

オートファジーの構造生物学

野田 展 生

オートファジーは真核生物に普遍的に保存された細胞内の基本的分解システムであり、オートファゴソームという二重膜構造体の形成を通して分解対象を隔離し、リソソームへと輸送することで分解を行う。オートファゴソーム形成過程は多くの Atg 因子群が担っているが、個々の因子がどのような分子機能を担うことでオートファゴソーム形成が進行するのか、分子レベルでの理解は遅れている。本稿では Atg 因子群の構造生物学的研究の現状を執筆者の研究を中心に紹介し、構造研究からわかってきたこと、今後明らかにしていかなければならないことを概観する。

1. はじめに

オートファジーは真核生物に普遍的に保存された細胞内の基本的分解システムである^{1,2)}。オートファジーによる分解は、細胞内に存在する物質を分解の場であるリソソーム(酵母や植物では液胞)へと輸送することで行われる。リソソームへの輸送方式の違いによりオートファジーはさらに複数種に分けられるが、そのうちオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体を新生し、オートファゴソームを輸送体として分解対象をリソソームへと輸送するものをマクロオートファジーと呼ぶ。本稿ではマクロオートファジー(以降、単にオートファジー)に関する構造生物学的研究について述べる。

オートファジーによる分解は、オートファゴソームにより包み込まれたものすべてがその対象となりうる。オートファゴソームはタンパク質などの生体高分子に限らず、ミトコンドリアなどのオルガネラや細胞内に侵入した病原菌までも包み込むことから、これらすべてがオートファジーの分解対象となる³⁾。またオートファゴソームによる分解対象の包み込みは、ランダムに起きているのではなく、ある程度の選択性を持つことがわかってきている。

オートファジーは分解対象の多様性とある程度の選択性という二つの特徴を持つことで、細胞内の恒常性維持、さらには細胞内免疫、発生、分化などの多様な生理的機能を担っている^{1,3)}。

オートファゴソームの形成機構は、オートファジーの分野における最大の未解決課題である。出芽酵母を用いた遺伝学的解析により、オートファゴソーム形成を担う18種類の Atg タンパク質が同定され、それらは以下に示す6種類の機能グループ、すなわち①Atg8結合系、②Atg12結合系、③Atg1キナーゼ複合体、④オートファジー特異的ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol: PI)3キナーゼ複合体、⑤Atg2-Atg18複合体、そして⑥膜タンパク質 Atg9に分類されている(図1)^{2,4,5)}。これら六つの機能グループが協同的に機能することで、隔離膜が生じ、伸長し、閉じて二重膜構造体オートファゴソームとなる一連の複雑な膜動態を引き起こすと考えられているが、その分子機構は依然として良くわかっていない。これら Atg 因子群の具体的な分子機能を明らかにするためには、立体構造情報が極めて重要である。本稿ではこれら主要 Atg 因子群およびオートファジーの選択性を担う因子に関する構造生物学的研究の現状を、執筆者の研究を中心に海外のグループが得た知見も含めて紹介する。

2. Atg 結合反応系の構造生物学

オートファゴソーム形成に必須な18種類の Atg 因子のうち、8種類は二つのユビキチン様結合系である Atg8結合系と Atg12結合系を形成している(図1)⁶⁾。Atg12結合

公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所分子構造解析部(〒141-0021 東京都品川区上大崎 3-14-23)

Structural biology of autophagy

Nobuo N. Noda (Laboratory of Molecular Structure, Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, 3-14-23 Kamiosaki, Shinagaku-ku, Tokyo 141-0021, Japan)

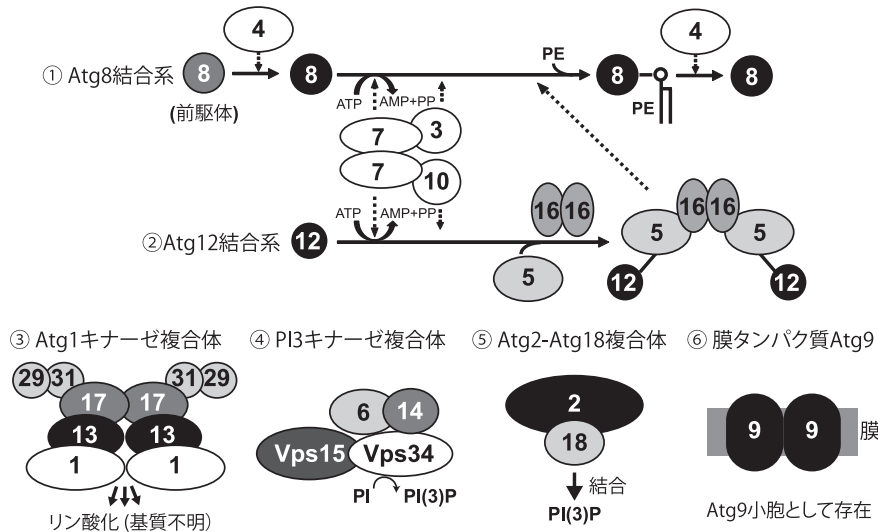


図1 オートファゴソーム形成を担う六つの主要 Atg グループ
数字は Atg の番号を示す。

系では、Atg12はユビキチン活性化酵素 (E1 酵素) Atg7によりATP依存的に活性化され、C末端のグリシンを介してAtg7の触媒システイン残基とチオエステル結合を形成する⁷⁾。続いてAtg12はユビキチン結合酵素 (E2 酵素) Atg10の触媒システイン残基に受け渡される⁸⁾。Atg10はユビキチンリガーゼ (E3 酵素) の助けなしにAtg12とAtg5の間のイソペプチド結合反応を触媒し、形成されたAtg12-Atg5結合体はさらにAtg16と相互作用することでAtg12-Atg5-Atg16複合体を形成する^{9,10)}。一方Atg8結合系では、Atg8はまずAtg4によるプロセッシングを受け、C末端にグリシン残基を露出する¹¹⁾。次にAtg12結合系と共通のE1酵素Atg7により活性化され、C末端グリシンを介してAtg7の触媒システインとチオエステル結合を形成する⁷⁾。続いてAtg8はE2酵素Atg3の触媒システイン残基に受け渡される。Atg3はAtg12-Atg5-Atg16複合体の助けを借りて、Atg8とホスファチジルエタノールアミン (PE) との間のアミド結合を触媒し、Atg8-PE結合体が形成される¹²⁾。Atg12-Atg5-Atg16複合体およびAtg8-PE結合体は伸長中の隔離膜上に局在することで、オートファゴソーム形成あるいは分解対象の選別に重要な役割を果たすと考えられている^{13,14)}。

2.1 Atg8とAtg12の構造的特徴

Atg8とAtg12はユビキチンとの配列相同性がほとんどないが、どちらも4本ないし5本のβストランドからなるβシート一つと2本のαヘリックスからなるユビキチン骨格を持っている (図2)^{15~18)}。Atg12はユビキチン骨格のN末端側に、種によって長さも配列も多様な付加領域を持つが (酵母では約100残基、植物では約10残基)、それらはオートファジー活性に必要なでないことが示されてい

る¹⁹⁾。一方、Atg8はユビキチン骨格のN末端側に、種間で良く保存された約25残基からなるN末端ドメインを持つ。N末端ドメインは2本のαヘリックスからなり、ユビキチン骨格と相互作用することでAtg8は全体として一つの球状構造を形成している¹⁷⁾。Atg12の場合とは対照的に、Atg8のN末端ドメインはオートファジーに必須な役割を担う。Atg8とAtg12の間の配列相同性は低い、ユビキチン骨格部分の構造相同性は極めて高い。また他のユビキチン様タンパク質ではC末端にグリシン-グリシン配列を保存するのに対し、Atg8およびAtg12は芳香族アミノ酸-グリシン配列を保存する。これらの共通した特徴が、同じE1酵素Atg7による活性化を可能にしていると考えられる^{9,12)}。

2.2 Atg4によるAtg8の脱結合反応

Atg4は翻訳直後のAtg8のプロセッシングとAtg8-PE結合体の脱結合反応の両方を担うシステインプロテアーゼである¹¹⁾。ヒトのAtg4オルソログであるAtg4Bはパペインと類似した骨格を持っており、システインプロテアーゼの特徴であるシステイン、ヒスチジン、アスパラギン酸からなる触媒三残基も持っている²⁰⁾。しかしながら、Atg4B単体の結晶構造では、触媒部位は自身のループ領域 (制御ループ) とトリプトファン142番で覆われており、基質が接近しえない、自己阻害構造をとっていた。さらにAtg4BのN末端領域が触媒部位の出口を塞ぐように結合していた (図3A)。この構造ではAtg4Bは切断活性を示さないと予想されたが、実際に翻訳直後のLC3 (Atg8の哺乳類オルソログ) のC末端領域に相当するペプチドはAtg4Bによる切断を受けなかった²⁰⁾。すなわちAtg4Bによる切断を受けるためには、Atg4Bの自己阻害構造を解除する必要がある

