

オートファジーにおける二つのユビキチン様結合システムの役割と作動機構

中戸川 仁

オートファジーは、細胞が備える自己分解経路であり、分解対象は二重膜胞“オートファゴソーム”で隔離され、リソソームあるいは液胞へ運ばれる。オートファゴソームの形成は、Atg8とAtg12、二つのユビキチン様タンパク質を必要とする。Atg8は脂質分子ホスファチジルエタノールアミン(PE)と結合し、形成途上のオートファゴソーム膜上で、膜形成の駆動に加え、分解対象のオートファゴソームへの取り込み等、複数の役割を担う。一方、Atg12は、Atg5との結合体としてAtg8の結合反応のE3酵素として機能し、Atg8-PEの形成の場を規定する。さらに、Atg8の働きはAtg8-PEを切断する脱結合酵素Atg4にも支えられている。本稿では、これらユニークなタンパク質たちにフォーカスしながら、オートファゴソーム形成機構に関するこれまでの知見を紹介し、未解決の問題について議論する。

1. はじめに

オートファジーとは、酵母からヒトまで、真核生物に共通して備わる細胞内の大規模な分解・リサイクルシステムである。オートファジーが誘導されると、膜小胞を押しつぶしたような扁平状の膜構造が細胞質で形成され、これが伸張し、球状となって閉じ、二重の膜(2枚の脂質二重層)で分解すべきものを隔離したオートファゴソームが完成する(図1)。続いて、動物細胞であればリソソーム、酵母や植物であれば液胞といった種々の加水分解酵素を含む細胞小器官(オルガネラ)とオートファゴソームの外膜が融合し、内膜ごと内容物が分解される。オートファゴソームは、ミトコンドリアや小胞体等のオルガネラを含めたさまざまな細胞質成分を隔離し、リソソーム/液胞に運び込む。したがって、原理的には、タンパク質だけでなく、核酸、脂質、糖鎖等、あらゆる生体高分子がオートファジーによる分解の対象となる。オートファジーという現象は、1960年代から電子顕微鏡下に見いだされていたが、その生理的役割や分子機構等、長らく研究は進展しなかった¹⁾。

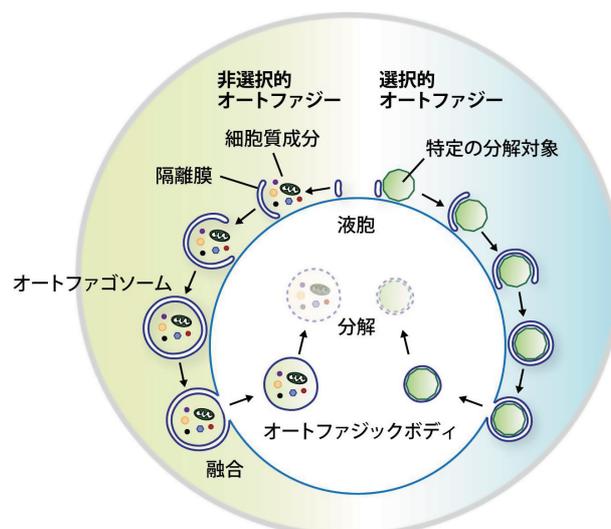


図1 オートファジーの進行過程
出芽酵母におけるオートファジーの模式図。オートファジーが誘導されると、オートファゴソームが分解対象を非選択的あるいは選択的に隔離し、液胞に輸送する。

オートファジーに必要な遺伝子が同定されなかったためである。1990年代に入り、大隅良典教授のグループが、出芽酵母でもオートファジーが起こることを発見した²⁾。オートファジー欠損変異株の取得、原因遺伝子の特定と一挙に進み、多くのオートファジー関連遺伝子(ATG遺伝子)が同定された³⁾。これが今日の生命科学・医学研究のブームの一つともいえるオートファジー研究の発展の端緒となった。2004年、筆者が博士研究員として大隅研究室のドアをたたいたときには、Atgタンパク質がいくつかの

東京工業大学フロンティア研究機構(〒226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259-S2-12)

Roles and action mechanisms of two ubiquitin-like conjugation systems in autophagy

Hitoshi Nakatogawa (Frontier Research Center, Tokyo Institute of Technology, 4259-S2-12 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8503, Japan)

本総説は2013年度奨励賞を受賞した。

機能グループを構成していること、それらが液胞近傍で共局在し、協調的に働いてオートファゴソームの形成を媒介していることなどが明らかとなってきた。しかしながら、まだ多くの Atg タンパク質の具体的分子機能は不明であった。本稿では、その中から、筆者が研究対象としてきた二つのユビキチン様タンパク質結合系について、(奨励賞受賞総説ということで筆者の研究成果を中心にさせていただきながら)我々の理解の現状を概説する。

2. 非選択的オートファジーと選択的オートファジー

オートファジーは、オートファゴソームで分解対象を隔離する際の様式に応じて、非選択的オートファジーと選択的オートファジーの二つに大別される(図1)。非選択的オートファジーは、栄養飢餓条件で強く誘導され、オルガネラも含む細胞質の一部が無作為にオートファゴソームで隔離され、リソソーム/液胞に運ばれる。この場合、細胞が飢餓条件に対応するための栄養素を分解産物として供給することが分解の一義的な意義となる。一方、神経変性疾患の病因ともなりうる変性タンパク質の凝集体や損傷したミトコンドリア、代謝環境の変化により不要となったペロキシソームなどが細胞内に生じた場合、また、哺乳動物では、細胞内に細菌が侵入してきた場合には、オートファゴソームはこれらを選択的に隔離し、分解に導く^{4,5)}。この場合、有害物あるいは不要物の除去が分解の意義となる。オートファジーは長らく、飢餓応答のための非選択的な分解系と認識されてきたが、研究が進むにつれて、オートファジーで選択的に分解されるタンパク質、オルガネラ、細菌、ウイルス粒子等の報告が次々となされ、その数は現在も増加の一途をたどっている。こうした分解対象の多様性を反映して、オートファジーはさまざまな細胞機能や個体レベルでの生命現象にも深く関与しており、また、その破綻が種々の疾患の発症とも密接に関連することが明らかとなりつつある^{6,7)}。

非選択的経路、選択的経路の両者に共通の問題として、オートファゴソームの膜はどのようにして形成されるのか、といった問題があげられる。オートファゴソームは、小さなカップ状の膜構造(隔離膜と呼ばれる)が連続的に伸展し、(非選択的オートファジーの場合)直径0.5~1 μmほどの球状体となって閉じる(図1)。この間、時間にして約10分。実にユニークかつダイナミックな過程である。顕微鏡下で認識される最も初期のオートファゴソーム関連膜は小さな隔離膜だが、これも何らかの膜を基に作られるに違いない。そのような“前駆体膜”はどのようなものであるか? それはどのようにして作られるのか? 膜はどのようにして伸張するのか? その際の膜の供給源は何であるか?(特に非選択的オートファジーの場合、)オートファゴソームの大きさはどのようにして決まるのか? 球状となった後、膜はどのようにして閉じるのか? こうしたごく基本的な問題が未解明のまま残されている。

