りに急成長を遂げた。最近では、最大の謎であるオートファゴソームの起源について、異なる二つの説が提唱されホットな争点となっている。本稿では、筆者らの成果を中心に、哺乳類オートファジー研究の劇的な 10 年を振り返る。

1. はじめに

以前に比べると、オートファジーの認知度は格段に増した。オートファジーなどという妙ちきりんなもののことは初めて聞くという人のため、筆者は「飢えて自分の足を喰う蛸」のイラストを自ら描き (図 1 左端)、講演でオートファジーの喩えとして使ってきたが、この蛸スライドも歴史的使命を終えたのかもしれない。

とはいえ、まだ完全な市民権を得たとは言い難いこの細胞機能の概略をまず述べよう。オートファジー autophagy は、自己を意味するギリシャ語の auto と食べる意の phagy を組み合わせた語で、自食作用、自己貪食などと訳される。本稿で扱うオートファジーは厳密にはマクロオートファジーと呼ばれるものだが、通常オートファジーと言え

る。オートファジーは、膜動態を介した物質輸送システムであるメンブレントラフィックの一種で、まず、細胞質に断面が柿の種のような扁平な小胞が現れ、それが湾曲しながら成長し (隔離膜と呼ぶ)、最後に先端が融合し閉じた二重の膜構造オートファゴソームが形成される (図 1)。その際内部に細胞質の可溶成分のみならず、ミトコンドリアなどのオルガネラをも囲い込む。オートファゴソームの直径は、後で述べる細菌を捕捉するような場合を除き、種を問わず 0.5-1.0 μm で、約 5-10 分で完成する。完成したオートファゴソームはリソソームと融合し、取り込んだ細胞質由来の内容物が内膜と一緒にリソソームの加水分解酵素群により消化される。その後、そこからリソソームの再生¹⁾が起こりオートファゴソームは消滅する。オートファゴソームは、一過性に現れ消える点が他のオルガネラと大きく異なる。オートファジーの概要については、他の総説もあわせて参考にされたい²⁻⁶⁾。

2. 多機能細胞内分解系オートファジー

細胞は飢餓に陥ると、自己の一部をオートファジーによって分解し栄養源にすることで飢餓状態を乗り越えようとする。蛸の喩えは、この機能に由来する。一方で、少しずつであるが定常的にもオートファジーは起こっており、こちらは細胞成分の入れ替え・代謝回転を担っている。ま

大阪大学大学院医学系研究科遺伝学教室/同生命機能研究科細胞内膜動態研究室 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2)

Autophagy: From discovery of the marker to debate on membrane biogenesis

Tamotsu Yoshimori (Department of Genetics, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

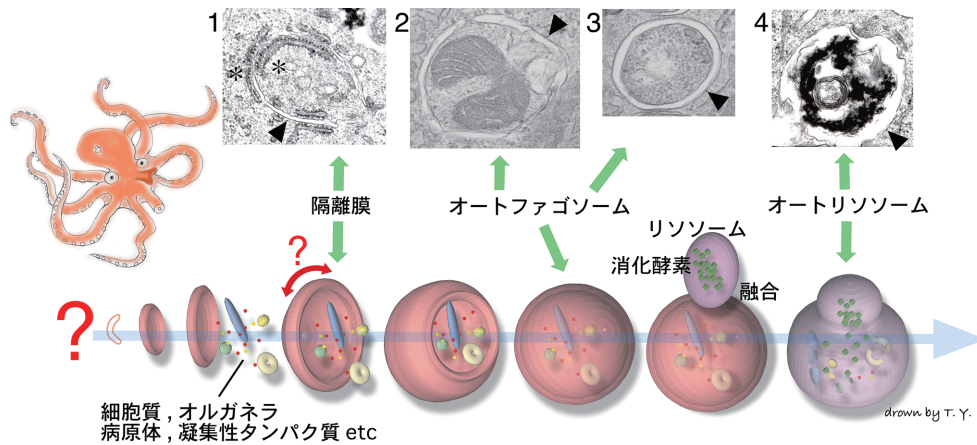


図1 オートファジーの膜動態

隔離膜(1)及びオートファゴソーム(2, 3)は二重膜(矢頭)で内部にインタクトな細胞質を持つ。2ではミトコンドリアも捕獲されている。隔離膜にはしばしばリボソームを持った粗面小胞体(*)が隣接する(本文「小胞体起源説」の項参照)。オートリソソーム(4)では内膜が消化され膜が二重(矢頭)で内部の細胞質は分解により黒い残骸となっている。1, 4と2, 3は試料作成・撮影条件の異なる写真から取っていることに注意。左端は自食する蛸(口の位置は生物学的には正しくない)。電子顕微鏡写真提供: 山本章嗣教授(長浜バイオ大学), 大森弘子技術員(大阪大学)