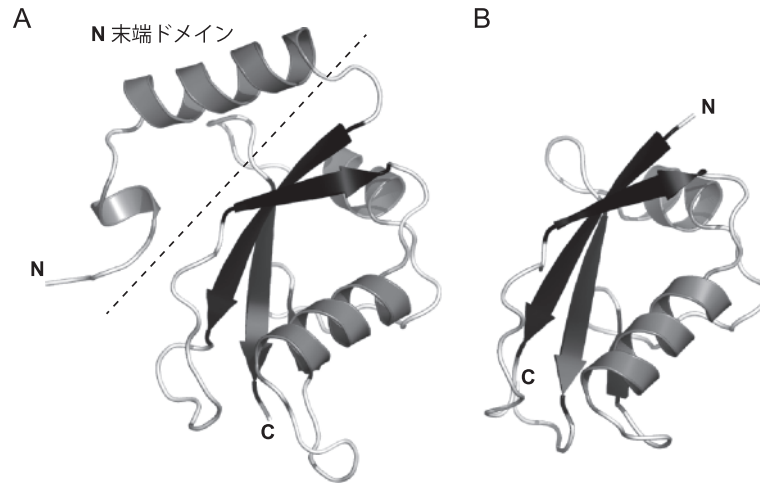


図2 二つの Atg 結合因子の構造
(A) Atg8 の構造 (PDB ID 2ZPN). (B) Atg12 の構造 (PDB ID 1WZ3). N および C は N 末端および C 末端を示す. 本稿のすべての構造図はプログラム PyMOL²¹⁾を用いて作製した.

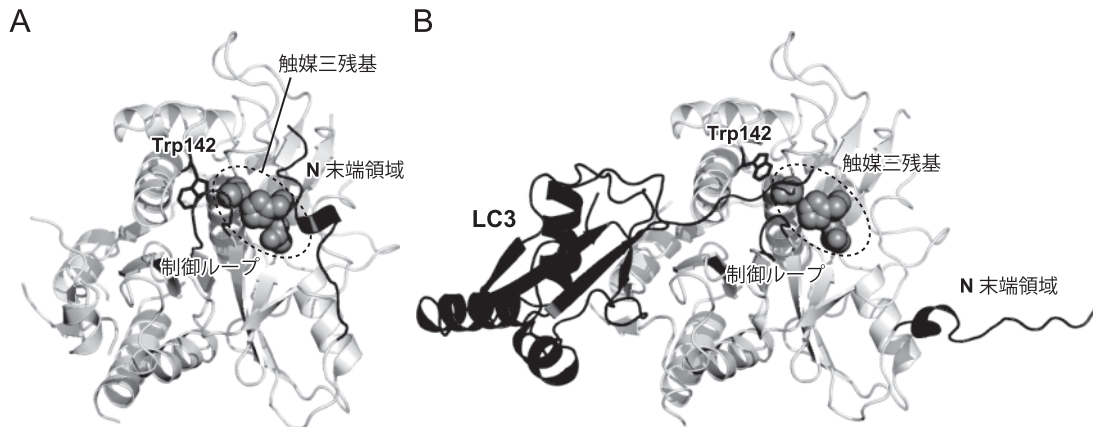


図3 Atg4B の単体および LC3 結合型の構造
(A) Atg4B 単体の構造 (PDB ID 2CY7). (B) LC3 結合型の構造 (PDB ID 2ZZP). 触媒三残基の側鎖を球状モデルで示す.

り, そのためには LC3 がユビキチン骨格部分をも持つ必要があると考えられた. 一方, Atg4B-LC3 複合体の結晶構造では, Atg4B の制御ループおよび N 末端領域どちらも大規模な構造変化を起こしており, 触媒部位は外部に対して開かれた構造をとっていた (図 3B)²¹⁾. LC3 はユビキチン骨格を用いて Atg4B と相互作用するとともに, C 末端にある芳香族アミノ酸-グリシン配列を用いて制御ループを持ち上げることで Atg4B の自己阻害構造を解除し, C 末端グリシン残基を触媒システイン残基近傍に結合させていた. すなわち Atg4B は自己阻害構造をとることで, その自己阻害構造を解除できる構造的な特徴を持つ Atg8 ファミリータンパク質のみに高い切断特異性を発揮すると考えられる. 一方, Atg4B の N 末端領域は単体構造では触媒部位出口の平らな面に結合していたのに対し (閉じた構造), LC3 との複合体ではその面から離れ, 伸びたコンホ

メーションをとって結晶中で隣接する LC3 の疎水性ポケットに結合していた (開いた構造). この相互作用は Atg8 と Atg8 ファミリー相互作用モチーフ (Atg8-family interacting motif: AIM) の間で見られる相互作用と酷似しており (4.1 節参照), 溶液中でも同様の相互作用が起きていることが NMR 法により確認された²¹⁾. 閉じた構造では Atg4B は触媒部位出口を塞がれ, 膜表面に接近することが困難と考えられたため, LC3 の脱 PE 化反応を行うためには N 末端領域が開いた構造をとることが必須と考えられる. すなわち N 末端領域のコンホメーション変化が Atg4B の脱 PE 化活性を制御している可能性が示唆された. オートファジーが進行する上で, Atg4 による Atg8-PE の切断反応は時空間的に制御される必要があると考えられるが, そのメカニズムの詳細はまったくわかっていない. N 末端領域のコンホメーション変化がその制御の一端を

担っている可能性があるが、今後の更なる検証が必要である。

2.3 Atg7による活性化反応

Atg7はAtg8とAtg12の両方を基質とするE1酵素であるが、ユビキチンなどを基質とする一般的E1酵素と比較して多くの特徴を有している。一般的E1はヘテロ二量体もしくは単量体として機能し、①活性のあるアデニル化ドメイン(AD)、②活性のないアデニル化様ドメイン、③触媒システインドメイン、そして④E2結合を担うユビキチンフォールドドメイン(Ubiquitin-fold domain: Ufd)からなっており、触媒システイン残基、ATP結合部位およびE2結合部位をそれぞれ一つずつ持つ²³⁾。一方Atg7はN末端ドメイン(NTD)およびC末端ドメイン(CTD)が短いリンカーでつながれた構造を持ち、CTDの二量体化を通してホモ二量体構造をとる(図4A)²³⁾。CTDは他のE1酵素のADと高い構造相同性を持つが、その最C末端領域(extreme CTD: ECTD)はAtg7に固有の構造である。触媒システイン残基はCTD内のフレキシブルなループ(cross-over loop: CL)上に存在しており、他のE1のような特定のドメイン構造を持たない。一方NTDは他のE1には全く見られない構造と配列を持っている。Atg7はNTDを介してE2酵素であるAtg3およびAtg10を、CTDを介してAtg8およびAtg12を認識する²³⁻²⁵⁾。Atg7はホモ二量体構造をとるため、触媒システイン残基、ATP結合部位およびE2結合部位をそれぞれ二つずつ持つ。

Atg7によるAtg8の認識は、少なくとも二段階を経て行われる(図4B)²³⁾。まずAtg7のECTDにある酸性残基に富んだ天然変性領域でAtg8の塩基性に富んだ面を認識し、「釣り」のようにAtg8を捕捉する。この際イオン性の相互作用に加えて疎水性の相互作用も重要である。続いてAtg8はECTDからADへと受け渡され、Atg7の触媒部位にAtg8のC末端グリシンが結合する。Atg7CTD-Atg8-ATP複合体の結晶構造では、Atg8のC末端グリシンはATPの α リン原子近傍に位置し、アデニル化反応に適した相対配置をとっていた。またAtg7の触媒システイン残基が含まれるCLはAtg8のグリシン残基上方に位置しており、CLの局所的なコンホメーション変化により触媒システイン残基はAtg8のC末端グリシンを攻撃できる位置に存在していた。したがって、Atg8が触媒部位に結合した後は、アデニル化反応およびチオエステル結合反応が大規模な配置換え等を伴わずに進行すると考えられる。Atg7によるAtg12の認識機構は、構造生物学的研究が進んでおらず、現時点で不明である。Atg8の場合と同様に、Atg12もAtg7による二段階認識を受けるのかどうか今後明らかにする必要がある。Atg12のC末端グリシンがAtg7の触媒部位に結合した後の反応は、Atg8の場合と同様に進行すると予想さ