一方、選択的オートファジーに特有の問題としては、各分解標的がどのようにしてオートファジーのマシーナリーに識別されるのか、といった問題があげられる。最近の研究からその基本的なメカニズムが急速に明らかになってきた(後述)。また、選択的オートファジーの標的には、ミトコンドリア等、通常時には細胞にとって重要な役割を果たしているものもある。したがって、分解すべきときのみ分解すべく、標的の選別には厳密な制御が必要となる。こうした点についても研究が進んできており、多様なメカニズムで標的認識の段階が制御を受けていることがわかってきている。

3. オートファジーを支える Atg タンパク質群

上述のように、オートファジーの分子機構の研究は、筆者が所属している大隅良典教授のグループが、筆者が加わる10年ほど前に、14の ATG 遺伝子/Atg タンパク質を同定したことに端を発した。その後の研究で発見されたものを追加すると、Atg タンパク質は現在38を数えるに至っている。これらは大きく二つにわけて理解することができる(図2)。一つは、どのタイプのオートファジーにも共通して必要とされる、オートファゴソームの膜形成を駆動する因子群であり、コア Atg タンパク質あるいはコアマシーナリーと呼ばれる(しばしば飢餓誘導性オートファジーに特異的な Atg17, Atg29, Atg31 を含める場合があるが、ここではすべてのタイプのオートファジーに必要な16因子とした。大隅教授のグループが最初に同定した14因子はすべてこれに属する。コアマシーナリーのほぼすべてが一挙に同定されたことになる)。コア Atg タンパク質は、高等動植物にもホモログが存在しており、オートファゴソーム形成の基本メカニズムは進化的に保存されていると考えられる⁸⁾。もう一つは、特定のタイプのオートファジーにのみ必要とされる因子である。(飢餓で誘導される)非選択的オートファジーにのみ必要とされるもの、選択的オートファジーにのみ必要とされるもの、また、その中には分解標的ごとに特異的な因子も存在する。そしてオートファジーのメカニズムは、大まかには、これら特異的な因子がコアマシーナリーの活性や局在をコントロールすることにより、いつ、何を、どれくらい、オートファゴソームで隔離するかを決定する、というように捉えることができる。コア因子とは対照的に、各経路に特異的な因子はほかの生物種にホモログが見つからないことが多い。高等真核生物でのオートファジーにのみ必要な因子(酵母にはない因子)も存在するようである。進化の過程で、膜形成をつかさどるコアマシーナリーがまず備わり、その後、各生物種でのニーズに合わせて各経路特異的な因子が獲得されたのであろう。

コア Atg タンパク質は、六つの機能ユニットに大別される(図3)。オートファゴソーム形成をトリガーする Atg1 タンパク質キナーゼ複合体(図には飢餓誘導性非選択的

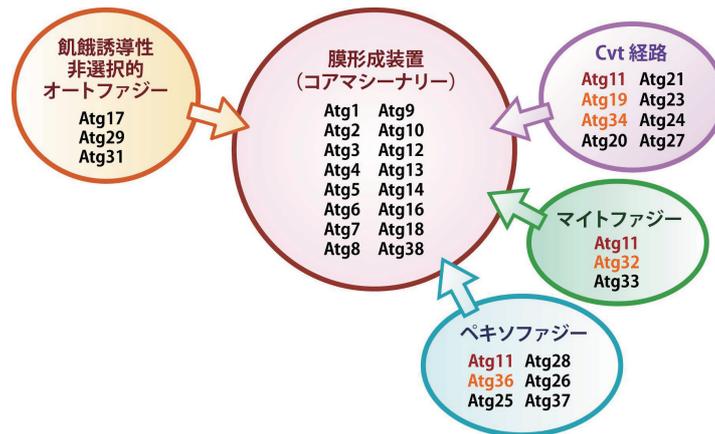


図2 出芽酵母の Atg タンパク質

Atg タンパク質は、どのタイプのオートファジーにも必要な膜形成装置 (コアマシーナリー/コア Atg) と、特定のタイプのオートファジーにのみ必要な因子に分類される。Cvt 経路、マイトファジー、ペキシソファジーは、それぞれ、液胞酵素、ミトコンドリア、ペルオキシソームを標的とする選択的オートファジー関連経路である。これら経路で働く共通のアダプタータンパク質 Atg11 を赤色で、各経路に特異的な受容体分子をオレンジ色で示した。

オートファジーに特異的な Atg17-29-31 複合体を加えた)、膜タンパク質 Atg9 を含むゴルジ体由来の膜小胞、Atg14 を含むオートファジー特異的ホスファチジルイノシトール (PI) 3-キナーゼ複合体、PI3-リン酸結合能を持つ機能未知の Atg2-Atg18 複合体、ユビキチン様タンパク質 Atg8 の結合系、ユビキチン様タンパク質 Atg12 の結合系である^{8,9)}。これら機能ユニットは順序正しく液胞近傍に集積し協調的に働いて、オートファゴソーム前駆体 (pre-autophagosomal structure: PAS) を構築する^{9,10)} (図4)。それが隔離膜として認識されるようになると、コア Atg 各々が隔離膜上で特徴的な局在を示し、引き続きオートファゴソームの形成に関与しているようである¹¹⁾ (図4)。オートファゴソームが完成すると、コア Atg は、一部の因子を除き、膜から遊離する。各機能ユニットの役割や活性制御機構について詳細な知見が蓄積しているが^{8,9)}、以下では二つのユビキチン様タンパク質結合系について、筆者の研究を中心にこれまでの知見をまとめる。

4. ユビキチン様タンパク質 Atg8 の多彩な機能

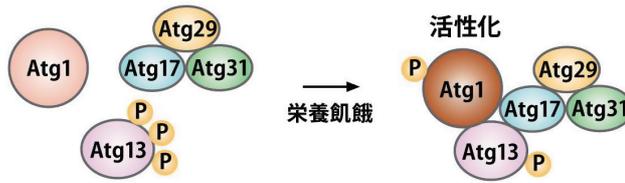
Atg8 は、ユビキチンに似た小さなタンパク質であり、合成直後、C 末端領域が Atg4 によるプロセッシングを受ける (図5A)¹²⁾。Atg4 は、ユビキチンプロセッシングプロテアーゼに類似したシステインプロテアーゼであり、Atg8 の C 末端領域を切断し、結合反応に必須のグリシン残基を C 末端に露出させる。Atg4 は、Atg8 のユビキチン様ドメインおよびそれより C 末端側のグリシン残基までの尾部のアミノ酸残基を認識し、グリシン残基の C 末端側のペプチド結合を切断する¹³⁾。切断は、グリシン残基の C 末端側の配列には依存しない。このためか、切除されるグリ