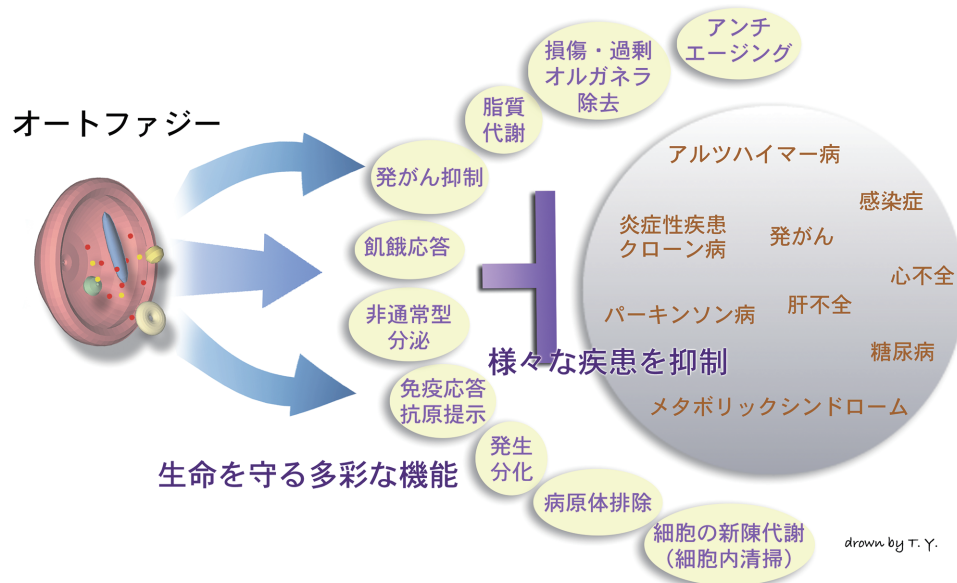


図2 オートファジーの機能

今後さらに増える可能性がある。

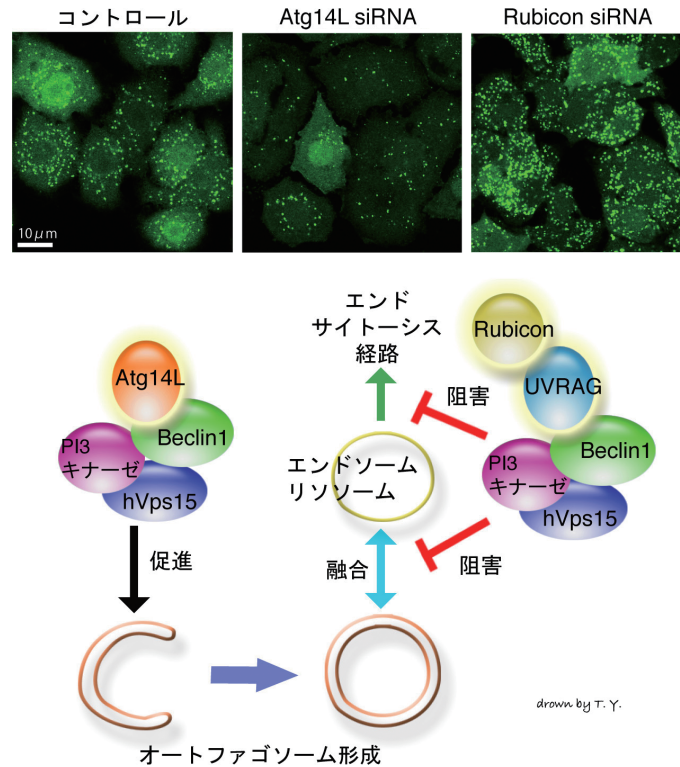


図3 Atg14L と Rubicon

上段は、飢餓状態の GFP-LC3 発現ヒト培養細胞の蛍光顕微鏡イメージ。オートファゴソームが輝点として観察される。Atg14L のノックダウンによりオートファゴソームは減少するが、Rubicon では逆に増加する。下段は、機能のモデル図。なお、Rubicon は RUN domain protein as Beclin1-interacting and cysteine-rich containing の略であると同時に、ユリウス・カエサルのルビコン渡河の故事にちなんだ。Beclin1 機能の逆転が、ルビコン河を渡りローマ共和国防衛から攻撃に転じたカエサルを想起させたためである。

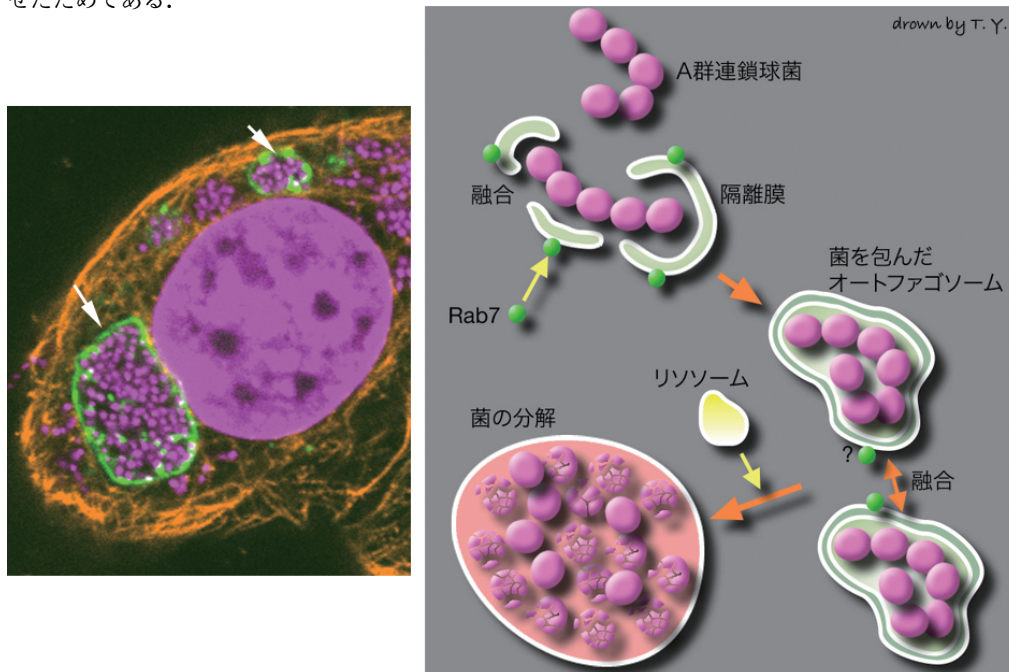


図4 A 群連鎖球菌に対するオートファジー

左、細胞質に侵入した A 群連鎖球菌のクラスターを包み込む巨大なオートファゴソーム (矢印)。緑は GFP-LC3、マゼンタは DNA 染色 (小さい粒が菌で、大きい円は宿主の細胞核)、オレンジは微小管。右、菌に対する巨大オートファゴソーム形成の模式図。Rab7 が関与する。

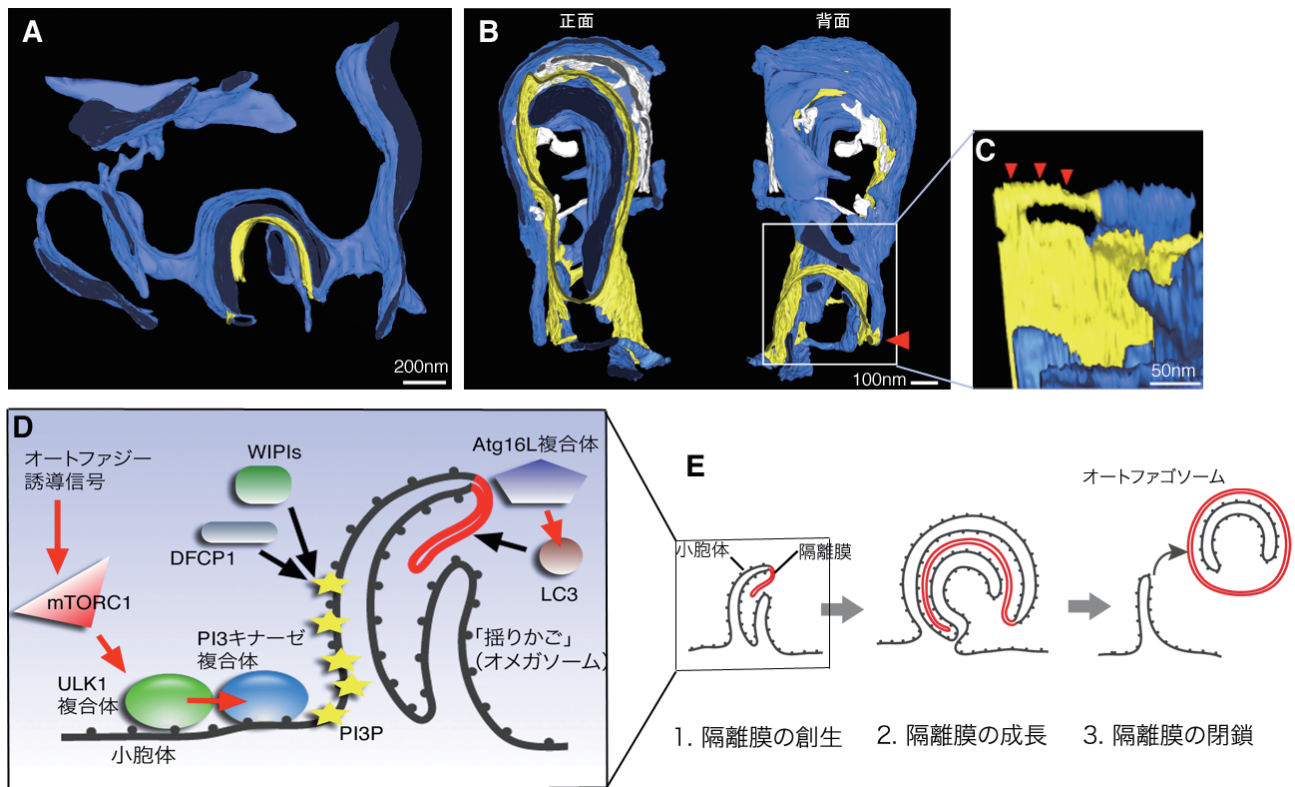


図5 オートファゴソーム膜の起源

上段, 電子線トモグラフィーの結果から構築された隔離膜(黄色)の三次元イメージ。青が小胞体。CはBの一部を拡大した。隔離膜と小胞体がチューブ状の構造(赤矢頭)で連続している。下段, 「小胞体揺りかご」モデル。Dでは, 関与する分子も描いている。文献57, Hayashi-Nishino, et al.(2009)の図を改変。