れる。

Atg7とチオエステル結合を形成したAtg8およびAtg12は、それぞれのE2酵素であるAtg3およびAtg10の触媒システイン残基へと受け渡される。Atg3およびAtg10はどちらも β ストランド4番下流のループ領域を用いてAtg7のNTDの β ストランド15番付近に類似の位置関係で結合する(図4C)^{26,27)}。Atg10の場合、この相互作用で分子間の β シートが形成されるが、Atg3の場合はそれが見られず、主に側鎖を介した相互作用になっている。またAtg3の場合、この相互作用に加えてAtg3固有のフレキシブル領域を介したNTDとの相互作用も行われる^{25,28)}。その結果、Atg3はAtg10と比べてAtg7に対してより高い親和性を持つ。Atg7のNTDに結合したAtg3およびAtg10の触媒システイン残基は、同じAtg7分子の触媒システイン残基よりも、ホモ二量体を形成したもう一分子のAtg7の触媒システイン残基に圧倒的に近い配置をとる。このことは、Atg7とチオエステル結合を形成したAtg8およびAtg12が、同じAtg7分子に結合したE2酵素ではなく、ホモ二量体のもう一分子のAtg7に結合したE2酵素へと受け渡される可能性を強く示唆している(前者をシス機構、後者をトランス機構と呼ぶ)。ヘテロ二量体化したAtg7変異体を用いた生化学的解析により、Atg7はトランスの機構でAtg8をAtg3へ、Atg12をAtg10へと受け渡すことが実際に証明された(図4D)^{23,25-27)}。これは他のE1酵素では見られない、Atg7に固有の機構である。

生体内ではAtg7はAtg8をAtg3へ、Atg12をAtg10へと特異的に受け渡すことが、適切な結合体の形成(Atg8-PEおよびAtg12-Atg5)に寄与していると考えられる。しかしながら、*in vitro*の解析ではAtg7はAtg8およびAtg12を任意の組み合わせでAtg3およびAtg10へと受け渡す²⁶⁾。これまでの構造生物学的研究からも、Atg8をAtg3へ、Atg12をAtg10へと特異的に受け渡すメカニズムは説明できていない。生体内で見られる特異性がどのように担保されているのか、今後明らかにしていく必要がある。

2.4 Atg10によるAtg12とAtg5の結合反応

E2酵素Atg10は一般的E2と配列相同性を持たないが、E2全般に保存された4本の β ストランドおよび2本の α ヘリックスからなるE2コア構造を持っている(図5)^{29,30)}。それに加え、一般的E2には見られない2本の β ストランド($\beta 5$, $\beta 6$)を持っている。Atg10は触媒システイン残基を介してAtg12とチオエステル結合を形成した後、E3酵素の助けなしにAtg12をAtg5のリシン残基(出芽酵母の場合はリシン149番)の側鎖へと受け渡す反応を触媒する。耐熱性酵母由来のAtg10を用いたNMR解析により、Atg10は触媒システイン残基近傍のチロシン56番およびアスパラギン114番、そして $\beta 5$ を用いてAtg5を直接認識す

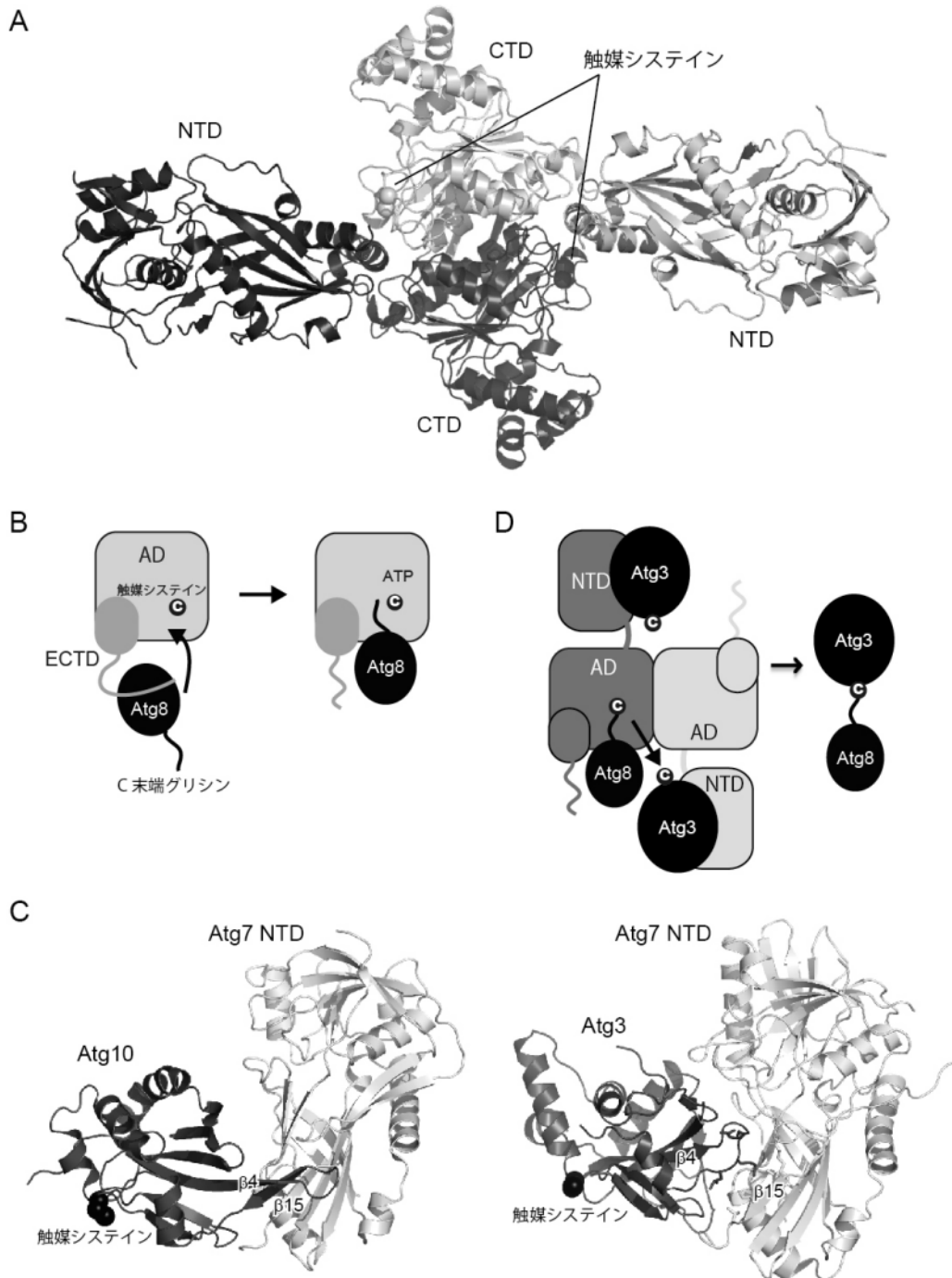


図4 Atg7の構造

(A) Atg7ホモ二量体の結晶構造 (PDB ID 3VH2). (B) Atg7によるAtg8の二段階認識モデル. (C) Atg7によるE2認識. 左は耐熱性酵母Atg7NTD-Atg10複合体 (PDB ID 3VX7), 右は植物Atg7NTD-Atg3複合体 (PDB ID 3VX8)を示す. (D) E2酵素へのトランス転移機構.