シン残基の C 末端側には、配列や長さに関して、Atg8 ホモログ間で共通性はみられない (図5B)。続いて Atg8 は、ユビキチンと同様に E1 酵素 Atg7、E2 酵素 Atg3 が触媒する結合反応の基質となる¹⁴⁾ (図6A)。ユビキチンやほかのユビキチン様タンパク質は、C 末端のカルボキシ基を介して標的タンパク質のリシン残基のアミノ基とイソペプチド結合を形成する。しかし Atg8 の場合、相手はタンパク質ではなく、脂質分子ホスファチジルエタノールアミン (PE) であり、その親水性頭部にあるアミノ基とアミド結合を形成する。化学反応としてはユビキチンの結合反応とほぼ同等であり、起こりうることは理解できるが、ユビキチン様のシステムがタンパク質の脂質修飾を媒介するということは驚愕の事実であった。Atg8 は PE との結合体として膜形成の初期 (PAS) から完成したオートファゴソームにまで局在する^{10,15)} (図4)。Atg8-PE がオートファゴソームの形成に重要な役割を果たすことは容易に想像されたが、その具体的な分子機能は不明であった。筆者が大隅研究室に参加したところ、一村義信博士が Atg8-PE 結合反応の試験管内再構成に成功していた¹⁶⁾。筆者は一村博士から手ほどきを受け、この反応系を用いて Atg8-PE の機能解明に取り組んだ。

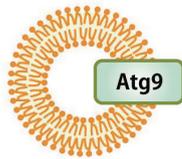
1) オートファゴソームの膜形成における役割

Atg8 と PE との結合反応は、大腸菌に個別に発現させ、精製した Atg8、Atg7、Atg3 と ATP (Atg7 が Atg8 の C 末端の活性化に使う)、PE を含むリポソーム (人工膜小胞) を混合し、30°C でインキュベートすることで再構成される。Atg8 はリポソームの脂質二重層の外葉 (outer leaflet) に含まれる PE と結合することになる。Atg8-PE が形成されるにつれ、リポソームが凝集していくことが明らかと

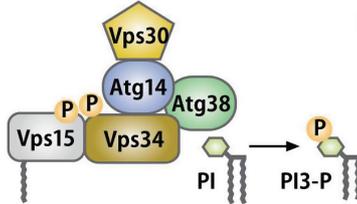
(a) Atg1 タンパク質キナーゼ複合体



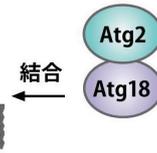
(b) Atg9 小胞



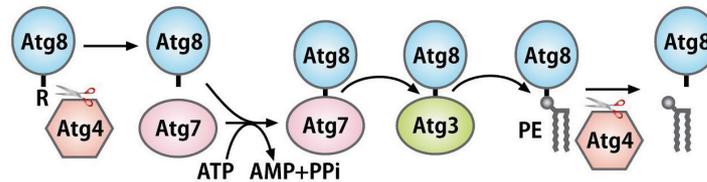
(c) Atg14 を含む PI3-キナーゼ複合体



(d) Atg2-Atg18 複合体



(e) Atg8 結合反応系



(f) Atg12 結合反応系

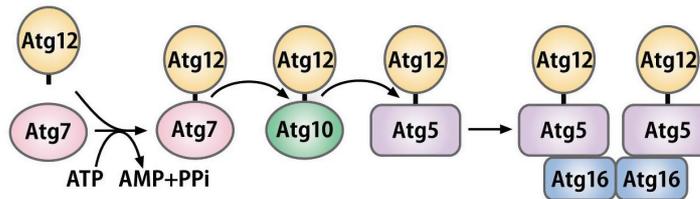


図3 コア Atg タンパク質が構成する六つの機能グループ

コア Atg タンパク質は六つの機能ユニット, (a) Atg1 タンパク質キナーゼ複合体 (ここでは飢餓誘導性非選択的オートファジーに特異的な Atg17-29-31 複合体も加えた), (b) 膜タンパク質 Atg9 を含む膜小胞, (c) Atg14 を含むオートファジー特異的 PI3-キナーゼ複合体, (d) PI3-リン酸に結合する Atg2-Atg18 複合体, (e) ユビキチン様タンパク質 Atg8 の結合反応系, (f) ユビキチン様タンパク質 Atg12 の結合反応系, を構成している.

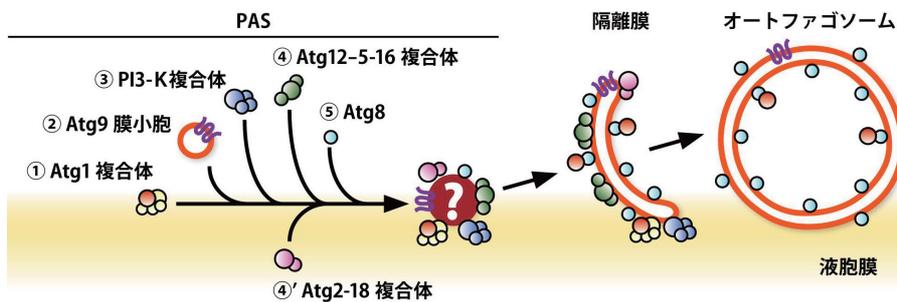


図4 コア Atg タンパク質の局在

コア Atg タンパク質は, 機能ユニットごとに定まった順序でオートファゴソーム形成の場 (酵母の場合は液胞近傍) に集積し, PAS を構築する. その後, 隔離膜にも局在し, 引き続きオートファゴソームの形成を媒介する.

なった. 電子顕微鏡解析により, リポソームどうしがタイトに結合し, その結合部位に Atg8-PE が濃縮されているようすが観察された. さらに, リポソームどうしの半融合

(ヘミフュージョン) も検出された. 化学架橋剤を用いた実験から, Atg8 は PE と結合すると多量体を形成することも明らかとなった. これらのことから, Atg8 には, PE と

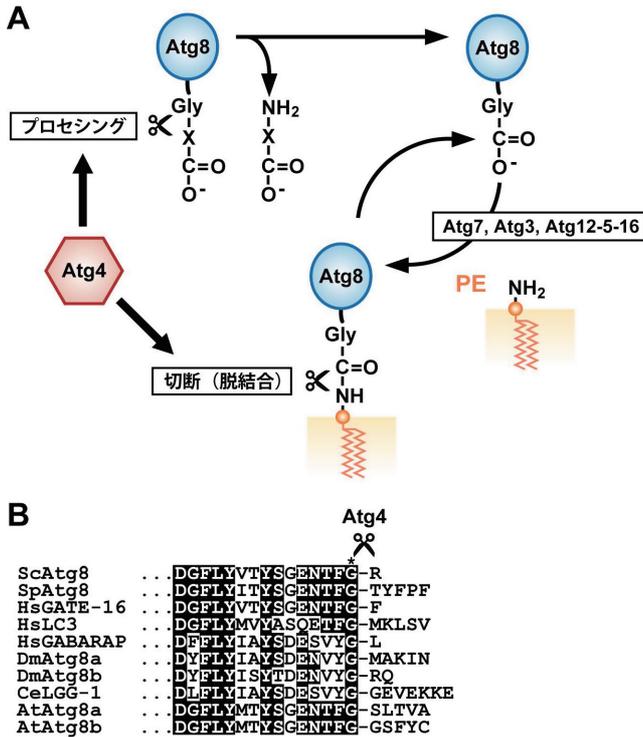


図5 Atg4によるAtg8のプロセッシングと脱PE化 (A) Atg4はAtg8のC末端領域のプロセッシングおよび、結合反応で形成されたAtg8-PEの脱PE化を担う。(B) Atg8ホモログのC末端領域のアミノ酸配列の比較。