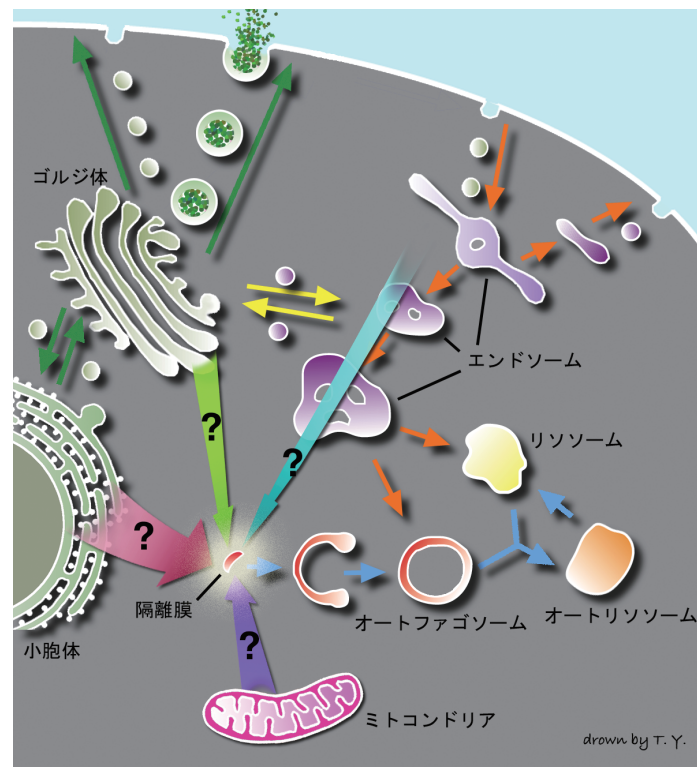


図6 オートファゴソーム形成に関わるオルガネラ

多くの他のオルガネラがオートファジーに関与している。今後の解析により詳細が明らかになるであろう。

たオルガネラ量の調節も行う。これらの基本機能以外に、オートファジーの予想外の働きがここ数年の間に次々と見つかっている(図2)。例えば我々は、中川一路博士(現東京医科歯科大学教授)らとの共同研究により哺乳類細胞内に侵入した病原細菌がオートファジーによって選択的に隔離され殺されることを見出している⁷⁾(図4参照)。これは自食=自己成分の分解というオートファジー本来の機能を越えた応用と言える。我々の研究はA群連鎖球菌を対象としたものだったが、その後、他の細菌あるいはウイルスや原虫など様々な病原体とオートファジーの攻防が続々と報告され、ひとつの学問領域となりつつある。

細胞死を招き変性疾患の原因と成る易凝集性タンパク質の排除にも、ユビキチン・プロテアソーム系と共にオートファジーが働いている。我々は、肝細胞の小胞体内に蓄積し肝変性を引き起こす α 1-アンチトリプシンZ変異体(ATZ)をオートファジーが選択的に分解することを、David Perlmutter教授(ピッツバーグ大学)らとの共同研究で明らかにした⁸⁾。この疾患は同じ変異を持つ患者間に、分解量の差に由来する重症度の差が存在するので、オートファジー能力が症状を左右している可能性がある。実際、ごく最近Perlmutter教授らは、オートファジー促進剤投与によってATZ発現マウスの肝ATZの量が減り、症状が軽減することを示している⁹⁾。オートファジー活性化は、アルツハイマー病モデルマウスの症状も抑制することが報告されており¹⁰⁾、オートファジーは様々な易凝集性タンパク質を標的とし、それらが起こす疾患(フォールディング病)に対する防御機構として働いているようである。

またオートファジーは、膜電位を失ったミトコンドリアを隔離除去する働きを持ち(ミトファジー)、その認識にやはり神経変性疾患であるパーキンソン病の原因遺伝子産物が関わっていることが判明し注目を集めている⁶⁾。ミトコンドリア損傷は、活性酸素種の漏出を招くなど細胞にとっては原発事故並みに危険であり、ミトファジーは極めて重要である。感染症や変性疾患に加え、発がん、II型糖尿病、心不全などの抑制にもオートファジーは関わる。これらの疾患はいずれも大きな社会的課題であり、それらに対抗する細胞機能としてオートファジーへの関心はいやがうえにも高まっている。その他、細胞質中の抗原のクラスII MHCによる提示、自然免疫における情報伝達、発生や分化、寿命延長などなど、オートファジーの八面六臂の活躍はとどまるところを知らない。我々の共同研究者である審良静男教授(大阪大学)らは、オートファジー不能ノックアウトマウスを作成し、オートファジーが炎症反応を抑制していることを見つけている¹¹⁾。最近では、細胞質の分子を通常の分泌経路を経ずに細胞外に放出する非通常型分泌にオートファジーが働いていることも報告されている^{12,13)}。オートファジーがどのようにしてその機能を果た

しているのかメカニズムが分からないケースも多いが、これほど多機能なのは、自己分解による栄養補給よりむしろ上記病原細菌の場合のように、細胞質の分子やときには大きな構造物までを隔離し除去できるという特性が最大限に応用されている結果であろう。

これらの機能は、後述するオートファジー関連遺伝子ATGを破壊したマウスの解析から明らかになった場合が多い。しかし、ATGの変異による遺伝的疾患についてはこれまで知られていなかった。最近になって、ATG16Lの1アミノ酸置換バリエーションが原因不明の炎症性腸疾患であるクローン病の患者に有意に多いことが見つかり、話題となっている^{14~16)}。今後このような例が増える可能性はあるが、重要なのはむしろ後天的な諸要素のオートファジー活性への影響なのかもしれない。例えば、加齢によるオートファジー活性の減退が示唆されており¹⁷⁾、神経変性疾患の晩発性に関わっている可能性がある。オートファジーと疾患の関係を詳しく探るために、組織におけるオートファジー活性を簡便に測定できる方法の開発が急務であろう。なお、オートファジーと聞くと、オートファジー細胞死(II型細胞死)として知られる現象¹⁸⁾を思い出す人も多い。これについては、死の指令が入った場合にオートファジーが過剰に起こり、細胞を死に至らしめるのだと解釈されている。しかしながら、過剰なオートファジーによる生理的な細胞死は哺乳類の組織・個体レベルでは実証されていないし、よしんばそれがあったとしても生体防御的オートファジーと細胞死誘導性オートファジーの分岐点がどのように決定されるのか、つまり普段どのようにして死なない程度に自己分解を抑制しているのか、そのメカニズムは全く不明である。従って、がん細胞でオートファジーを促進し細胞死を起こそうとするような戦略は、オートファジー細胞死誘導の仕組みが分からない現状では、逆にがん細胞を元気にしてしまう可能性も孕む。いずれにしろ、オートファジーとは基本的には細胞の守護者と考えて間違いない。

3. オートファジー分子研究の黎明

近年のオートファジー分野の爆発的な発展は、17年前の日本発の酵母研究に端を発している。酵母にもオートファジーがあることを世界に先駆け見つけていた大隅良典教授(現東京工業大学)が、酵母遺伝学の利点を活かし14個のオートファジーに必須のATG (autophagy-related) 遺伝子群の同定に成功したのである⁴⁾。電子顕微鏡で観察されていたものの関与するタンパク質が全く分からない「暗黒時代」が、40年近く続いたあとの快挙であった。このブレイクスルーが、オートファジーの分子機構と機能的意義の理解を飛躍的に進める原動力となった。私事になるが、それまで分泌経路などのメンブレントラフィック研究