ることが明らかとなった²⁹⁾. 生化学的解析の結果, 触媒システイン残基近傍の上記二残基はAtg5との親和性への寄与は低いのにに対し反応速度に多大な寄与を持つこと, 一方 $\beta 5$ 上の残基はその逆で親和性への寄与が大きいことが明らかとなった. またAtg5の残基への変異体解析の結果, Atg5の $\beta 7$ がAtg12との結合反応に重要であることがわ

かった. さらにクロスリンカーを用いた実験で, Atg10の $\beta 5$ とAtg5の $\beta 7$ それぞれにシステイン残基を導入すると, 両者の間で特異的に架橋されることも明らかとなった. 以上の結果から, Atg10は $\beta 5$ を用いてAtg5の $\beta 7$ を認識して結合し, さらにAtg5のリシン残基側鎖を触媒システイン残基近傍の二残基で反応に有利なコンホメーションに固

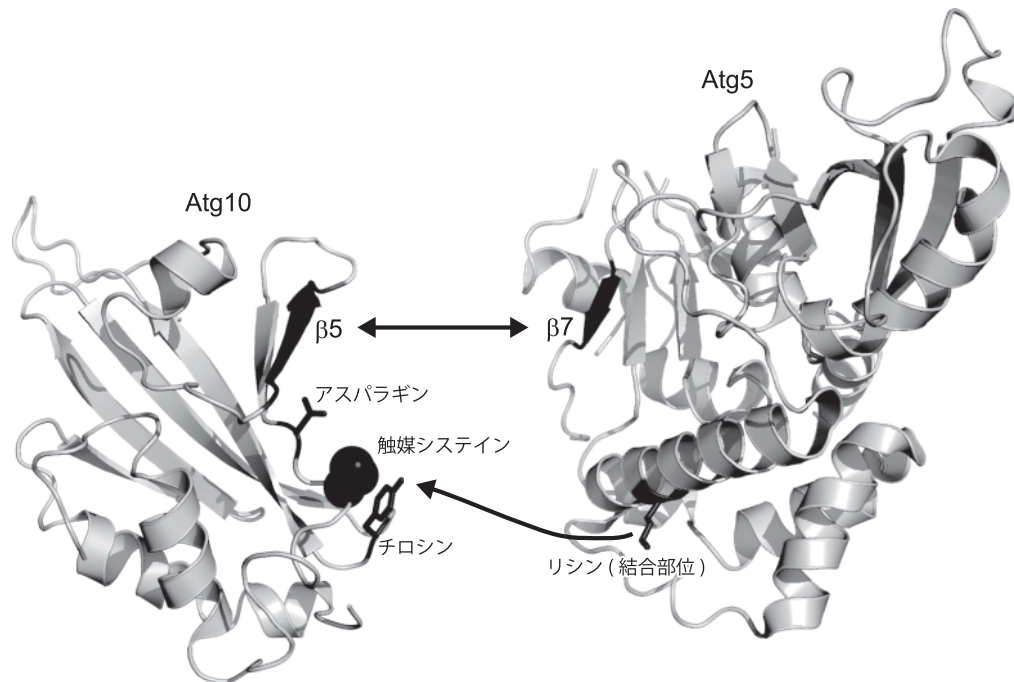


図5 Atg10の構造

左は耐熱性酵母 Atg10 の NMR 構造 (PDB ID 3LPU), 右は耐熱性酵母 Atg5 の結晶構造 (PDB ID 3VQI).

定することで, Atg12-Atg5 結合反応を E3 酵素の助けなしに特異的かつ効率的に触媒すると考えられる。

2.5 Atg3 と Atg12-Atg5-Atg16 複合体による Atg8 と PE の結合反応

E2 酵素 Atg3 も Atg10 と同様, 一般的 E2 と配列相同性を持たないが, E2 全般に保存された 4 本の β ストランドおよび 2 本の α ヘリックスからなる E2 コア構造を持っている (図 6A)²⁸⁾。それに加え, Atg3 には二つの特徴的な挿入領域であるフレキシブル領域 (flexible region: FR) およびハンドル領域 (handle region: HR) が存在する。FR は約 80 アミノ酸からなる領域で, 高度に酸性残基に富んでいる。Atg3 の結晶構造ではそのほとんどの電子密度が観察されず, NMR の結果からも FR は溶液中で天然変性状態で存在することが強く示唆された²⁸⁾。一方 HR は E2 コア領域から突き出した 1 本の α ヘリックスとそれに続くループ領域からなっている。HR 内には典型的な AIM 配列が存在し, それを介して Atg8 を直接認識する³¹⁾。一方 FR は上でも述べたように Atg7 と直接結合する。

一般的な E2 酵素では, 触媒システイン残基近傍にアスパラギン残基が保存されており, 両者は互いに側鎖を向き合っている。この保存されたアスパラギン残基は結合反応において必須の役割を担う³²⁾。一方 Atg3 の場合, 保存されたアスパラギンの位置にはトレオニンが存在し, このトレオニンは Atg3 ホモログの間で高度に保存されている。

この残基をアラニンに置換すると結合活性が完全に失われることから, 他の E2 で保存されたアスパラギンと同等の機能を担うと考えられる。それにも関わらず, 出芽酵母 Atg3 の結晶構造では, 触媒システイン残基はこの保存されたトレオニン残基と反対方向を向いていた (図 6B)³³⁾。すなわち Atg3 の活性部位は低活性のコンホメーションをとっていることが予想された。また Atg3 は Atg8 の結合相手である PE もしくは PE を含有する膜への親和性を持たない。したがって, Atg3 は Atg7 から Atg8 を受け渡されても, 単独では Atg8 を PE へ受け渡す反応を効率的には担えないことが示唆された。実際, *in vitro* の反応系において生体膜の PE 含量に近いリポソームを用いた場合, Atg3 は Atg8-PE 結合反応をほとんど起こさない³⁴⁾。一方, この反応系に Atg12-Atg5 結合体を添加すると反応効率が劇的に上昇する^{35,36)}。さらに酵母細胞内では, Atg12-Atg5 結合体に加えて Atg16 も効率的な Atg8-PE 結合体形成に必要である³⁷⁾。すなわち Atg12-Atg5-Atg16 複合体は Atg8 結合系の E3 様酵素として機能することが明らかとなった。

Atg12-Atg5-Atg16 複合体による Atg8-PE 結合体の形成反応の促進は, 主に二つのメカニズム, すなわち①Atg3 の結合反応活性の上昇と, ②Atg3 の PE 含有膜へのリクルートを介して行われると考えられる。Atg12-Atg5-Atg16 複合体は Atg12 を介して Atg3 と直接結合する^{38~40)}。活性に重要な保存されたトレオニン残基をシステインに置換し, 触媒システイン残基との間でジスルフィド結合が形成される

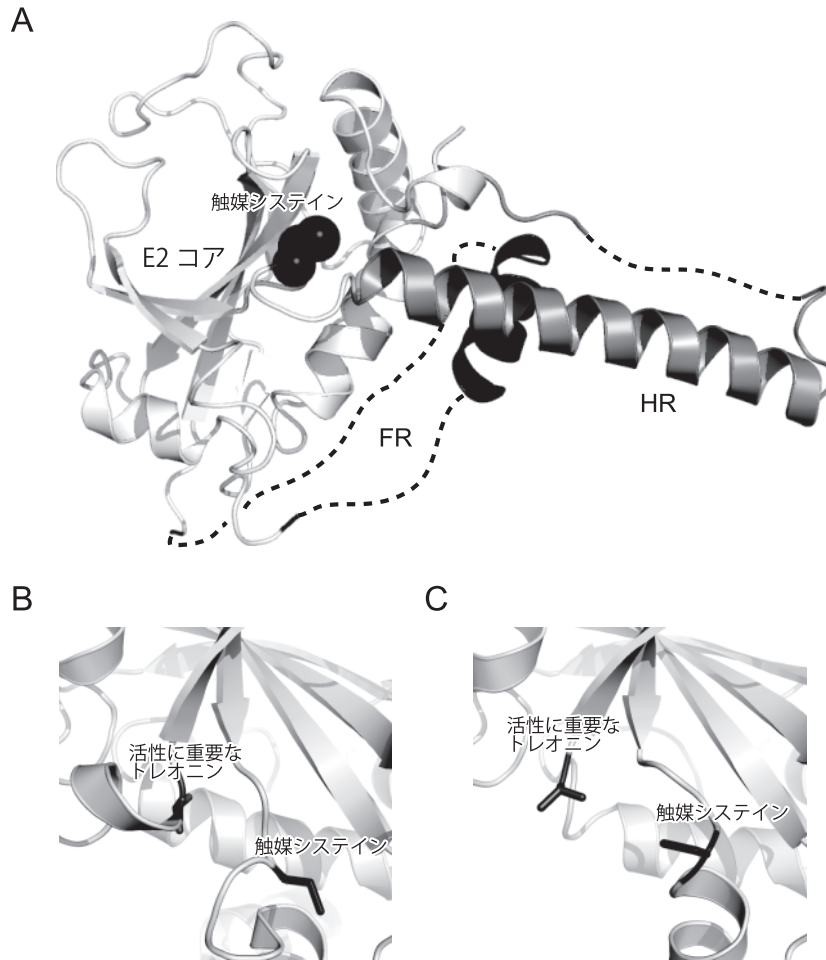


図6 Atg3の構造

(A) Atg3の全体構造 (PDB ID 3DYT). (B) Atg3の触媒部位の構造. (C) アルカリ条件化での植物 Atg3の触媒部位の構造 (PDB ID 3VX8).