結合すると多量体を形成し、自身がアンカーされた膜どうしをつなぎ合わせ半融合させるような機能があると結論づけた(図6B)¹⁷⁾。次に、試験管内で観察されたこの現象が細胞内でのオートファゴソーム形成と関連があるかについて検証した。Atg8に系統的に変異を導入し、オートファジーに欠損を示す変異体を複数取得し、*in vitro*で解析した結果、その大部分がリボソームの凝集と半融合に顕著な欠損を示した。膜のつなぎ合わせと半融合という現象は、細胞内でのオートファゴソーム形成におけるAtg8-PEの機能を反映したものであることが示唆された。また、機能欠損型Atg8変異体を発現する酵母細胞ではオートファゴソームは形成されないが、部分的な機能欠損変異体では、野生株に比べ、顕著に小さなオートファゴソームが形成されることがわかった。オートファゴソームの大きさは隔離膜の伸張段階に決まる。Atg8の機能はオートファゴソームの膜伸張の段階に関与することが示唆された¹⁷⁾。その後、Klionskyのグループも、Atg8の発現量を低下させるとオートファゴソームが小さくなることを示し、Atg8が膜の伸張に関わると結論している¹⁸⁾。

以上のようにして、Atg8-PEの役割に関する重要な知見が得られた。しかし、Atg8-PEが具体的にどのようにしてオートファゴソームの形成に関わるのかは依然として謎である。まず、ある膜に膜小胞が完全に融合すれば、元の膜の面積がその小胞分大きくなる(伸張する)ことになるが、半融合では膜を伸張させることにはならない。細胞内で

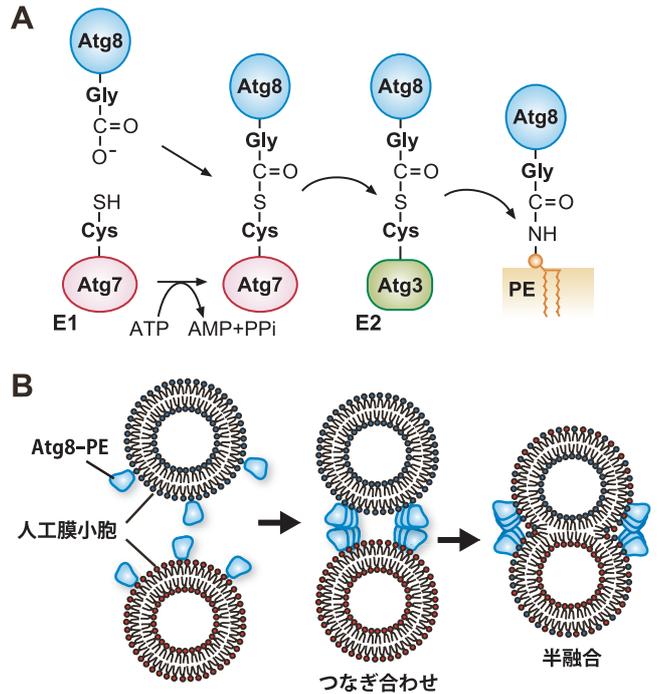


図6 Atg8-PE結合反応とAtg8-PEの膜形成における機能 (A) E1酵素Atg7は、Atg8のC末端グリシン残基のカルボキシ基をATPを利用して活性化し、自身の活性中心のシステイン残基とチオエステル結合を形成させる。続いて、Atg8はE2酵素Atg3のシステイン残基に受け渡され、最終的にPEの親水性頭部のアミノ基とアミド結合を介して結合する。(B) Atg8-PEは多量体を形成し、人工膜小胞のつなぎ合わせと半融合を引き起こす。

Atg8-PEが小胞の係留・融合を媒介するのかわ不明であるが、そうであるなら、ほかのタンパク質あるいは脂質の働きにより、Atg8-PEが引き起こした半融合が完全な融合へと進行する必要があるだろう。一方、*in vitro*でのAtg8-PEによるリボソームの凝集効率率はリボソームの脂質組成にさほど依存しないが、半融合の効率はリボソームの脂質組成に大きく依存する。特に、PE含量が一般的な生体膜のそれより高くないと半融合は起こらない。これをもってAtg8-PEは細胞内では半融合を起こさないと主張するグループもあるが¹⁹⁾、Atg8-PEが局在する膜の脂質組成が判明するまではこれは性急な結論にすぎない。いずれにせよ、Atg8-PEのオートファゴソーム形成における具体的な役割を明らかにするには、Atg8-PEの作用の対象となる膜を特定し、その形態がAtg8-PEによってどのように変化するのかを解明する必要がある。

哺乳動物にはAtg8のホモログが複数あり、一次配列の類似性からLC3サブファミリーとGABARAPサブファミリーに分類される。哺乳動物細胞では、Atg3のノックアウトあるいはAtg4変異体の過剰発現により、これらすべてのAtg8ホモログのPE化が欠損すると閉じていないオートファゴソーム(隔離膜)が蓄積することから、PEと結合したAtg8ホモログは、オートファゴソームの閉じるステップに重要であると議論されている^{20,21)}。また、この結果は同時に、哺乳動物では、Atg8ホモログとPEの結

合は膜伸張に必須ではないことを示唆している。しかし、LC3サブファミリーをノックダウンすると膜が伸張しなくなり、GABARAPサブファミリーをノックダウンすると膜が閉じなくなるという報告もある²²⁾。LC3サブファミリーはPEと結合せずともある程度膜の伸張を媒介できるのだろうか？ 酵母はAtg8を一つしか持たず、その一次配列はGABARAPサブファミリーに近いが、*ATG8* 遺伝子を欠失させるとオートファゴソームはほとんど形成されなくなる（ごくまれにオートファゴソームのような膜構造が観察されるため、このような表現にした¹⁵⁾。酵母のAtg8は、機能としてはLC3サブファミリーに近いのだろうか？あるいは両方のサブファミリーの機能を兼ね備えている可能性も考えられる。また、隔離膜が閉じるステップは、二次元的な図（断面図）で考えると隔離膜の先端どうしの融合反応のように思えるが、実際には（立体的に捉えると）、1枚の膜である隔離膜が2枚の膜（オートファゴソームの外膜と内膜）に分かれる分裂反応（fission）である。Atg8ホモログがこれを引き起こすのであれば、どのようなメカニズムなのであろうか？（エンドソームでのmulti vesicular bodyの形成において陥入膜を切り切るESCRT-III複合体²³⁾のように振る舞うのであろうか？）こうした問題に対しても、今後明確な答えを出していく必要がある。