に従事していた筆者は、大隅博士が自然科学研究機構・基礎生物学研究所の教授に着任された1996年に、助教授として新しい研究室に参加、哺乳類オートファジーの研究を開始した。同業者にさえ「辞めたくなる作用の研究ですか?」と言われ、「いえいえ、辞職ではなく自食作用です」と答えていたオートファジーの無名時代だったが、ATGを武器にメンブレントラフィック最後の秘境に切り込めると気持ちが奮い立ったことを昨日のことに思い出す。

筆者は大隅研究室で、現在もこの分野で活躍する水島昇博士(現東京医科歯科大学教授)らと共に哺乳類Atgホモログの同定と解析を行い、独立後も引き続き哺乳類オートファジーの膜動態を駆動・制御する分子メカニズムと、オートファジーの疾患における役割を研究している。最初に手がけたLC3(Atg8ホモログ)は、哺乳類で初めて見つかったオートファゴソーム膜結合タンパク質であり、安定にオートファゴソームに局在するタンパク質が今に至るもこれのみしか知られていないため、広くスタンダードマーカーとして使用されている¹⁹⁾(図3上、図4左に使用例)。論文の引用件数はこの分野としては大変多く、2010年末に1,200を超えた。LC3は、proLC3として合成後直ちにC末22残基がシステインプロテアーゼであるAtg4Bにより切断されLC3-Iとなる。細胞質の可溶性タンパク質であるLC3-IのC末端に、Atg7とAtg3が触媒するユビキチン様修飾によりホスファチジルエタノールアミン(PE)が共有結合するとLC3-IIとなり、オートファゴソーム膜に局在化する¹⁹⁾。我々は、オートファゴソーム形成からリソソームとの融合に至るオートファジーの流れ(flow)を追跡できるプローブとして、LC3にGFPとRFPを並列に繋いだ融合タンパク質tf(tandem fluorescence tagged)LC3も開発した²⁰⁾。GFPは酸性では退色する一方、RFPはしない。従ってオートファゴソームに結合しているtfLC3は緑と赤両方の蛍光を発するのに対し、リソソームと融合し内部が酸性化した状態では緑が消え赤のみとなる(なお外膜のLC3は膜から細胞質に放出されると考えられる)。tfLC3の輝点として識別されるオートファゴソームが緑+赤の蛍光を発しているか、赤のみの蛍光を発しているかを定量することで、どれだけのオートファゴソームがリソソームと融合したかというオートファジーの進行を判定できる。このtfLC3も多くの研究者に使われている。

さらに、隔離膜にのみ結合するタンパク質としてAtg5が同定された²¹⁾。Atg5はAtg12とユビキチン様修飾で共有結合し²¹⁾、Atg16Lと共に複合体を形成²²⁾、アンチパラレルなホモ二量体として存在していることも明らかになった²³⁾。この複合体は、オートファゴソーム完成時に膜から離脱するので、オートファゴソーム形成の初期過程を追跡するのに役立つ²⁴⁾。またVps30/Atg6のホモログBeclin1が

クラスⅢホスファチジルイノシトール(PI)3キナーゼと複合体を作ることも示した²⁵⁾。以上のような分子基盤は、酵母からヒトにいたるまでほぼ共通しており、オートファジーが進化上良く保存された重要な機能であることを伺わせる。しかし後述するように哺乳類と酵母の違いも徐々に明らかになってきており、多彩な応用的機能を可能にするために分子機構の変容が進化の過程で生じたことが窺える。

4. オートファジーの膜動態の駆動・制御

以下に筆者らがこれまでに明らかにしてきたオートファジーの膜動態を駆動・制御する分子機構についてあらましを述べる。

4-1. LC3

哺乳類にはLC3のホモログが六つ以上あり、全てをノックアウト・ノックダウンすることが事実上不可能だったため、マーカーとしては知られていたもののその機能の解明は遅れていた。筆者らは、LC3ホモログ全てのプロフォームのC末フラグメントを切断するAtg4Bの酵素活性欠失変異体がI型分子に強固に結合することでII型の生成を阻害し、結果オートファジーが抑制される現象を偶然発見した²⁶⁾。さっそくAtg4BC74A変異体を培養細胞に過剰発現させたところ、正常な隔離膜形成が観察されたが多くの閉じておらず口を開いた状態で蓄積していた。従って、LC3は隔離膜末端が融合しオートファゴソームが完成する段階に必要なであると結論した²⁶⁾。酵母では、LC3のホモログであるAtg8はオートファゴソーム形成に必要とされている⁴⁾。動物でも同様の働きはあるかもしれないが必須ではなく、より後期に決定的な作用点があるものと思われる。隔離膜末端の融合は、メンブレントラフィックに一般的な融合機構NSF-SNARE系に依存しないことが酵母で知られている²⁷⁾。他方、酵母Atg8が、*in vitro*においてリポソーム同士のhemi-fusion(脂質二重層の外層だけが融合する)を単独で引き起こすことも報告されている²⁸⁾。もしかしたら、LC3やAtg8自身が隔離膜末端同士の融合因子なのかもしれない。なおAtg4BC74A変異体は、内在性の正常Atg4Bがあっても過剰発現で効果を発揮するので、オートファジー阻害剤としても有用である。

末端の融合が終わってもLC3はオートファゴソームに結合している。筆者らは、動物ではオートファゴソームがダイニンモーターを使って、核近傍の中心体に向かって微小管上を移動することを明らかにしている²⁹⁾。これは多くの細胞で中心体付近に集積しているリソソームと融合するため、興味深いことにLC3抗体を細胞に顕微注入するとこの動きが止まってしまう²⁹⁾。間接的な結果ではあるが、微小管依存的なオートファゴソームの移動にもLC3が関与している可能性が示唆される。酵母の場合は、リソ

ソームに相当する液胞が巨大で細胞の大部分を占めるため、このような移動は必要ではなく、微小管を壊してもオートファジーは影響を受けない³⁰⁾。

4-2. Atg5-Atg12-Atg16L 複合体

隔離膜にのみ結合する Atg5-Atg12-Atg16L 複合体は何をしているのであろうか？ 筆者らは、構成因子それぞれを過剰発現した場合の効果の解析から、この複合体が LC3-II の膜局在に関わることを明らかにした³¹⁾。すなわち、Atg16L が膜に結合し、同時に LC3-II 形成の中間体である LC3-Atg3 結合体が³²⁾、Atg12 と Atg3 との結合によりそこにリクルートされ膜上で脂質化が起こる。前述のように、Atg16L にはクロン病に感受性を示す 1 塩基多型が見つかった。それが位置する C 末端の WD リピートドメインは酵母には存在しない。これも進化上現れた差異である。クロン病の原因ははっきりしていないが、腸内細菌と免疫系の複雑な相互作用の破綻の結果ではないかと推測されている³²⁾。となると、オートファジーの病原体除去機能との関係が当然疑われ、WD リピートはこの機能に特化した制御モジュールである可能性が生じる。この仮説を支持する論文も出ている^{33,34)}。しかし、筆者らは Atg16L ノックアウト細胞での Atg16L-T300A 発現により対サルモネラオートファジーも正常レベルに回復することを見出し、真相はそれほど単純ではないと考えている²³⁾。さらなる解析が必要である。