かどうかを調べた結果, Atg3単独で存在する場合はジスルフィド結合が形成されないのに対し, Atg12-Atg5結合体を添加すると効率的にジスルフィド結合が形成されるようになった³³⁾. このことは, Atg12-Atg5結合体が Atg3の活性部位の構造変化を誘起し, 触媒システイン残基と保存されたトレオニン残基が互いに向き合うコンホメーションへと導くことを示唆している. 同様のジスルフィド結合の形成は, 結合活性が上昇するアルカリ条件下に Atg3を置くことでも観察された. さらにアルカリ条件下で結晶化された植物 Atg3の結晶構造では, 触媒システイン残基と保存されたトレオニン残基は互いに向き合う構造をとっていた (図6C)³³⁾. 以上のことから, Atg12-Atg5結合体は何らかの機構で Atg3の触媒部位の再構築を誘導し, Atg3の結合活性を上昇させることが明らかとなった.

Atg16は Atg3の結合活性の上昇のためには必要ないが, Atg3の膜へのリクルートにおいて重要な役割を担う⁴⁰⁾. 出芽酵母において, Atg5と Atg16は相互依存的にオートファゴソーム形成の場である前オートファゴソーム構造体

(pre-autophagosomal structure : PAS) へと局在する^{4,41)}. PAS局在のメカニズムは現時点で不明であるが, Atg5-Atg16複合体はPASに存在する何らかのタンパク質もしくは膜成分と結合することでPASに局在すると思われる. 以上の知見をまとめると, Atg12-Atg5-Atg16複合体は Atg12を介して Atg3と, Atg5-Atg16複合体部分を介して膜と相互作用し, Atg3の結合活性の上昇および Atg3の膜近傍へのリクルートを通して Atg8-PE結合体形成反応を促進すると考えられる.

Atg12-Atg5-Atg16複合体の構造研究は, パーツ単位で進められ, これまでに Atg12単体¹⁵⁾, Atg5と Atg16のN末端ドメインの複合体⁴¹⁾, Atg16のコイルドコイル領域⁴²⁾, そして Atg12-Atg5結合体^{38,39)}の結晶構造が明らかにされた. 全長の三者複合体構造は現時点では不明であるが, これらの部分構造を統合すると図7のようなモデルが構築できる. Atg5は二つのユビキチン様ドメインとヘリックスに富むドメインからなり, この三つのドメインが互いに相互作用することで一つの球状構造をとっている. 三つのド

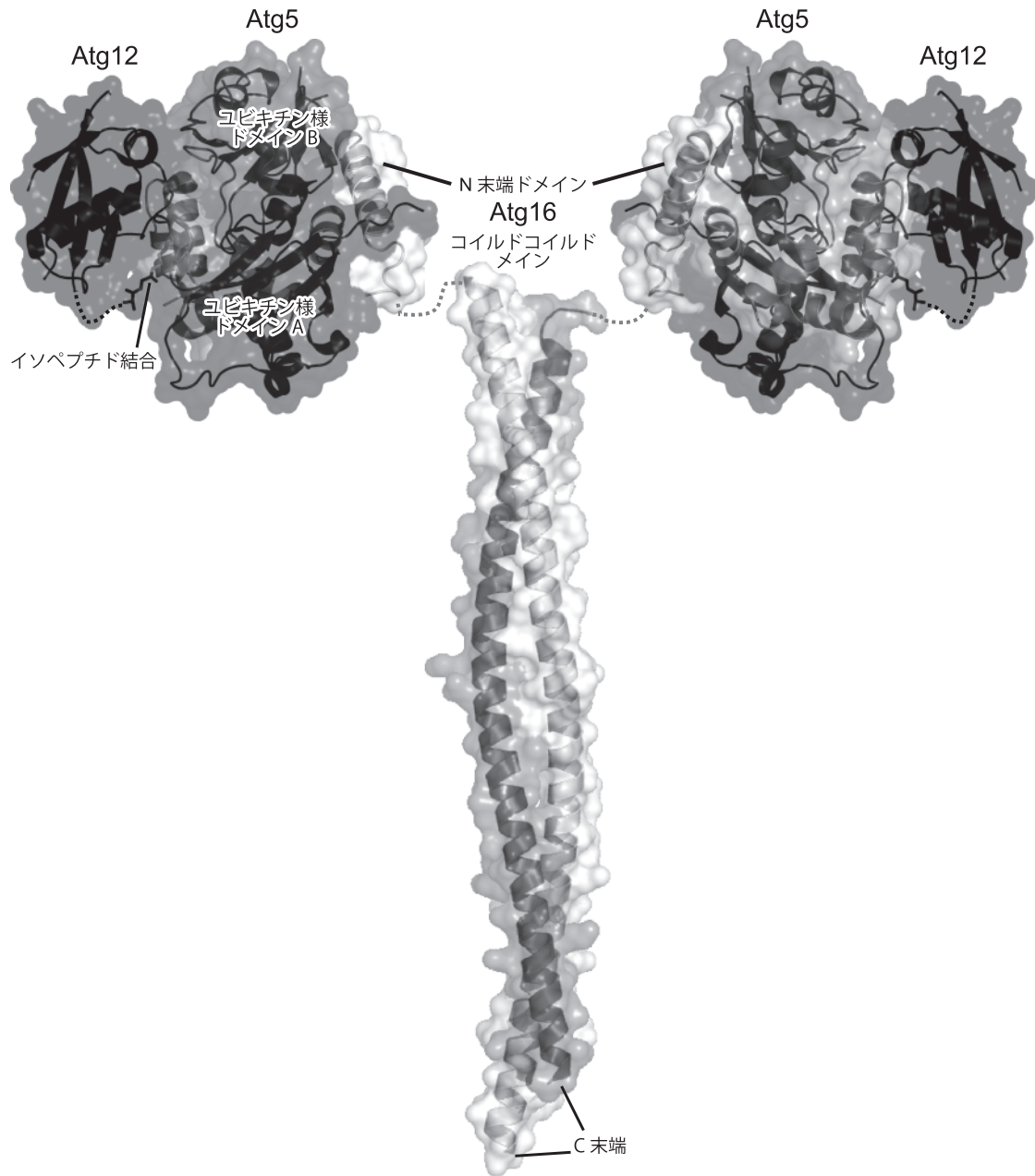


図7 Atg12-Atg5-Atg16 複合体モデル

Atg12-Atg5 結合体と Atg16 の N 末端ドメインの複合体構造 (PDB ID 3W1S) および Atg16 の構造 (PDB ID 3A7P) を組み合わせて作製したモデル。

メイン境界にできた溝に沿って Atg16 の N 末端ドメインが結合する。Atg12 は Atg5 のヘリックスに富むドメインに存在するリシン残基にイソペプチド結合を介して結合するが、それに加えて非共有結合性の相互作用で Atg5 の Atg16 結合面とは真裏の面に結合する。Atg16 は N 末端ドメインとコイルドコイルドメインからなり、両者の間はフレキシブルなリンカーでつながれている。コイルドコイルドメインは並行のホモ二量体を形成するため、結果として Atg12-Atg5-Atg16 複合体は各 2 分子ずつの複合体を形成すると考えられる。この複合体構造は、六つのユビキチン

フォールドを持ち、さらに長く突き出したコイルドコイル構造を持つとてもユニークなものであり、既知の E3 との構造相同性を示さない。このユニークな構造を用いてどのように Atg3 および膜と相互作用し、Atg8-PE 結合体形成反応を促進するのか、今後更なる構造機能解析が求められる。