2) 分解標的をオートファゴソーム膜に結合させるリンカーとしての役割

選択的オートファジーにおいて、Atg8は、膜形成とは独立に、分解標的のオートファゴソームへの取り込みにも重要な役割を果たす。選択的オートファジーの標的は、まず、各標的に特異的な受容体タンパク質に認識される（図7A）。この受容体が直接、あるいはアダプタータンパク質を介して、コアAtgタンパク質群を標的にリクルートとし、膜形成を開始させる。さらに、形成された隔離膜上のAtg8-PEと受容体が相互作用し、標的を膜に結合させることで、標的が効率よくオートファゴソームで包み込まれると考えられている。出芽酵母には、Ape1, Ape4, Ams1といった液胞内で働く酵素をオートファジーのマシーナリーを利用して液胞へ輸送する cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) 経路と呼ばれる選択的オートファジーに関連した経路がある^{24, 25)}（液胞酵素の生合成経路であり、分解が目的ではないため、正確にはオートファジーではないが）。Cvt経路では、標的となる液胞酵素に対してAtg19が受容体として機能する。我々は、上述のAtg8の変異解析において非選択的オートファジーの活性を調べる際、Ape1の液胞輸送を同時に調べていた。Ape1の液胞輸送にのみ欠損を示す変異体が見つかった。解析を進めた結果、三つの変異体は、表現型と合致して、Atg19との相互作用に欠損を示すことが明らかとなった（受容体は非選択的オートファジーには必要ない）。これらの変異部位のAtg8の立体構造上での位置を調べてみると、三つすべてが疎水性のアミノ

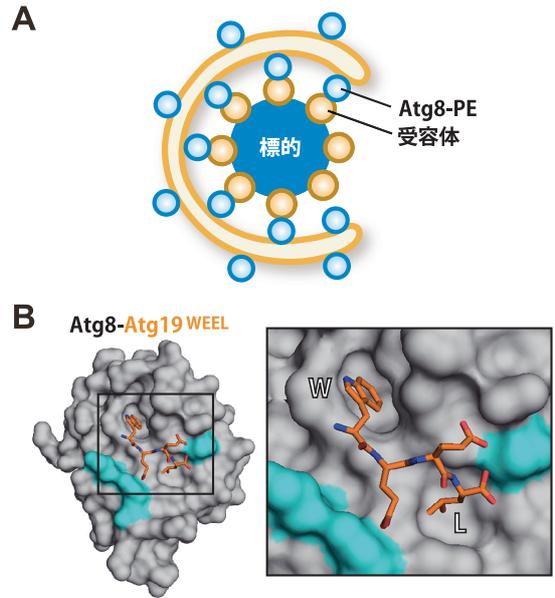


図7 選択的オートファジーにおけるAtg8-PEの役割

(A) 選択的オートファジーにおいて、Atg8-PEは受容体タンパク質と相互作用し、分解標的と隔離膜を結合させる。(B) Atg8とAtg19との相互作用。Atg19のWEEL配列（オレンジ）がAtg8（グレー）の疎水性ポケットに結合する。Atg19との相互作用に欠損を生じるAtg8の変位部位をシアン色で示した。

酸残基で構成されるポケット（窪み）を取り囲むように配置していた（図7B）。Atg19はAtg8のこのポケットに結合すると考えられた。予想どおり、北海道大学の稲垣冬彦先生、野田展生先生（現微生物化学研究所）のグループの構造解析の結果、Atg19のC末端領域のWEELという配列のうち、W（トリプトファン残基）とL（ロイシン残基）が上記Atg8の疎水性ポケットに結合することが明らかとなった²⁶⁾（図7B）。ポケットを構成するアミノ酸残基は酵母からヒトまでAtg8のホモログ間で高度に保存されていた。当時、選択的オートファジーの研究は始まったばかりで、既知の受容体はAtg19とp62（哺乳動物においてユビキチン化されたタンパク質を選択的オートファジーで分解するための受容体）のみであったが、ほかにも受容体があるなら、p62やそれらもこのポケットに結合するのかもしれない、あるいは分解標的がこのポケットに直接結合する場合もあるかもしれない、等と想像をたくましくしていた。それからまもなく、哺乳動物のAtg8のホモログであるLC3とp62との相互作用様式が、稲垣先生、野田先生のグループの構造解析により明らかにされた²⁶⁾。LC3の疎水性ポケットにp62のWTHLという配列のWとLが結合していた。Atg19とp62とは全体として一次配列上の相違はないが、WXXLというモチーフを使ってAtg8とそのホモログと同じ様式で結合することが明らかとなった。筆者らはこのモチーフをAtg8-family interacting motif (AIM)と名づけ、明らかにした相互作用が、生物種や分解標的の種類を問わない、Atg8ホモログと受容体分子との普遍的な相互作用である可能性を議論し、成果を報告した²⁶⁾。

LC3 と p62 の相互作用に関しては、同様の結果がほかのグループからも報告された²⁷⁾。その後、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、細菌等に対する選択的オートファジーの受容体が次々と同定された。それらすべてに AIM が存在し、それを介して Atg8 ホモログと相互作用することが明らかとなっている^{4,5)}。

3) コア Atg タンパク質の隔離膜への結合

Atg8-PE の役割の三つ目は、コア因子 Atg1 の隔離膜への結合である (図 8)。タンパク質リン酸化酵素である Atg1 は、飢餓誘導性の非選択的オートファジーにおいては、Atg13, Atg17, Atg29, Atg31 との 5 者複合体として、ほかのコア因子が PAS に局在するための足場を形成する (図 3, 4)²⁸⁾。このように、オートファゴソーム形成のごく初期に働く一方で、Atg1 は隔離膜に一樣に局在し、少なくともその一部はオートファゴソーム内部に取り込まれ、液胞に輸送されることが知られていた^{11,29)}。我々は、AIM 結合ポケットに変異を導入した Atg8 変異株では、Atg1 の液胞への輸送が顕著に減少することを見いだした³⁰⁾。Atg1 が Atg8 と相互作用することを示し、Atg1 のキナーゼドメインの C 末端側に AIM を特定した。Atg1 の AIM を変異させると、Atg8 との相互作用が失われ、Atg1 の液胞内への輸送が停止した。と同時に、オートファゴソーム形成効率が低下した。AIM 変異体においてもオートファゴソーム形成における Atg1 の初期の機能 (5 者複合体の形成、キナーゼ活性の上昇、PAS の構築等) に顕著な異常はみられなかった。Atg1 は、オートファゴソームの形成を誘導し、隔離膜が形成されると、隔離膜上の Atg8-PE に結合し、引き続きオートファゴソームの形成を促進すると考えられる (図 8)。この Atg1 の作用は、おそらく隔離膜上の因子のリン酸化を介するものと考えられ、その基質となるタンパク質の同定が次の課題である。Atg8 と Atg1 あるいは哺乳動物の Atg8 ホモログと ULK1 (哺乳動物の Atg1 ホモログ) の相互作用については、我々のグループとほぼ同時にほかの二つのグループから同様の報告がなされた^{31,32)}。

AIM は、Atg1 以外にも、酵母では Atg3 (Atg8 結合反応の E2 酵素)³³⁾、哺乳動物では Atg4B (LC3 のプロセシング酵素)¹³⁾ 等のコア因子にも見つかっている。Atg3 の AIM は、Cvt 経路において、Atg19 と競合する状況下で Atg8 を