4-3. Beclin1-PI3 キナーゼ複合体

ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) を産生する PI3 キナーゼを阻害すると、オートファゴソーム形成は起こらない³⁵⁾。オートファジーに必要な PI3P を産生するクラス III PI3 キナーゼは、先述のように Atg6 ホモログの Beclin1 と複合体を形成する²⁵⁾。筆者らは最近新たな複合体構成タンパク質として Atg14L, UVRAG, Rubicon を同定した (Atg14L は我々を含め四つのグループが、Rubicon は二つのグループが独立に報告し、UVRAG の報告は米国のグループに先を越された)³⁶⁻⁴⁰⁾。そしてこれらの共沈降実験やゲル濾過による複合体のサイズ比較から、少なくとも 3 種類の Beclin1-PI3 キナーゼ複合体が存在することが判明した³⁹⁾。複合体 A は、全ての複合体に含まれる Beclin1, クラス III PI3 キナーゼ, hVps15 に加え Atg14L を含む。複合体 B は Atg14L の代わりに UVRAG を含む、複合体 C は UVRAG に加え Rubicon を含む。Atg14L と UVRAG は Beclin1 の同じ領域に結合するので、同時には結合できない。酵母にも複合体 A と B に相当する複合体が存在するが、Rubicon は酵母には存在しない。Atg14L のノックダウンではオートファゴソームが減少するのに対し、Rubicon のノックダウンは栄養条件にかかわらずオートファゴソームが著しく増加するという興味深い結果が得られた³⁹⁾ (図 3 上)。また Atg14L は隔離膜やオートファゴソームへ

の結合が認められるのに対し、Rubicon はそうではなく後期エンドソームに局在していた。さらに Atg14L ノックアウト細胞を作成するなどして解析を進め、Atg14L はオートファゴソーム形成に必須である一方、Rubicon はオートファゴソームとリソソームの融合を負に制御していることを明らかにした³⁹⁾ (図 3 下)。Beclin1 等との複合体形成に必要な領域を欠く Rubicon 変異体は機能を失うので、機能発揮には Beclin1-PI3 キナーゼと複合体を形成している必要がある。すなわち、結合する相手によって Beclin1-PI3 キナーゼの生理機能が逆転するということになる。しかも Rubicon は同時にエンドサイトーシス経路 (EGF 受容体のダウンレギュレーション) も負に制御しており³⁹⁾、酵母にはない複雑なメンブレントラフィック制御システムの存在が浮かび上がってきた。飢餓によって複合体 C が減り A が増えるということはないので、複合体のバランスが変化するような生理的病理的状況があるのかどうか今後の課題である。なお他のグループの報告から、複合体 B は C と同じステップを正に制御しているのではないかと考えられる^{36,41)}。

Beclin1 ノックアウトマウスは胎生致死である⁴²⁾。Atg3⁴³⁾、Atg5⁴⁴⁾、Atg7⁴⁵⁾、Atg9⁴⁶⁾、Atg16L¹¹⁾のノックアウトマウスが生後 1 日で死ぬ表現形質を示すことと対照的で、Beclin1 がエンドサイトーシス経路をも制御していることの反映かもしれない。また Beclin1 のヘテロノックアウトマウスは生まれてくるが、自然発がんを多発する^{42,47)}。従って Beclin1 は半量不十分発がん抑制因子 (hetero-insufficient tumor suppressor) と見なされる。これについてもオートファジーを介した作用かどうかを、他の Atg ノックアウトを用いて検討する必要がある。Beclin1 は、元々抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 と結合するタンパク質として同定されており⁴⁸⁾、ここで述べたもの以外に Bcl-2 を含む 10 種類以上の結合タンパク質が知られている⁴⁹⁾。それらの結合は Atg14L, UVRAG, Rubicon のように安定ではなく、おそらく一過性のものと思われる。多数の結合タンパク質 (ほとんどは酵母にはない) の存在は、Beclin1-PI3 キナーゼ複合体が主要なオートファジー調節ポイントであることを示しているのかも知れない。

4-4. Atg 以外のタンパク質

コア Atg タンパク質は、Vps30 でもあった Atg6 以外新規タンパク質であり、そこにはメンブレントラフィックに一般的な制御タンパク質は含まれていない⁴⁾。しかし、その後他のメンブレントラフィックと共通の、Atg 以外の因子が徐々に知られるようになってきた。例えば、メンブレントラフィックの様々なステップに働く Ras-like small GTPase の Rab スーパーファミリーの一員で、エンドサイトーシス経路後期で働く Rab7 は、オートファゴソームとリソソームの融合にも必要である^{50,51)}。筆者らは、それに

加え Rab7 が A 群連鎖球菌に対するオートファゴソームの形成に必要であることを最近報告した⁵²⁾。面白いことに飢餓誘導のオートファゴソーム形成には Rab7 は不要である。A 群連鎖球菌が細胞質に現れると、通常見られない巨大なオートファゴソームが形成され菌のクラスターを選択的に包み込む (図 4 左)。いくつかの隔離膜が菌塊の周りに取り付いてお互いに融合することで包囲網を形成するようで、その融合に Rab7 が関わると考えている (図 4 右)。連鎖した菌を排除する必要に迫られ、Rab7 をオブション部品として取り込んだオートファジーの進化型が登場したのであろう。

筆者らの共同研究者である天野敦雄教授 (大阪大学) らは、オートファゴソームとリソソームの融合に SNARE タンパク質の VAMP8 と Vti1b が働いていることを明らかにしている⁵³⁾。SNARE は Rab と並ぶ普遍的なメンブレントラフィック制御因子で、種々の経路の各所で異なる SNARE が膜融合を駆動している。Rab と SNARE が関与することからオートファゴソームとリソソームの融合は、他のメンブレントラフィックに比較的類似していると言える。今後、オートファジーの分子機構と一般的なメンブレントラフィックの分子機構の共通点・相違点の全体像が見えてくるであろう。

筆者らはまた、PI3P を PI3 に戻す脱リン酸化酵素 MTMR3 がオートファゴソーム形成を負に制御していることを見出した⁵⁴⁾。後述するように局所的な PI3P レベルがオートファゴソーム形成に重要で、そこで MTMR3 とクラス III PI3 キナーゼが拮抗してオートファゴソーム形成量を決定しているものと思われる。Deretic らは、別の脱リン酸化酵素 Jumpy (MTMR14) がオートファジーに関わっていることを報告している⁵⁵⁾。

5. オートファゴソーム膜の起源

細胞内の様々な膜動態の中でもオートファゴソームの形成は、極めて特異である。どこからともなく現れること、閉じた膜構造が伸張しながら片側に湾曲することなどは他では見られない。とりわけその起源は最大の謎として数十年に亘り議論されてきたが、決着は付いていない⁵⁶⁾。隔離膜イコール小胞体であるという説が、著名な教科書である「細胞の分子生物学」の第3版まで図中に採用されていたが、我々が Atg5 の解析から隔離膜は小胞体とは異なる「柿の種」が伸張してできることを報告したことを受けて第4版からは柿の種が描かれている。だが、柿の種はどこから来たのだろうか。過去には、全く新たに作られるという *de novo* 創生説や、様々なオルガネラ由来説が出されてきたが、最近になって小胞体を足場に柿の種が作られると考える説 (小胞体そのまま隔離膜になるのではない) と、ミトコンドリア外膜から作られるという説がそれぞれ新た