3. 結合系以外の主要 Atg 因子群の構造生物学

3.1 Atg1 キナーゼ複合体

Atg1 は主要 Atg 因子中唯一のキナーゼであり、オート

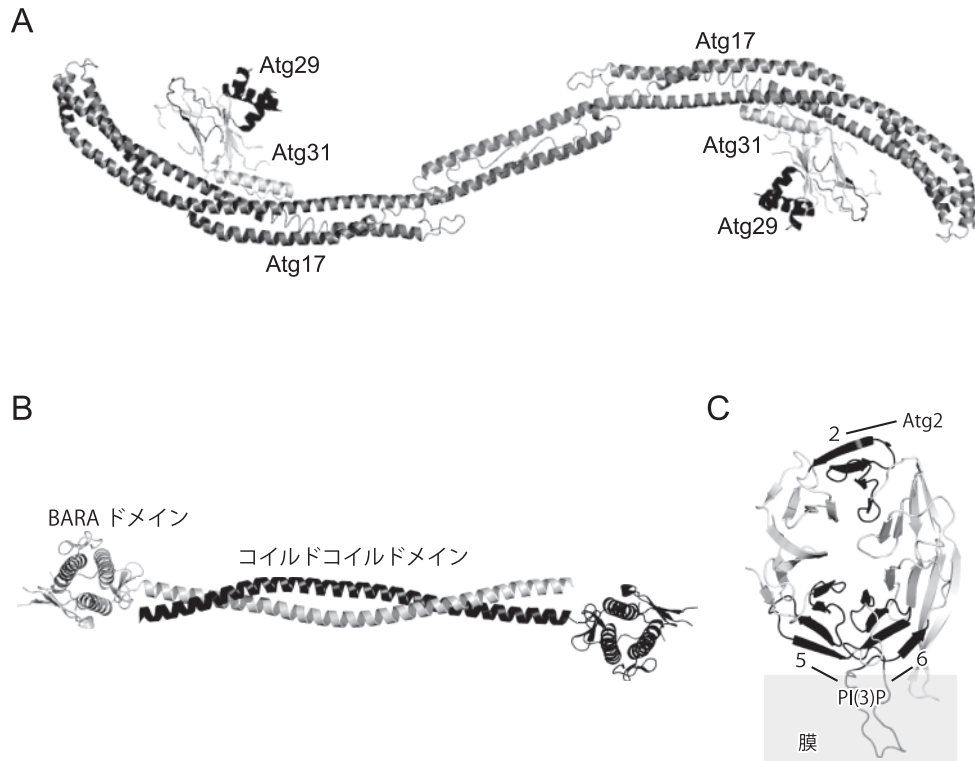


図8 非結合系以外の主要 Atg 因子

(A) Atg17-Atg29-Atg31 複合体の構造 (PDB ID 3HPQ). (B) Atg6/Beclin 1 の構造. Atg6 の BARA ドメインの構造 (PDB ID 3VP7) および Beclin 1 のコイルドコイルドメインの構造 (PDB ID 3Q8T) を組み合わせて作製したモデル. (C) Atg18 パラログの構造 (PDB ID 3VU4). 数字はブレードの番号を示す.

ファジーの始動に中心的役割を担う. Atg1 のキナーゼ活性の制御はその結合因子である Atg13 および Atg17 が担う. Atg13 は富栄養条件下では, 主に TOR キナーゼにより高度にリン酸化された状態で存在し, Atg1 との親和性が低い状態で存在する⁴³. オートファジーが誘導される飢餓条件下になると, TOR キナーゼの活性低下に伴い Atg13 は速やかに脱リン酸化され, Atg1 と結合し, さらに Atg17, Atg29, Atg31 とともに複合体を形成して Atg1-Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 五者複合体を形成する^{43,44}. 複合体形成による Atg1 のキナーゼ活性の上昇がオートファジーに重要であるが, リン酸化の主要ターゲットは現時点でまだ確実には同定されていない. この複合体は PAS の中核として機能し, そこに他の主要 Atg 因子群が集積することで PAS が完成し, オートファゴソーム形成が開始する^{4,45}.

Atg1 キナーゼ複合体の構造生物学的研究はまったく進んでいない状況であったが, 昨年末米国の Hurley 博士のグループが Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造を報告した (図 8A)⁴⁶. Atg17 は 4 本の α ヘリックスからなる弓状の構造をとり, C 末端領域でホモ二量体を形成することで弓状構造の凹面を互いに反対方向に向けた特徴的構造をとる. Atg29 と Atg31 は互いに β ストランドを出しあうことで一つの β シート構造を形成し, Atg31 の C 末端の α ヘ

リックスを介して Atg17 の凹面の中心付近に結合する. Atg17 の弓状構造の曲率が Atg9 小胞の曲率に近いことから, Atg17 のホモ二量体構造は二つの Atg9 小胞を束ねる役割を担うというモデルが提示された. Atg17 の凹面中心には Atg29 および Atg31 が存在することから, この面で膜を認識するためにはこれら 2 因子の配置が変化する必要はある. また Atg17 の膜への親和性は確認できていないなど, このモデルを支持する実験データは現時点で得られていない. Atg17, Atg29, Atg31 各因子の具体的役割は何であるのか, 今後明らかにしていく必要がある. また Atg1 キナーゼ複合体の中心因子である Atg1 については, 構造的知見がまったく得られていない. 我々は最近, Atg1-Atg13 複合体について切り詰めを進めることで良好な結晶を得ることに成功し, 現在構造解析を進めている. 五者複合体の構造基盤が明らかになることで, Atg1 キナーゼ複合体の機能解明に向けた突破口となることを期待している.

3.2 オートファジー特異的 PI3 キナーゼ複合体

出芽酵母では Vps34 が唯一の PI3 キナーゼであり, Vps15, Atg6/Vps30 および Atg14 と四者複合体を形成し, PAS に局在することでオートファジー特異的に機能する⁴⁷. 一方, Atg14 が Vps38 に入れ替わった四者複合体は, 主にエ

ンドソームに局在し、カルボキシペプチダーゼ Y (carboxypeptidase Y: CPY) などの液胞酵素の液胞への輸送に関与する⁴⁷⁾。PI3 キナーゼ複合体は PAS やエンドソームで PI-3 リン酸 [PI(3)P] を産生することで、それぞれの経路に必須な因子の集積を担うと考えられている。PI3 キナーゼ複合体の構造生物学的研究は、まだ始まったばかりであり、各因子のドメイン単位での構造が報告されているだけである。Vps34 は N 末端領域を除いた活性本体について、Vps15 は C 末端に存在する WD40 リピートドメインについて結晶構造が報告されているが^{48,49)}、他の因子との相互作用領域の構造情報が欠落しているため、四者複合体形成においてどのような相互作用が形成されるのか、現時点でまったく不明である。Atg14 については N 末端側に Atg6 および Vps34 との相互作用に関与するコイルドコイルが⁵⁰⁾、C 末端側には膜の曲率を区別する両親媒性のヘリックスが予想されているが⁵¹⁾、実験による構造決定はまだ行われていない。しかし四つ目のコンポーネントである Atg6 については最近我々および他のグループによる構造研究によりその構造基盤が明らかとなってきた。

Atg6 は N 末端ドメイン、コイルドコイルドメインおよび C 末端ドメインの三つのドメインからなっている。C 末端ドメインについては酵母 Atg6 および哺乳類の Atg6 ホモログである Beclin 1 に関して、コイルドコイルドメインについては Beclin 1 に関して結晶構造が報告された (図 8B)⁵²⁻⁵⁴⁾。N 末端ドメインの構造は未知であるが、オートファジーには必須でないことが示されている⁵⁴⁾。Beclin 1 のコイルドコイルドメインは長い 1 本の α ヘリックス構造をとり、二分子間で逆平行のコイルドコイルを形成している。Beclin 1 はコイルドコイルドメインを介して Atg14 および Vps38 (哺乳類では UVRAG) のコイルドコイル領域に結合するが、その際 Beclin 1 のホモ二量体構造が壊れ、Atg14 あるいは Vps38 との間にヘテロ二量体が形成される⁵²⁾。Beclin 1 のホモ二量体に見られるコイルドコイルの相互作用は不完全であり、より理想的な相互作用が可能な Atg14 あるいは UVRAG とのヘテロ二量体形成の方が有利に進行すると考えられる。Atg6/Beclin 1 の C 末端ドメインは、3 本の β ストランドからなる β シートおよび 1 本の α ヘリックスを一つの構造単位として、それが 3 回繰り返され、疑似 3 回軸対称を持つ一つの球状構造を形成している。この特徴的なドメイン構造 [我々は alpha-beta repeated, autophagy-specific (BARA) ドメインと命名] は、四者複合体の形成には不要であるが、四者複合体が PAS に局在し、オートファジーの進行に働くためには必要である⁵⁴⁾。一方で、PI3 キナーゼ複合体のもう一つの機能である CPY の液胞輸送の経路には不要である。PI3 キナーゼ複合体が PAS 局在するためには、Atg14 が必須であることがわかっている⁵⁰⁾。Atg6 の BARA ドメインが、Atg14 と

協力してどのような機構で PAS 局在を果たしているのか、現時点ではよくわかっていない。Beclin 1 の BARA ドメインのループ領域には、脂質結合能を持つ“芳香族フィンガー”と名付けられた配列が存在する⁵³⁾。PI3 キナーゼ複合体がオートファジーに働くためには、この配列が重要であることが示され、BARA ドメインの機能を知るうえで一つの手がかりとも考えられたが、酵母 Atg6 にはその配列が保存されていない。PI3 キナーゼ複合体の分子機能を明らかにしていくためには、四者複合体の構造基盤を明らかにすることが必要である。