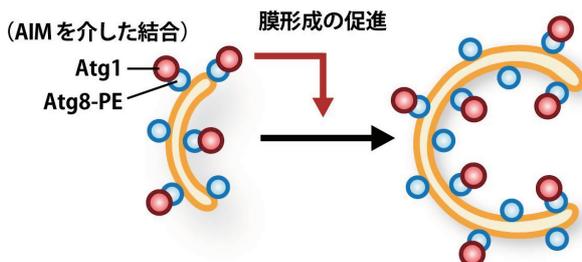


図 8 Atg8-PE を介した Atg1 の隔離膜への結合
Atg1 は Atg8-PE を介して隔離膜に局在し、オートファゴソームの形成を促進する。

効率よく PE 化するために重要であることが示唆された。一方、Atg4B の AIM の重要性は明らかとなっていない。

5. Atg12-5 結合体の機能とその作動機構

コア Atg タンパク質には、Atg8 以外にもう一つ、Atg12 というユビキチン様タンパク質が含まれる。Atg12 は、E1 酵素 Atg7 (Atg8 と共通)、E2 酵素 Atg10 が触媒する反応を介して、C 末端のカルボキシ基で Atg5 というタンパク質のリシン残基とイソペプチド結合を形成する³⁴⁾ (図 9A)。Atg12 と Atg5 との結合体 (Atg12-5) は、Atg8 の結合反応の E2 酵素 Atg3 に作用し、Atg3 の活性中心のシステイン残基にチオエステル結合した Atg8 の PE への転移反応を促進する³⁵⁾ (図 9B)。すなわち、Atg12-5 結合体は Atg8 の結合反応の E3 酵素として機能する。構造解析の結果、Atg12-5 は、構造上も既知の E3 酵素との類似性はなく、

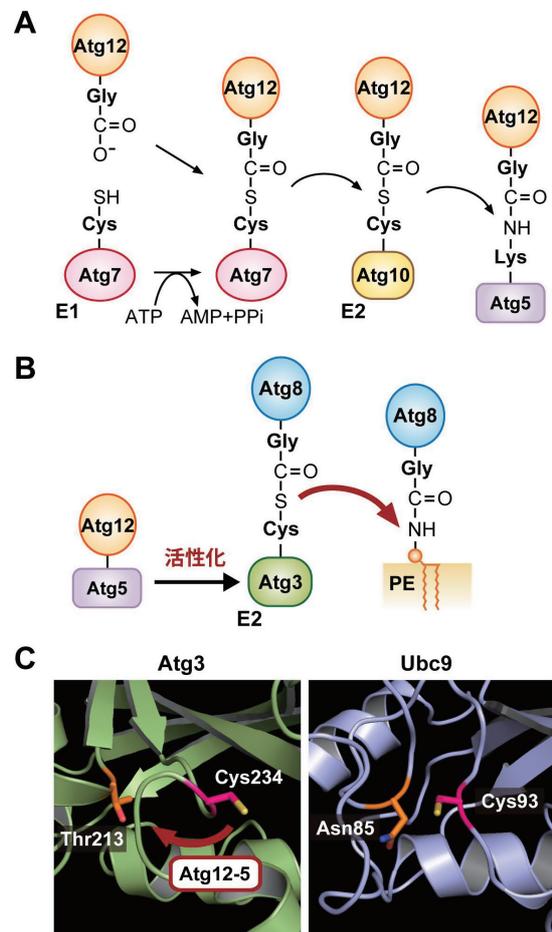


図 9 Atg12 の結合反応および Atg12-5 結合体の機能とその作用機構

(A) Atg12 は Atg7 および Atg10 を介して Atg5 のリシン残基とイソペプチド結合を形成する。(B) Atg12-5 は、Atg3 と相互作用し、Atg3 のシステイン残基にチオエステル結合した Atg8 の PE への転移反応を促進する。(C) Atg3 と Ubc9 (SUMO の E2 酵素、典型的な E2 酵素の例として示した) の活性中心の構造の比較。Atg12-5 は Atg3 に作用し、システイン残基の側鎖がトレオニン残基の方に再配向するような構造変化を引き起こす。これにより Atg3 の E2 酵素活性が上昇する。

Atg12のユビキチン様ドメインに加え、Atg5にもユビキチン様ドメインが二つもあることが明らかとなった^{36,37}。ユビキチン様ドメインを三つ持つユビキチン様タンパク質の結合体が、別のユビキチン様タンパク質の結合反応のE3酵素として働きわめてユニークな系である。我々は、Atg12-5がどのようにしてAtg3のE2酵素活性(Atg8をPEと結合させる活性)を昂進するのか、そのメカニズムの解明に取り組んだ³⁸。Atg3の構造解析結果が研究の端緒となった。Atg3の活性中心は典型的なE2酵素とは大きく異なっていた³⁹。通常のE2酵素では(図ではSUMOのE2酵素であるUbc9の構造を示した)、ユビキチンやユビキチン様タンパク質(Ub/Ubl)のC末端カルボキシ基とチオエステル結合を形成するシステイン残基の側鎖が、Ub/Ublの標的アミノ基への転移に必要なアスパラギン残基の側鎖と向かい合っている(図9C)。一方、Atg3の活性中心では、このアスパラギン残基がトレオニン残基に置換しており(我々の実験から、このトレオニン残基はアスパラギン残基と同等の役割を担っていることが示唆された³⁸)、システイン残基の側鎖は、このトレオニン残基の側鎖とは反対側を向いていた。このような構造でAtg3がE2酵素活性を示すとは考えにくかった。そこで、Atg12-5が作用するとAtg3の活性中心に構造変化が起こり、システイン残基がトレオニン側鎖側に再配向し、Atg3の活性が上昇する(図9C)、という仮説を立て、検証を開始した。システイン残基の再配向が起こるのであれば、その先にあるトレオニン残基をシステインに置換しておけば、システイン残基間でジスルフィド結合が形成されるのではないかと考えた。分子内でジスルフィド結合が形成されると、フリーのシステイン残基の数は二つ減少する。フリーのシステイン残基を比較的高分子量のポリエチレングリコールを結合したマレイミドで修飾すると、修飾されたタンパク質分子は修飾数に応じてSDS-PAGE上で異なる移動度を示す。このようなアッセイ系を確立し、調べた結果、仮説どおり、トレオニン残基あるいはその近傍のアミノ酸残基をシステインに置換したAtg3をAtg12-5とインキュベーションすると、新たに導入したシステイン残基と触媒システイン残基との間にジスルフィド結合が形成された。その他の解析結果と合わせ、Atg12-5はAtg3の活性中心の構造を再編成することで、そのE2酵素活性を上昇させる、というモデルを提唱した³⁸。Atg8-PE形成反応のメカニズムに関する重要な知見を得ると同時に、E2酵素の活性中心に構造変化を引き起こすという、E3酵素の新たな作用機序を明らかにすることができたと考えている。今後、Atg12-5とAtg3あるいはAtg8-Atg3チオエステル中間体の複合体の構造解析から、Atg12-5の三つのユビキチン様ドメインがどのように働いてAtg8のAtg3からPEへの転移を促進するのか、その全貌が明らかになると期待される。

Atg12-5によるAtg8-PE結合反応の制御にはどのような意義があるのだろうか? 一般的にE3酵素は基質特異性を決定する。*in vitro*の再構成系で反応液のpHを生理的

条件よりも高く設定すると、PEと同じく親水性頭部にアミノ基を持つホスファチジルセリン(PS)ともAtg8は複合体を形成する^{40,41}。しかし、Atg12-5は、Atg8とPSとの結合も同様に促進し、基質選択性には影響しない³⁵(生理的条件では、E2酵素であるAtg3自身がPEをPSより効率よく認識するようである⁴¹)。Atg12-5はAtg16と複合体を形成する(図3)⁴²。しかし、Atg16を*in vitro*再構成系に加えても、Atg12-5のE3酵素活性に大きな変化は生じない³⁵。上述のように、Atgタンパク質はオートファゴソムの形成過程でPASに局在するが、Atg16はAtg12-5のPASへの局在に必須である²⁹。すなわち、細胞内では、Atg12-5はAtg16の働きでオートファゴソム形成の場に局在し、そこでAtg8-PEの形成を促進していると考えられる。PEは多くの生体膜の主要な構成成分の一つである。Atg8-PEの形成の場をオートファゴソム関連膜に特定するために、Atg12-5-16複合体によるAtg8-PE結合反応の空間的制御が必要と考えられる。しかし、この制御機構もAtg8-PEの形成をオートファゴソム関連膜に限定できるほど厳密ではなく、次節で述べるバックアップシステムが必要なようである。

6. Atg4によるAtg8-PEの切断とその意義

Atg8は不可逆的にPEと結合するのではなく、Atg8とPEとの間のアミド結合がAtg4により切断され、再利用可能な状態でAtg8がPEから遊離する¹²(図5A)(上述のように、Atg4はAtg8のC末端のプロセシングにも関わる)。この反応は、オートファゴソム形成における役目を終えたAtg8-PEを再利用するためのものであろうと考えられた。一方、*ATG4*欠失株にAtg8のグリシン露出型(Atg4によるプロセシングが不要となる)を発現させると、Atg8-PEが過剰に蓄積し、遊離型Atg8が減少し、オートファゴソムの形成効率が低下する¹²。Atg4によるAtg8の脱PE化がオートファゴソムの形成を積極的に促進している可能性も議論された。我々は、これらとは異なる、Atg4の新たな役割を見いだした⁴³。上記、脱PE化欠損細胞でのAtg8-PEの局在を調べると、小胞体、エンドソーム、液胞といったさまざまなオルガネラの膜にAtg8-PEが異常蓄積していることが明らかとなった。野生株では液胞膜への低レベルの蓄積にとどまる。また、このAtg8-PEの異常蓄積は、Atg3やAtg12-5に依存するが、オートファジーの誘導やPASの構築とはまったく無関係に起こることがわかった(Atg16にも依存しない)。前節では、Atg12-5-16複合体がPASに局在することで、Atg8-PEのPASでの形成を促進すると述べたが、実際には、細胞質にもAtg12-5-16複合体やAtg3の局在が観察される。したがって、Atg8-PEは細胞内のさまざまな膜で形成される。Atg4は細胞質に局在が観察される⁴³。野生株では、オートファジーとは無関係な膜で誤って形成されたAtg8-PEをAtg4が切断、再生しているのであろう。これにより、しかるべき場所、

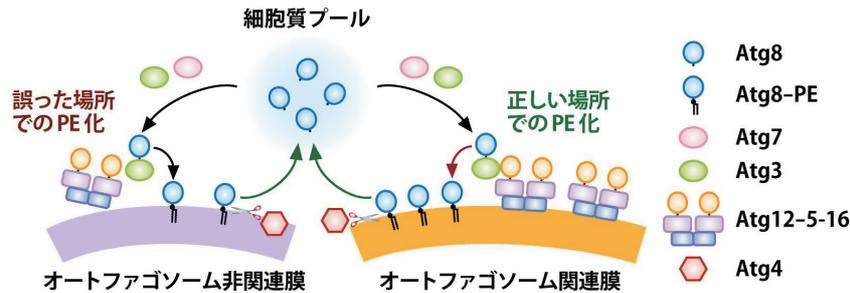


図10 Atg4によるAtg8-PEの切断の意義

Atg8-PEは、オートファゴソーム関連膜 (PASや隔離膜) で特異的に形成されるべきである。これは、Atg8の結合反応のE3酵素であるAtg12-5がAtg16の働きでこれら膜に局在することである程度達成される (図右側)。しかしながら、PASに局在していない (細胞質を拡散している) Atg3やAtg12-5-16複合体により、さまざまな細胞内膜でAtg8-PEが誤って形成されてしまう。Atg4は、このようなAtg8-PEを再生し、オートファゴソーム関連膜でのPE化に必要な未修飾のAtg8のプールを維持している (図左側)。同様に、Atg4は、オートファゴソーム形成における役目を果たしたAtg8-PEの再利用にも関与していると考えられる (図右側)。

すなわちPASでのAtg8-PEの形成に必要な遊離型Atg8の量が維持されていると考えられる (図10)⁴³。我々の論文が公表された後、ほかの二つのグループから同様の報告がなされている^{44, 45}。

一方で、膜形成や分解的の取り込みに機能するAtg8-PEがAtg4による切断を受けては都合が悪い。PASや隔離膜上でこうしたAtg8-PEをAtg4による切断から保護するような因子が存在するかもしれない。こうした可能性の検証も興味深い課題の一つである。

7. おわりに

以上のように、本稿では二つのユビキチン様タンパク質結合システムに焦点を絞り、オートファゴソームの形成機構に関して現在明らかとなっていること、未解決の問題等をまとめたが、コアAtgが構成するほかの機能グループについても多くの知見が蓄積している^{8, 9}。しかしながら、オートファゴソームの膜がどのようにして形成されるのかという根本的な問いに答えるにはいまだ至っていない。Atgタンパク質についても不明な点が多く残されているが、以下にあげる二つの問題点を解決することが、膜形成のメカニズムの解明には必須である。まず、一つ目として、Atgタンパク質の作用の対象となる膜側の情報が欠落していることがあげられる。たとえば、本稿で述べたAtg8の例もこれに当てはまるが、あるAtgタンパク質の機能が判明しても、その作用の対象となる膜がどのようなもので、その組成や形態がそのAtgの機能でどのように変わるのかを明らかにしなくては、Atgタンパク質の機能をオートファゴソーム形成の具体的なプロセスの中に関連づけることができない。本稿の序盤で述べたように、コアAtgの六つの機能グループは、順序正しくオートファゴソーム形成の場を集積し、そこでPASを構築する。PAS形成のごく初期に膜タンパク質Atg9を含む膜小胞がリクルートさ

れる。すなわち、遅くともこの時点からはPASに膜成分が存在することになる。出芽酵母の場合、どのコアAtgが欠けても隔離膜は形成されない。したがって、すべてのコアAtgがまずはAtg9を含む膜小胞を中心に (少なくとも膜成分の一つとして)、隔離膜の前駆体となる膜構造を作り上げると考えられる。このようなPASでの微視的な膜動態、そしてその前駆体膜が隔離膜へと変換・伸張していく過程を明らかにした上で、そこでの各Atgの役割を具体的に示していくことが今後の大きな課題の一つであると考えている。

もう一つの問題は、Atgタンパク質以外にも、まだ、オートファゴソームの形成に関わる因子あるいは細胞内プロセスが未同定のまま残されている可能性があるということである。オートファゴソーム形成機構の理解には、その全体像を捉えることが必要であろう。これまで同定されたATG遺伝子は栄養が十分存在する条件では、酵母でも哺乳動物の培養細胞でも、細胞の生育には必須ではない。また、少なくとも出芽酵母においては、ほとんどのAtgタンパク質はオートファゴソームの形成に特異的に機能すると考えられている。従来のATG遺伝子のスクリーニング法は、原理的に非必須遺伝子を対象としていた。しかし、近年、オートファゴソームの形成に重要な必須遺伝子の報告が相次いでいる。このことは、細胞の生育に必須のプロセスに働く因子が、オートファゴソームの形成にも手を貸していることを意味している。筆者らは、最近、新たなスクリーニングを行い、オートファゴソームの形成に必要な必須遺伝子を多数同定した。現在、これらがオートファゴソームの形成にどのように関与しているのかを追究している。各因子や細胞内プロセスを具体的なかたちでオートファゴソームの形成過程に組み込んでいくことで、オートファゴソーム形成を支える細胞内システムの全容の解明につなげたいと考えている。

謝辞

このたび生化学会奨励賞という荣誉ある賞をいただくことができたのは、これまでお世話になりました先生方、同僚の皆様、一緒に研究に励んでくれた学生さんたちの御陰です。ここに深く感謝致します。

文 献

- 1) Ohsumi, Y. (2014) *Cell Res.*, 24, 9–23.
- 2) Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992) *J. Cell Biol.*, 119, 301–311.
- 3) Tsukada, M. & Ohsumi, Y. (1993) *FEBS Lett.*, 333, 169–174.
- 4) Johansen, T. & Lamark, T. (2011) *Autophagy*, 7, 279–296.
- 5) Weidberg, H., Shvets, E., & Elazar, Z. (2011) *Annu. Rev. Biochem.*, 80, 125–156.
- 6) Deretic, V. & Levine, B. (2009) *Cell Host Microbe*, 5, 527–549.
- 7) Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011) *Cell*, 147, 728–741.
- 8) Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27, 107–132.
- 9) Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 458–467.
- 10) Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001) *EMBO J.*, 20, 5971–5981.
- 11) Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., Yamamoto, H., & Ohsumi, Y. (2013) *J. Cell Sci.*, 126, 2534–2544.
- 12) 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.
- 13) Satoo, K., Noda, N.N., Kumeta, H., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2009) *EMBO J.*, 28, 1341–1350.
- 14) 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.
- 15) Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999) *J. Cell Biol.*, 147, 435–446.
- 16) Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 40584–40592.
- 17) Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007) *Cell*, 130, 165–178.
- 18) Xie, Z., Nair, U., & Klionsky, D.J. (2008) *Mol. Biol. Cell*, 19, 3290–3298.
- 19) Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., Baba, M., McNew, J.A., Jiang, X., Reggiori, F., Melia, T.J., & Klionsky, D.J. (2011) *Cell*, 146, 290–302.
- 20) Sou, Y.S., Waguri, S., Iwata, J., 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.
- 21) Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Otori, H., Yamamoto, A., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008) *Mol. Biol. Cell*, 19, 4651–4659.
- 22) Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., & Elazar, Z. (2010) *EMBO J.*, 29, 1792–1802.
- 23) Henne, W.M., Buchkovich, N.J., & Emr, S.D. (2011) *Dev. Cell*, 21, 77–91.
- 24) Lynch-Day, M.A. & Klionsky, D.J. (2010) *FEBS Lett.*, 584, 1359–1366.
- 25) Yuga, M., Gomi, K., Klionsky, D.J., & Shintani, T. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 13704–13713.
- 26) 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.
- 27) Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y.S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., & Komatsu, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 22847–22857.
- 28) Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2008) *Mol. Biol. Cell*, 19, 2039–2050.
- 29) Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007) *Genes Cells*, 12, 209–218.
- 30) Nakatogawa, H., Ohbayashi, S., Sakoh-Nakatogawa, M., Kakuta, S., Suzuki, S.W., Kirisako, H., Kondo-Kakuta, C., Noda, N.N., Yamamoto, H., & Ohsumi, Y. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 28503–28507.
- 31) Kraft, C., Kijanska, M., Kalie, E., Siergiejuk, E., Lee, S.S., Semplicio, G., Stoffel, I., Brezovich, A., Verma, M., Hansmann, I., Ammerer, G., Hofmann, K., Tooze, S., & Peter, M. (2012) *EMBO J.*, 31, 3691–3703.
- 32) Alemu, E.A., Lamark, T., Torgersen, K.M., Birgisdottir, A.B., Larsen, K.B., Jain, A., Olsvik, H., Øvervatn, A., Kirkin, V., & Johansen, T. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 39275–39290.
- 33) Yamaguchi, M., Noda, N.N., Nakatogawa, H., Kumeta, H., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 29599–29607.
- 34) 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.
- 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) Noda, N.N., Fujioka, Y., Hanada, T., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2012) *EMBO Rep.*, 14, 206–211.
- 37) Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G., & Otomo, T. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20, 59–66.
- 38) 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.
- 39) Yamada, Y., Suzuki, N.N., Hanada, T., Ichimura, Y., Kumeta, H., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 8036–8043.
- 40) Sou, Y.S., Tanida, I., Komatsu, M., Ueno, T., & Kominami, E. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 3017–3024.
- 41) Oh-oka, K., Nakatogawa, H., & Ohsumi, Y. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 21847–21852.
- 42) Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999) *EMBO J.*, 18, 3888–3896.
- 43) Nakatogawa, H., Ishii, J., Asai, E., & Ohsumi, Y. (2012) *Autophagy*, 8, 177–186.
- 44) Nair, U., Yen, W.L., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., Reggiori, F., & Klionsky, D.J. (2012) *Autophagy*, 8, 780–793.
- 45) Yu, Z.Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.Y., Jiang, F.J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.L., Klionsky, D.J., Liang, Y., & Xie, Z. (2012) *Autophagy*, 8, 883–892.

著者寸描

●中戸川 仁 (なかとがわ ひとし)



東京工業大学フロンティア研究機構特任准教授。博士 (理学)。

■略歴 1974年神奈川県に生る。97年中央大学工学部卒業。99年京都大学大学院理学研究科修士課程修了。2002年同大学院同研究科博士課程修了。02~05年日本学術振興会特別研究員。05年基礎生物学研究所助教。06~10年JST さきがけ研究者 (兼任)。09年現所属にて特任助教。

11年より現職。

■研究テーマと抱負 オートファジーにおける膜形成および分解標的認識のメカニズムの研究。個々の関連因子の機能を分子レベルで理解しつつ、膜動態や形態形成といったマクロな事象とのギャップを埋めていくような研究を展開したい。

■ウェブサイト <http://www.ohsumilab.ari.titech.ac.jp>

■趣味 趣味ではないが、仕事以外の時間は専ら3歳の子供に向けられている。