なデータを基に提唱され、この古くて新しい問題が再び脚光を浴びている。筆者は以下に述べるように小胞体起源説に与する論争の当事者である。

5-1. 小胞体起源説

5 分ほどでオートファゴソームが完成してしまう正常細胞に比べ、Atg4BC74A 変異体発現細胞ではそれが閉じない状態で蓄積するので隔離膜の観察が容易である。電子顕微鏡の専門家である山本章嗣教授 (長浜バイオ大学) らに、蓄積している隔離膜を電子顕微鏡で観察して頂いたところ小胞体が隔離膜に密着するように寄り添う像が多数得られた⁵⁷⁾。正常細胞でも、隔離膜は少ないものの同様であったので、小胞体と隔離膜の会合は変異体発現による異常な現象ではないと結論した。次に、電子線トモグラフィーによる解析が行われた⁵⁷⁾。電子線トモグラフィーは、細胞超薄切片を傾斜させながら連続撮影し、そこから三次元イメージを構築するものでナノスケールの CT スキャンと考えればよい。解析の結果、網目状の小胞体の一部が隔離膜を内と外から挟み込むような複雑な構造を作っていることが明らかになった (図 5A, B)。さらに、その挟み込んである小胞体と隔離膜は、へその緒のような細いチューブで連結されていた (図 5C)。これらの観察から我々は、揺りかご (cradle) モデルと名付けた仮説を提唱している⁵⁷⁾ (図 5E)。小胞体の一部が変形し、そこから隔離膜が伸張する。そのとき変形した小胞体が鋳型となって隔離膜のカーブが形成される。最後に隔離膜が閉じオートファゴソームになると小胞体の揺りかごから離脱する。隔離膜には小胞体のタンパク質はほとんど存在しないので、隔離膜の脂質成分はへその緒を通して供給されるが、タンパク質は何らかの仕組みで移行しないようになっているのであろう。ただし電子顕微鏡は同一サンプルの経時変化は観察できないから、へその緒が後からできた可能性も否定できない。へその緒という喩えを使うなら、揺りかごは胎盤と呼んだ方が良いのかもしれない。このモデルでは、オートファゴソームは必ず内部に小胞体の断片を含むことになる。実際我々は約 70% のオートファゴソーム内部に小胞体断片を観察している。しかし、ミトコンドリアや細菌など大きな構造物を包み込む場合には内側の小胞体は不要であるかもしれない。なお Eskelinen らも独立に、ほぼ同一の結論を電子線トモグラフィーで得ている⁵⁸⁾。ただ、両グループとも試料作成に化学固定を用いており、へその緒などがアーチファクトである可能性も残るので、高圧凍結法などのより優れた方法での検証が望まれる。

小胞体起源説を支持する分子レベルの研究もある。Ktistakis らは、DFCP1 (double FYVE domain-containing protein 1) という主に小胞体に分布し PI3P 結合能を持つ膜タンパク質が、飢餓刺激により小胞体上で点状に集合しそこでオートファゴソームが作られる様子を美しいビデオイ

メージで示した⁵⁹⁾。彼らは、DFCP1 が集合する場所をオメガソームと命名し、オートファゴソーム形成の場であるとした。前述の揺りかごとオメガソームは同一構造ではないかと考えられる。実際、免疫電子顕微鏡法で、揺りかごに DFCP1 が局在することを確認している⁵⁷⁾。一方筆者らは、蛍光顕微鏡観察及び免疫電子顕微鏡観察から、Atg14L が隔離膜やオートファゴソームに加え小胞体に局在することに気付いていた³⁹⁾。この局在は、細胞分画実験でも確認された⁶⁰⁾。小胞体局在の意味を探るため、まず Atg14L と DFCP1 の関係を調べた。飢餓条件下で Atg14L は DFCP1 が集まるオメガソームと共局在し、Atg14L のノックダウンにより DFCP1 のオメガソームへの集合が消失するので、Atg14L は DFCP1 の上流に位置すると考えられた⁶⁰⁾。また Atg1 ホモログで、Atg14L の上流にある ULK1 のドミナントネガティブ変異体発現により、Atg14L のオメガソーム局在は消えたが、小胞体局在は消えなかった。これらの結果から、飢餓信号が ULK1 を介して伝達されると、Atg14L は小胞体上をオメガソームに移動し、続いて DFCP1 の移動も誘導されると結論した⁶⁰⁾。Atg14L はクラス III PI3 キナーゼと複合体を形成しているの、集結点における PI3P の局所濃度を上昇させ、PI3P 結合活性を持つ DFCP1 がその結果そこに誘引されるのではないかと考えている。Atg14L に Ras の CAAX モチーフを融合し細胞膜へ局在化させると、クラス III PI3 キナーゼや Beclin1 も細胞膜に局在化することから、複合体の膜局在を決定しているのは Atg14L である可能性が高い⁶⁰⁾。そこで次に、様々な欠失変異体を用いて Atg14L の小胞体膜局在に必要なドメインの検索を行い、N 末領域と C 末領域の両方が必要であることを突き止めた。また N 末領域にはよく保存されたシステインリピードが存在したのでその四つのシステインを全てアラニンに置換したところ、小胞体に局在しなくなった。この Atg14L4C4A 変異体は、野生型同様クラス III PI3 キナーゼや Beclin1 と複合体を形成する。Atg14L ノックアウト細胞にこの変異体を発現させても、野生型発現のようにオートファゴソーム形成は復活しなかった。この変異により小胞体局在以外にオートファゴソーム形成に必要な何らかの機能が損なわれている可能性を排除するため、Atg14L4C4A 変異体に DFCP1 の小胞体局在化信号領域を融合したところ、野生型以上にオートファゴソーム形成が顕著に起こった。従って、Atg14L が小胞体に局在することがオートファゴソーム形成に必須であると結論した⁶⁰⁾。

以上の結果を総合すると、1) 小胞体上に局在する Atg14L-Beclin1-クラス III PI3 キナーゼ-p150 複合体に信号が入力されるとオメガソーム／揺りかご形成箇所へ移動、2) 局所的な PI3P 濃度を上昇させその結果 DFCP1 が集合しオメガソーム／揺りかごが形成され、3) 小胞体からの

脂質供給によりオメガソーム／揺りかご内で隔離膜が形成され成長する、というプロセスが考えられる (図 5D)。ステップ 2 で、Atg18 ホモログで PI3P に結合する WIP1 もやってくる。そしてステップ 3 で、Atg5-Atg12-Atg16L 複合体がリクルートされ、それにより LC3-II も隔離膜上に現れるのであろう。小胞体には元々 PI3P がほとんどないので、この脂質の局所濃度の上昇がオメガソーム／揺りかごという特異構造形成に関与するのではないかと考えられる。隔離膜の起源そしてその形態形成というオートファジーにおけるビッグクエストを解く重要なヒントが得られたと信じているが、新たな謎も多数生じた。Atg14L 複合体への飢餓信号入力はどういかなされるのか、どのようなメカニズムで Atg14L 複合体は小胞体膜に結合しその上を移動するのか、オメガソーム／揺りかごの場所はあらかじめ決められているのか、オメガソーム／揺りかごの特徴的な形状はどういかなるものにして作られるのか (隔離膜の湾曲は小胞体によるものかとして、では小胞体は何故曲がるのか)、等々疑問は尽きない。

5-2. ミトコンドリア起源説

2010 年、Lippincott-Schwartz らが、オートファゴソームはミトコンドリア外膜から生じるという説を発表し分野に衝撃が走った⁶¹⁾。彼女らは、様々なオルガネラマーカーのうちミトコンドリアマーカーの YFP-Mito^{ch5} TM が LC3 と共局在することを見出し、お家芸であるライブイメージングを駆使してミトコンドリアからオートファゴソームが生じる様子を示した。ミトコンドリアはオートファジーのターゲットとなるが、リング状に見えているオートファゴソームで YFP-Mito^{ch5} TM が LC3 の内側ではなくほぼ同じ位置にあることからミトファジーを見ているのではないとしている。また YFP-Mito^{ch5} TM がオートファゴソーム膜に直接翻訳後挿入された可能性を否定するため、ミトコンドリアの一部をフォトリッチしたところ、LC3 と共局在していたシグナルも消える場合があったのでミトコンドリア膜とオートファゴソーム膜が連続していると結論した。実は Mito^{ch5} TM は人工的なマーカーで、ミトコンドリアの内在性タンパク質ではない。彼女らは各種の内在性タンパク質を調べたがいずれも LC3 とは共局在しなかった。その理由について、Mito^{ch5} TM はミトコンドリア外膜脂質二重層の外側の層にのみ挿入されていて通常の膜タンパク質のように貫通していないからだと考えている。オートファゴソームの曲率が大きいので、膜貫通タンパク質は入れないという仮説だ。このマーカーを使ったがゆえに新たな発見に至った訳だが、一方で論拠の弱点にもなっている。

さて小胞体説とミトコンドリア説はどちらが正しいのだろうか。現状では双方のデータは相互排他的ではないので、両方正しいのかもしれない。あるいは小胞体とミトコンドリアがそれぞれ独立にオートファゴソームを形成して

いるのではなく、Lippincott-Schwartz らと筆者らは同じ現象を異なる側面から見ている可能性もある。鍵を握ると思われるのは、ミトコンドリアと小胞体の接触である。ミトコンドリアと小胞体がところどころで接触・会合している事実は前から知られていて、その機能的な意義（物質のやりとり）も議論されている。Lippincott-Schwartz らは、ミトコンドリアの融合因子で、ミトコンドリア-小胞体コンタクトサイト形成にも関与すると考えられている *mitofusin2* (*Mfn2*) のノックアウト細胞でオートファゴソーム形成が低下することを示し、小胞体からホスファチジルセリンがコンタクトサイトを介してミトコンドリアに供給されミトコンドリアでそれがPEに変換されLC3と共有結合すると唱えている⁶¹⁾。しかし、この結果は、ミトコンドリアで形成されたPEが小胞体に運ばれることを意味しているのかもしれない。*Mito^{ch}TM* もコンタクトサイトを通過できる可能性がある。如何に優れたライブイメージングでも、オートファゴソームがミトコンドリアなり小胞体なりから直接出てくるのか、ごく近傍から出てくるのかは見分けられない。コンタクトサイトあるいはその近くの小胞体側にオメガソーム／揺りかごがあるなら、彼女らと同様の観察結果となりうる。彼女らは免疫電子顕微鏡観察も行い、ミトコンドリア近傍にLC3が集積している写真を1枚だけ出しているが、あまり明瞭ではない。今後ミトコンドリア-小胞体コンタクトサイトに焦点を当て、形態観察だけではなく分子メカニズムに踏み込んだ解析を行い、両者の観察を統合しうる新たなモデルを提出できれば面白いと思っている。

Lippincott-Schwartz はメンブレントラフィックの世界では知らぬ人のいないライブイメージングのパイオニアで、様々な経路を手がけてきた。世間で言われている説を覆すことに情熱を燃やす闘士である。つい最近まで、ゴルジ体内輸送について現在優勢な槽板成熟説に叛旗を翻し台風の目となっていた⁶²⁾。対岸の火事と高みの見物をしていたら、思いがけない飛び火で驚いたが、このような論争は分野を活性化するので歓迎すべきことだと思う。筆者らも好敵手を得て、真実を自分らの手で見極めたいという闘志をかきたてられている。

酵母ではPAS (pre-autophagosomal structure) と呼ばれる Atg タンパク質群が集結する液胞近傍の構造から隔離膜が形成される⁴⁾。PAS は、電子顕微鏡観察で明瞭な膜が認められないアモルファスな構造である。PAS は哺乳類では認められないが、観察しにくいだけなのか、また酵母のPAS は小胞体やミトコンドリアと接触しているのか等は今後の解明を待たねばならない。いずれにしろ哺乳類で巻き起こった論争によって、細胞生物学全体の課題と言っても良いこのオルガネラ新生の謎の解明は加速されるに違いない。

5-3. 他のオルガネラの関与

小胞体あるいはミトコンドリア以外のオルガネラも、オートファジーと無関係ではない。我々の共同研究者である福田光則教授（東北大学）らは、ゴルジ体に局在する Rab33b が Atg16L と結合することを見出している⁶³⁾。コア Atg のなかで唯一の膜タンパク質である Atg9 が哺乳類ではゴルジ体及び後期エンドソームに分布していて、一過性にオートファゴソームにやってくることが知られている⁶⁴⁾。すなわち、ゴルジ体からオートファゴソーム・隔離膜へのメンブレントラフィックが存在することが強く示唆される。ゴルジ体自身は隔離膜形成の場ではないにしても、膜を供給している可能性は大いにある。また古くから、エンドソームがリソソームと融合する前のオートファゴソームに融合することが知られており、膜やタンパク質を供給してオートファゴソームの「成熟化」に寄与しているのではないかと考えられている⁶⁵⁾。さらに最近、細胞膜の関与も報告された⁶⁶⁾。その報告では、Atg16L が細胞膜に結合し、エンドサイトーシスによって細胞膜から形成される Atg16L 結合小胞がオートファゴソーム前駆体となるとされている。これは細胞膜起源説とも言えるが、上記のエンドソームからの膜供給を見ているか、あるいはその亜型であると考えるのが妥当であろう。ともかくも、オートファゴソームはほとんど全てのオルガネラを総動員して作られていると言えそうだ (図6)。

6. おわりに

筆者は、この10年余りをオートファジー研究に従事し、あるひとつの科学分野の種が芽を吹き木に成長していく過程を最初から体験する僥倖に恵まれた。オートファジーは2009年に、とうとう少年ジャンプ連載の漫画（鳥袋光年作「トリコ」）に登場した。主人公が自己の細胞のオートファジーを活性化しエネルギーを得て敵との格闘に勝つという奇想天外な筋だが、途中出てくるオートファジーの説明は的確なものだったので感心した（おまけに、主人公がオートファジーでエネルギーを得られる時間が限られており、それも実に正しい）。漫画登場に筆者はいたく感動し、国内外の講演で何度も紹介している。週に300万部出る少年ジャンプ（海外でも Manga は有名）に載る方が、Nature や Science に載るよりずっと意義がある、と言うと、特に海外で大変受ける。オートファジーが多くの人に知られ始めていることは、素直に嬉しい。

あれよあれよという間に育ってきたオートファジー分野だが、まだ若木であり、これから大きな樹となって枝葉を伸ばしていかなければならない。論文数は格段に増えたものの、ここでも働いている、あそこでも重要、だがメカニズムは皆目分からない、といった新しさを追う仕事が多く、地道な分子機構解明の努力はまだ少ない。多岐に亘る生理

的病理的事象に関わり、状況に応じて大きく活動が変化するオートファジーの制御は、他のメンブレントラフィックとの相互作用もあって極めて複雑である。オートファジーを含めたメンブレントラフィックは、細胞や組織・個体の状況に応じて在庫・輸送の管理が統合的に行われるひとつの物流ネットワークと見なせる。これは、経済で言うロジスティクス=原材料の調達から製品消費までのものの流れの総合的なマネジメントとよく似ている。細胞内のロジスティクスは、個々の細胞の生存のみならず神経、内分泌、免疫などの高次生体機能をも担い、その物流制御の障害や破綻が種々の疾患の原因となりうる。もちろん本来のロジスティクスは人間が意図・計画するもので、細胞内での事象とは本質的に異なるが、アナロジーとしてこの細胞内ロジスティクスという概念を導入することで、複雑で多層的な細胞内物流を俯瞰的に洞察することが可能になると筆者は考えている。科学では時として「用語」が研究を進展させる。シャペロンという語によって新たな分野が創造されたように。現在、この新視点による細胞内物流研究の新たな展開を目指す文科省科研費新学術領域研究「細胞内ロジスティクス：病態の理解に向けた細胞内物流システムの融合研究」が、約 40 名のメンバーによって展開されている (<http://leib.rcai.riken.jp/logistics/home.htm>)。このような活動を通して、まだまだ謎の多いオートファジーの、特にメカニズムの解明を進めていきたいと考えている。

謝辞

本稿に記述した研究は、大隅良典先生の元であるいは独立後に、多くの仲間や共同研究者の皆さんと共に行った。大隅先生を始めそれら全ての人に深謝します。

文 献

- 1) Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D.W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E.H., & Lenardo, M.J. (2010) *Nature*, 465, 942–946.
- 2) Yoshimori, T. & Noda, T. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20, 401–407.
- 3) Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., & Klionsky, D.J. (2008) *Nature*, 451, 1069–1075.
- 4) Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 458–467.
- 5) Eskelinen, E.-L. & Saftig, P. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, 1793, 664–673.
- 6) 吉森 保 (企画) (2009) 実験医学, 27, No. 18 (オートファジー特集号).
- 7) Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., & Yoshimori, T. (2004) *Science*, 306, 1037–1040.
- 8) Kamimoto, T., Shoji, S., Hidvegi, T., Mizushima, N., Umebayashi, K., Perlmutter, D.H., & Yoshimori, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 4467–4476.
- 9) Hidvegi, T., Ewing, M., Hale, P., Dippold, C., Beckett, C., Kemp, C., Maurice, N., Mukherjee, A., Goldbach, C., Watkins, S., Michalopoulos, G., & Perlmutter, D.H. (2010) *Science*, 329, 229–232.
- 10) 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., & Rubinshtein, D.C. (2004) *Nat. Genet.*, 36, 585–595.
- 11) Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M. H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., & Akira, S. (2008) *Nature*, 456, 264–268.
- 12) Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W.F., & Subramani, S. (2010) *J. Cell Biol.*, 188, 537–546.
- 13) Duran, J.M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W.F., & Malhotra, V. (2010) *J. Cell Biol.*, 188, 527–536.
- 14) Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Häslér, R., Sipos, B., Fölsch, U.R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C.G., Krawczak, M., & Schreiber, S. (2007) *Nat. Genet.*, 39, 207–211.
- 15) Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., Shugart, Y.Y., Griffiths, A.M., Targan, S.R., Ippoliti, A.F., Bernard, E.-J., Mei, L., Nicolae, D.L., Regueiro, M., Schumm, L.P., Steinhardt, A.H., Rotter, J.I., Duerr, R.H., Cho, J.H., Daly, M.J., & Brant, S.R. (2007) *Nat. Genet.*, 39, 596–604.
- 16) Zhang, H.-F., Qiu, L.-X., Chen, Y., Zhu, W.-L., Mao, C., Zhu, L.-G., Zheng, M.-H., Wang, Y., Lei, L., & Shi, J. (2009) *Hum. Genet.*, 125, 627–631.
- 17) Cuervo, A.M., Bergamini, E., Brunk, U.T., Dröge, W., Ffrench, M., & Terman, A. (2005) *Autophagy*, 1, 131–140.
- 18) Kroemer, G. & Levine, B. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 1004–1010.
- 19) Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000) *EMBO J.*, 19, 5720–5728.
- 20) Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2007) *Autophagy*, 3, 452–460.
- 21) Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 33889–33892.
- 22) Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2003) *J. Cell Sci.*, 116, 1679–1688.
- 23) Fujita, N., Saitoh, T., Kageyama, S., Akira, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 32602–32609.
- 24) 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.
- 25) Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001) *EMBO Rep.*, 2, 330–335.
- 26) Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008) *Mol. Biol. Cell*, 19, 4651–4659.
- 27) 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.
- 28) Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007) *Cell*, 130, 165–178.

- 29) Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008) *Cell Struct. Funct.*, **33**, 109–122.
- 30) Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 435–446.
- 31) Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2092–2100.
- 32) Xavier, R.J. & Podolsky, D.K. (2007) *Nature*, **448**, 427–434.
- 33) Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J.D., Daly, M.J., & Xavier, R.J. (2008) *PLoS ONE*, **3**, e3391.
- 34) Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I.G., Allaoui, A., Jones, N.L., Nuñez, G., Girardin, S.E., & Philpott, D.J. (2010) *Nat. Immunol.*, **11**, 55–62.
- 35) Lindmo, K. & Stenmark, H. (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 605–614.
- 36) Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., & Jung, J.U. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 688–699.
- 37) Sun, Q., Fan, W., Chen, K., Ding, X., Chen, S., & Zhong, Q. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19211–19216.
- 38) Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 5360–5372.
- 39) Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 385–396.
- 40) Zhong, Y., Wang, Q., Li, X., Yan, Y., Backer, J., Chait, B., Heintz, N., & Yue, Z. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 468–476.
- 41) Liang, C., Lee, J.S., Inn, K.S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., & Jung, J. U. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 776–787.
- 42) Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., & Heintz, N. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15077–15082.
- 43) Sou, Y.-S., Waguri, S., Iwata, J.-i., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., & Komatsu, M. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 4762–4775.
- 44) Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., & Mizushima, N. (2004) *Nature*, **432**, 1032–1036.
- 45) Komatsu, M. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 425–434.
- 46) Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Kawai, T., Ishii, K., Takeuchi, O., Yoshimori, T., & Akira, S. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20842–20846.
- 47) 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.
- 48) Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., & Levine, B. (1998) *J. Virol.*, **72**, 8586–8596.
- 49) He, C. & Levine, B. (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 140–149.
- 50) Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., & Eskelinen, E.-L. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 4837–4848.
- 51) Gutierrez, M.G., Munafó, D.B., Berón, W., & Colombo, M.I. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 2687–2697.
- 52) Yamaguchi, H., Nakagawa, I., Yamamoto, A., Amano, A., Noda, T., & Yoshimori, T. (2009) *PLoS Pathog.*, **5**, e1000670.
- 53) Furuta, N., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., & Amano, A. (2010) *Mol. Biol. Cell*, **21**, 1001–1010.
- 54) Taguchi-Atarashi, N., Hamasaki, M., Matsunaga, K., Omori, H., Ktistakis, N.T., Yoshimori, T., & Noda, T. (2010) *Traffic*, **11**, 468–478.
- 55) Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R., Tosch, V., Delgado, M., Proikas-Cezanne, T., Laporte, J., & Deretic, V. (2009) *EMBO J.*, **28**, 2244–2258.
- 56) Hamasaki, M. & Yoshimori, T. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 1296–1301.
- 57) Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., & Yamamoto, A. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1433–1437.
- 58) Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E.-L. (2009) *Autophagy*, **5**, 1180–1185.
- 59) Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N.T. (2008) *J. Cell Biol.*, **182**, 685–701.
- 60) Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., & Yoshimori, T. (2010) *J. Cell Biol.*, **190**, 511–521.
- 61) Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., & Lippincott-Schwartz, J. (2010) *Cell*, **141**, 656–667.
- 62) Nakano, A. & Luini, A. (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 471–478.
- 63) Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., & Fukuda, M. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2916–2925.
- 64) Webber, J.L. & Tooze, S.A. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 1319–1326.
- 65) Liou, W., Geuze, H.J., Geelen, M.J., & Slot, J.W. (1997) *J. Cell Biol.*, **136**, 61–70.
- 66) Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., & Rubinsztein, D.C. (2010) *Nat. Cell Biol.*, **12**, 747–757.