3.3 Atg2-Atg18 複合体

Atg18 は PI(3)P および PI-3,5-二リン酸 [PI(3,5)P₂] に結合能を有し、PI(3)P との結合を介して PAS に局在しオートファジーに働く一方で、PI(3,5)P₂ との結合を介して液胞膜に局在し、液胞形態の制御に働く^{55,56)}。Atg18 が PAS に局在するためには、PI(3)P との結合だけでは不十分であり、Atg2 も複合体を形成する必要がある⁵⁵⁾。同様に Atg2 も PAS 局在に Atg18 を必要とする。Atg2-Atg18 複合体は PAS に局在したのち、伸長中の隔離膜の先端へと移行し、隔離膜の伸長において実働部隊として働くと考えられているが⁵⁷⁾、その具体的機能はまったくわかっていない。Atg2 は分子量約 20 万の巨大タンパク質であるが、その構造基盤は不明である。しかし Atg18 についてはそのパラログである Hsv2 の構造が我々を含めた 3 グループによりほぼ同時期に決定された⁵⁸⁻⁶⁰⁾。

Hsv2 は WD40 モチーフからなるブレードが 7 回繰り返され、閉じて一つの β プロペラ構造をとる (図 8C)。七つのブレードのうち、ブレード 5 と 6 には塩基性のポケットが一つずつ存在する。興味深いことに、これら二つのポケットはそれぞれが独立にリン酸化イノシチドへの結合能を有していた^{58,59)}。Atg18 の一方のポケットのみに変異を入れてもオートファジー活性が低下することから、両方のポケットで脂質に結合することが、オートファジーの進行に重要と考えられる。二つのポケットの間には長いループ領域があり、その中の芳香族残基も膜との結合に重要である⁵⁸⁾。これらの結果から、Atg18 は膜に対して環状構造を垂直に立てるようにして結合すると予想された。一方、Atg2 は膜結合面とは正反対のブレード 2 に結合する⁶⁰⁾。このことは、Atg18 の PAS 局在に Atg2 を必要としていることや⁴⁾、哺乳類の Atg2 の場合、膜との直接的な結合を担う領域が存在することなど⁶¹⁾、従来の知見と一見矛盾するように思われる。しかし Atg2 は巨大なタンパク質であることから、ブレード 2 に結合した状態で同時に膜や膜上の他のタンパク質と相互作用することも十分可能であろう。Atg2-Atg18 複合体がなぜ PAS 特異的な局在を示すのか、そして膜伸長においてどのような分子機能を担うのか、

Atg2の構造基盤の確立が求められる。

4. 選択的オートファジーの構造生物学

オートファジーによる分解対象（積荷）の選別は、オートファゴソーム形成時に行われる。伸長中の隔離膜の凹面に結合するものは、自動的にオートファゴソーム内へと取り込まれることになる。したがって、隔離膜の凹面に存在する因子が積荷を選択的に認識する受容体として機能すると考えられる。隔離膜の凹面に存在することがわかっている膜結合タンパク質は、現時点でAtg8-PE結合体のみであり¹³⁾、実際にAtg8-PE結合体が積荷選択の受容体として機能することが明らかとなってきた^{62,63)}。しかしAtg8が直接様々な積荷を認識するのではなく、それぞれの積荷に特異的なアダプターを介して積荷認識を行うというモデルが確立しつつある^{62,63)}。

4.1 Atg8による普遍的ターゲット認識機構

Atg8は2.1節で述べたように、ユビキチン骨格とAtg8に固有のN末端ドメインからなる構造を持つ。その結果、N末端ドメインとユビキチン骨格の $\beta 2$ との間にAtg8に固有の深い疎水性ポケット（Wサイト）を持つ⁶²⁾。またAtg8のユビキチン骨格の $\beta 2$ と $\alpha 3$ の間にも疎水性ポケット（Lサイト）が存在する。一方、Atg8はユビキチン骨格のC末端にあるフレキシブルな領域でPEと結合し、膜につながる。結果として、Atg8-PE結合体は二つの疎水性ポケットおよびその間の $\beta 2$ を膜の上で呈示することになる。Atg8はその特徴的な構造を用いて、芳香族アミノ酸-X-X-分枝鎖アミノ酸（Xは任意のアミノ酸）という配列を認識する（図9A）⁶²⁻⁶⁴⁾。具体的には、① $\beta 2$ を用いた分子間 β シートの形成、②Wサイトによる芳香族アミノ酸側

鎖の認識、そして③Lサイトによる分枝鎖アミノ酸側鎖の認識である。芳香族アミノ酸-X-X-分枝鎖アミノ酸という配列は多くのAtg8結合タンパク質中に見いだされ、実際にAtg8との結合を担うこと、結合様式も保存されていることが明らかとなり、我々はAtg8ファミリー相互作用モチーフ（AIM）と命名した⁶²⁾。哺乳類ではLC3 interacting region（LIR）という呼び名が定着している⁶⁵⁾。オートファジーの選択的積荷自体がAIM配列を持つ場合もあるが、AIMは頻繁に積荷を特異的に認識するアダプター因子内に見いだされており、アダプター因子はAIMを介してAtg8-PEと、別の領域で特定の積荷と結合することで、特定の積荷の選択的なオートファゴソーム内への取り込みを担っている。Atg8によるAIMの認識機構はほぼ確立したが、その制御についてはまだ不明な点が多い。最近、アダプター因子の一つであるオプチニューリンのAIM配列（具体的には芳香族アミノ酸のN末端側にあるセリン）のリン酸化が、AIMとAtg8との間の相互作用を制御し、その結果、病原性細菌の選択的オートファジーを制御することが報告された⁶⁶⁾。AIM配列はセリン/トレオニンを含むものが多いことから、リン酸化がAIMの結合制御に広く使われている可能性があり、興味深い。

4.2 アダプター因子による特異的積荷認識機構

Atg8によるアダプター因子の認識は、AIMを介した普遍性の高い相互作用であるが、一方でアダプター因子による個々の積荷認識は、特異性を担保するため、その相互作用様式は多様であることが予想される。我々は液胞酵素の選択的オートファジーにおいてアダプター因子として機能するAtg19およびAtg34について構造機能解析を進め、これら二つの因子が共通して免疫グロブリン様ド

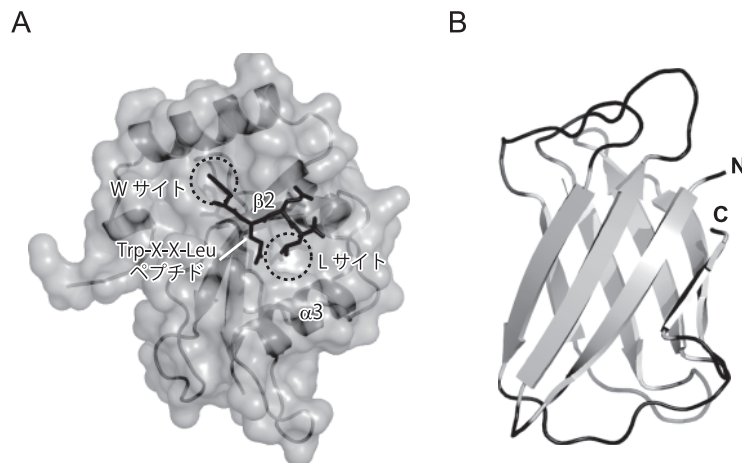


図9 選択的オートファジーの構造基盤

(A) Atg8によるAIMの認識機構（PDB ID 2ZPN）。Atg8に結合したTrp-X-X-Leuペプチドを棒モデルで示す。(B) Atg19の α マンノシダーゼ結合ドメインの構造（PDB ID 2KZB）。

メインを持つこと、そのドメインを介して α マンノシダーゼを特異的に認識することを見いだした(図9B)^{67,68)}。酵母におけるミトコンドリアの選択的オートファジーでは、Atg32がアダプターとして機能する。Atg32はAIMを介してAtg8と結合し、自身の膜貫通領域を介してミトコンドリア外膜に刺さることで、ミトコンドリアを選択的にオートファゴソーム内に導いていると考えられる^{69,70)}。アダプター因子による特異的な積荷認識に関する構造研究はまだ始まったばかりであり、構造情報の蓄積により積荷認識の普遍性と多様性、さらには積荷認識の制御機構に関する知見が得られることが期待される。

5. おわりに

オートファゴソーム形成を担う主要Atg因子の構造研究には大幅な進展が見られ、構造未知の因子の方が少なくなってきた。しかしオートファジーにおける膜動態は絶望的に複雑であり、個々のAtg因子がその立体構造を用いて膜動態に対して何を担うのか、具体的な分子機能が一向に見えてこない。オートファジーの膜動態の理解にブレークスルーをもたらすには、*in vitro*で単純化した状態でオートファゴソーム形成過程を再構成することが不可欠であろう。*in vitro*再構成系とAtg因子の構造情報を組み合わせることで、個々のAtg因子の具体的な分子機能の解明が劇的に進み、オートファゴソーム形成過程の全貌が分子レベルで解明される日が来ることを期待している。

謝辞

本稿は筆者が北海道大学在籍時から現在に至るまでの10年以上にわたる研究成果を中心にまとめたものです。これまで多大なご指導、ご助言をいただきました稲垣冬彦先生および大隅良典先生に深く感謝申し上げます。また稲垣研究室、大隅研究室、そして現所属において共同研究や様々なディスカッションをしていただきました多くの方々にも感謝いたします。

文 献

- Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011) *Cell*, **147**, 728–741.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 107–132.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., & Klionsky, D.J. (2008) *Nature*, **451**, 1069–1075.
- Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007) *Genes Cells*, **12**, 209–218.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 458–467.
- Ohsumi, Y. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 211–216.
- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., & Kominami, E. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1367–1379.
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999) *EMBO J.*, **18**, 5234–5241.
- 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.
- Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999) *EMBO J.*, **18**, 3888–3896.
- 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.
- 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., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 435–446.
- 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.
- Suzuki, N.N., Yoshimoto, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2005) *Autophagy*, **1**, 119–126.
- Noda, N.N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2009) *Chem. Rev.*, **109**, 1587–1598.
- Sugawara, K., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2004) *Genes Cells*, **9**, 611–618.
- Kumeta, H., Watanabe, M., Nakatogawa, H., Yamaguchi, M., Ogura, K., Adachi, W., Fujioka, Y., Noda, N.N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010) *J. Biomol. NMR*, **47**, 237–241.
- Hanada, T. & Ohsumi, Y. (2005) *Autophagy*, **1**, 110–118.
- Sugawara, K., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40058–40065.
- Satoo, K., Noda, N.N., Kumeta, H., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2009) *EMBO J.*, **28**, 1341–1350.
- Schulman, B.A. & Harper, J.W. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 319–331.
- Noda, N.N., Satoo, K., Fujioka, Y., Kumeta, H., Ogura, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2011) *Mol. Cell*, **44**, 462–475.
- Hong, S.B., Kim, B.W., Lee, K.E., Kim, S.W., Jeon, H., Kim, J., & Song, H.K. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 1323–1330.
- Taherbhoy, A.M., Tait, S.W., Kaiser, S.E., Williams, A.H., Deng, A., Nourse, A., Hammel, M., Kurinov, I., Rock, C.O., Green, D.R., & Schulman, B.A. (2011) *Mol. Cell*, **44**, 451–461.
- Yamaguchi, M., Matoba, K., Sawada, R., Fujioka, Y., Nakatogawa, H., Yamamoto, H., Kobashigawa, Y., Hoshida, H., Akada, R., Ohsumi, Y., Noda, N.N., & Inagaki, F. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1250–1256.
- Kaiser, S.E., Mao, K., Taherbhoy, A.M., Yu, S., Olszewski, J. L., Duda, D.M., Kurinov, I., Deng, A., Fenn, T.D., Klionsky, D.J., & Schulman, B.A. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1242–1249.
- Yamada, Y., Suzuki, N.N., Hanada, T., Ichimura, Y., Kumeta, H., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 8036–8043.
- Yamaguchi, M., Noda, N.N., Yamamoto, H., Shima, T., Kumeta, H., Kobashigawa, Y., Akada, R., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2012) *Structure*, **20**, 1244–1254.

- 30) Hong, S.B., Kim, B.W., Kim, J.H., & Song, H.K. (2012) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **68**, 1409–1417.
- 31) Yamaguchi, M., Noda, N.N., Nakatogawa, H., Kumeta, H., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 29599–29607.
- 32) Wu, P.Y., Hanlon, M., Eddins, M., Tsui, C., Rogers, R.S., Jensen, J.P., Matunis, M.J., Weissman, A.M., Wolberger, C., & Pickart, C.M. (2003) *EMBO J.*, **22**, 5241–5250.
- 33) Sakoh-Nakatogawa, M., Matoba, K., Asai, E., Kirisako, H., Ishii, J., Noda, N.N., Inagaki, F., Nakatogawa, H., & Ohsumi, Y. (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 433–439.
- 34) Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40584–40592.
- 35) Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., & Ohsumi, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 37298–37302.
- 36) Fujioka, Y., Noda, N.N., Fujii, K., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 1921–1928.
- 37) Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001) *EMBO J.*, **20**, 5971–5981.
- 38) Noda, N.N., Fujioka, Y., Hanada, T., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2013) *EMBO Rep.*, **14**, 206–211.
- 39) Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G., & Otomo, T. (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 59–66.
- 40) Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2092–2100.
- 41) Matsushita, M., Suzuki, N.N., Obara, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 6763–6772.
- 42) Fujioka, Y., Noda, N.N., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 1508–1515.
- 43) Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000) *J. Cell Biol.*, **150**, 1507–1513.
- 44) Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2039–2050.
- 45) Suzuki, K. & Ohsumi, Y. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 1280–1286.
- 46) Ragusa, M.J., Stanley, R.E., & Hurley, J.H. (2012) *Cell*, **151**, 1501–1512.
- 47) Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 519–530.
- 48) Miller, S., Tavshanjian, B., Oleksy, A., Perisic, O., Houseman, B.T., Shokat, K.M., & Williams, R.L. (2010) *Science*, **327**, 1638–1642.
- 49) Heenan, E.J., Vanhooke, J.L., Temple, B.R., Betts, L., Sondek, J.E., & Dohlman, H.G. (2009) *Biochemistry (Mosc.)*, **48**, 6390–6401.
- 50) Obara, K., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1527–1539.
- 51) Fan, W., Nassiri, A., & Zhong, Q. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 7769–7774.
- 52) Li, X., He, L., Che, K.H., Funderburk, S.F., Pan, L., Pan, N., Zhang, M., Yue, Z., & Zhao, Y. (2012) *Nat. Commun.*, **3**, 662.
- 53) Huang, W., Choi, W., Hu, W., Mi, N., Guo, Q., Ma, M., Liu, M., Tian, Y., Lu, P., Wang, F.L., Deng, H., Liu, L., Gao, N., Yu, L., & Shi, Y. (2012) *Cell Res.*, **22**, 473–489.
- 54) Noda, N.N., Kobayashi, T., Adachi, W., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 16256–16266.
- 55) Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., & Ohsumi, Y. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 23972–23980.
- 56) 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.
- 57) Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., Yamamoto, H., & Ohsumi, Y. (2013) *J. Cell Sci.*, **126**, 2534–2544.
- 58) Baskaran, S., Ragusa, M.J., Boura, E., & Hurley, J.H. (2012) *Mol. Cell*, **47**, 339–348.
- 59) Krick, R., Busse, R.A., Scacioc, A., Stephan, M., Janshoff, A., Thumm, M., & Kuhnle, K. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2042–2049.
- 60) Watanabe, Y., Kobayashi, T., Yamamoto, H., Hoshida, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., & Noda, N.N. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 31681–31690.
- 61) Velikkakath, A.K., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., & Mizushima, N. (2012) *Mol. Biol. Cell*, **23**, 896–909.
- 62) Noda, N.N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 1379–1385.
- 63) Johansen, T. & Lamark, T. (2011) *Autophagy*, **7**, 279–296.
- 64) Noda, N.N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2008) *Genes Cells*, **13**, 1211–1218.
- 65) Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., & Johansen, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 24131–24145.
- 66) Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., Dotsch, V., Bumann, D., & Dikic, I. (2011) *Science*, **333**, 228–233.
- 67) Watanabe, Y., Noda, N.N., Kumeta, H., Suzuki, K., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 30026–30033.
- 68) Suzuki, K., Kondo, C., Morimoto, M., & Ohsumi, Y. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 30019–30025.
- 69) Kondo-Okamoto, N., Noda, N.N., Suzuki, S.W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., Hashimoto, A., Inagaki, F., Ohsumi, Y., & Okamoto, K. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 10631–10638.
- 70) Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 87–97.
- 71) DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA.