

Atg5 非依存性オートファジーの形態学と分子生物学

Molecular Biology and Morphology of Alternative Macroautophagy

清水 重臣, 荒川 聡子, 西田 友哉

Shigeomi Shimizu, Satoko Arakawa and Yuya Nishida

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・病態細胞生物

要旨 オートファジーは細胞内小器官などの自己構成成分を分解するシステムで、細胞の健全性の維持に貢献している。また、その機能異常は神経疾患や発癌など様々な疾患に関与することが報告されている。従来オートファジーの実行メカニズムは、酵母菌から哺乳動物まで保存されている複数の分子群 Atg5, Atg7, LC3 等によって完全に支配されていると考えられてきた。しかしながら、私たちは、Atg5, Atg7, LC3 などの分子に依存しない新たなオートファジー機構が存在することを発見した。この新規オートファジーは、ゴルジ装置やエンドソームを起源としており、Rab9 等の分子によって調節されている。また、細胞に DNA 傷害などのストレスが加わった時に強く誘導される他、赤血球が成熟する際に起るミトコンドリア除去にも関与している。

キーワード：オルタナティブオートファジー、ゴルジ装置、LC3、Rab9

1. マクロオートファジーの形態学

マクロオートファジー（自食現象）とは、細胞内成分が二重の膜によって周囲から隔離され、リソソームと融合することによって消化される細胞内浄化機構である。オートファジーとは、リソソームによって細胞構成成分が消化される現象のことであり、マクロオートファジー以外にも、①リソソーム膜の陥入を介して細胞質成分が消化されるマイクロオートファジーや、②個別の分子が直接リソソームに運搬されて消化されるシャペロン依存性オートファジー、などが含まれる。ただし、単にオートファジーと称する場合は、通常二重膜形成を介して実行されるマクロオートファジーを意味する。

マクロオートファジーの研究は、電子顕微鏡観察による解析が端緒となった。即ち、ミトコンドリアなどが含まれたユニークな二重膜構造物（オートファゴソームと呼ばれる）や、これがリソソームと融合し内部が消化されたオートリソソームが、肝臓の超微形態観察により発見されたことが出発点である^{1,2)}。その後、オートファゴソーム／オートリソソームの動態と役割が解析され、マクロオートファジーは栄養飢餓や分泌顆粒等のクリアランスに関与していることが明らかになった。現在、マクロオートファジーの形態学的進行は下記のように考えられている。即ち、まず隔離膜と呼ばれる2重膜が形成される。この隔離膜は伸長すると共に湾曲し、細胞

質やオルガネラを囲い込み、最終的には2重膜のオートファゴソームを形成する。オートファゴソームはリソソームと直接融合し、リソソームの消化酵素によってその内容物が消化される。

2. マクロオートファジーの分子機構

上述した形態学的特徴が解析された一方で、この機構に関連する複数の分子が出芽酵母の解析により同定されていた^{3,4)}。即ち、出芽酵母では栄養源の枯渇によってオートファジーが誘導されることを利用して遺伝学解析が行なわれ、これまでに30個以上のオートファジーに必要な遺伝子が同定された。まず、オートファゴソーム形成の初期段階においては Atg1（セリンスレオニンキナーゼ）や Atg6（PI3 キナーゼ構成分子）などが重要な役割を果たしている。続いて起こる隔離膜の伸長には、Atg5, Atg12, Atg8 等が重要な役割を担っている。Atg5-Atg12 複合体は隔離膜の外膜に偏って分布し隔離膜の伸長に寄与する。一方、Atg8 は、Atg5-Atg12 複合体依存的に脂質化され隔離膜やオートファゴソーム膜に結合し、オートファゴソームを形成する⁵⁾。

現在、酵母の遺伝情報を基盤として、哺乳動物におけるマクロオートファジー機構が解き明かされつつあるが、重要な分子はその構造、機能共に酵母から哺乳動物細胞まで保存されている。例えば、Atg5 の遺伝子欠損マウスにおいては、①オートファジーが誘導されない細胞が存在すること、②このマウスは生後24時間以内に死亡すること、が報告されており⁶⁾、Atg5 は哺乳動物のオートファジーにおいても重要な役割を果たしている。また、酵母 ATG8 の哺乳類ホモログの一つである LC3 は、オートファジーの実行過程でフォスファ

〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45
TEL: 03-5803-4692; FAX: 03-5803-4821
E-mail: shimizu.pcb@mri.tmd.ac.jp
2010年3月1日受付

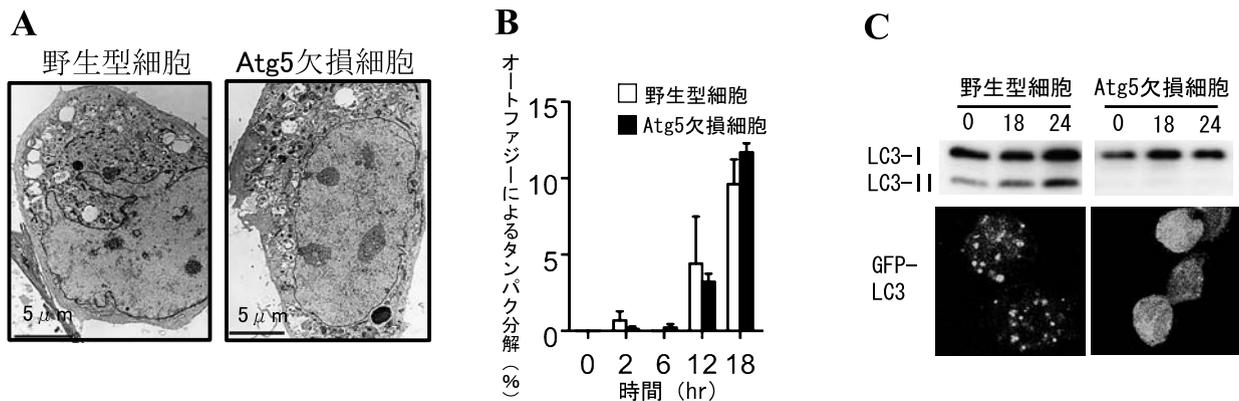


図1 Atg5非存在下で誘導されるオートファジー

A: 野生型および Atg5 欠損細胞をエトポシドで刺激したところ、同程度のオートファジーが誘導された。
 B: エトポシド投与後に、オートファジーによるタンパク質分解活性を測定したところ、野生型細胞と Atg5 欠損細胞では同程度であった。
 C: 新規オートファジーには、LC3 の脂質化や GFP-LC3 のドット形成は伴わなかった。(Nishida et al., 2009, Nature, 461, 654-658 より改変引用)

チジリエタノールアミン (PE) と共有結合し、細胞質から隔離膜に移動しオートファゴソームの形成に関わる。

3. 新しい分子機構を介したオートファジーの発見

このように、酵母と哺乳動物のオートファジー関連分子は、機能的、構造的に良く保存されていることより、哺乳動物においても Atg5 の存在や LC3 と PE との結合は、オートファジーに必要不可欠であると考えられてきた。しかしながら我々は、Atg5 マウスの胎仔には殆ど異常がみられない⁷⁾ ことより、Atg5 に依存しない代替機構の存在を疑った。

この代替メカニズムの存在を検討するために、野生型マウスと Atg5 欠損マウスより細胞を調整し、エトポシド (DNA 傷害誘導剤) を用いて細胞にストレスを加えた。すると、野生型細胞において大規模なオートファジーが観察されたばかりか、Atg5 欠損細胞においても同程度の大規模なオートファジーが観察された (図 1A)⁷⁾。また、この際に、隔離膜、オートファゴソーム、オートリソソーム等、オートファジーの各ステップが観察できた。即ち、Atg5 欠損細胞においても、正常細胞と同様のメカニズムによるオートファジーが実行されているものと思われた。また、オートファジーに伴うタンパク質の分解も確認された (図 1B)。以上の結果より、Atg5 を必要としないオートファジーの存在が明らかとなり、このオートファジーを我々は“alternative macroautophagy” (以下、「新規オートファジー」と記す) と命名した⁷⁾。

上述の如く、LC3 と PE との共有結合は、Atg5 依存性のオートファジーに必須の現象である。その為に、この現象はオートファジーの多寡を示す良い指標として認識されてきた⁸⁾。そこで、新規オートファジーにおける LC3 の変化を検討した。野生型の細胞にオートファジーを誘導すると、GFP 融合 LC3 (以下 GFP-LC3) は細胞質から隔離膜に移動し、この為 GFP-LC3 の局在はドット状に観察された。一方、Atg5 欠損細胞では、オートファジーを誘導しても GFP-LC3 の変

化は見られなかった (図 1C)⁸⁾。即ち、新規オートファジーには LC3 の変化は伴わないものと考えられた。

4. 新規オートファゴソームの形成は隔離膜とトランス・ゴルジ/エンドソームの融合によりおこる

それでは、このような新規オートファジーはどのようなメカニズムによって実行されるのであろうか? まず、既知のオートファジー関連分子の中から新規オートファジーに関わる分子を検討したところ、Ulk1, Fip200, Beclin1 などオートファジー機構の比較的上流で機能する分子群は、新規オートファジーにおいても重要な役割を果たしていることが判明した。一方、Atg7, Atg9, Atg12, Atg16 の関与はみられなかった。これらの分子は、隔離膜からのオートファゴソーム形成に必須と考えられていることから、この反応の代替機構の存在が想定される。この機構を解析するため、微細構造観察等による検討を行った。その結果、①隔離膜はゴルジ体のトランス側 (トランス・ゴルジ) より伸張してくること、②オートファゴソームの形成は、隔離膜とゴルジ体輸送小胞/エンドソームとの融合によって行われていること、を見出した。実際に、トランス・ゴルジやエンドソームの融合を担っている低分子量 G タンパク質 Rab9⁹⁾ は、オートファゴソーム/オートリソソーム上に存在していた。また、Rab9 の発現を抑制すると新規オートファジーの誘導は妨げられた⁷⁾。これらの結果より、新規オートファジーにおけるオートファゴソーム形成は、Rab9 を介した隔離膜とトランス・ゴルジ/エンドソームとの融合によって実行されるものと考えられた (図 2)。

5. 生体内での新規オートファジーの役割

最後に、新規オートファジーの生体内での存在を、Atg5 欠損胎仔を用いて検討した。その結果解析した全ての臓器 (間脳、心臓、肝臓) において、新規オートファジーの存在が確認された。また赤血球を観察したところ、この新規オートファ

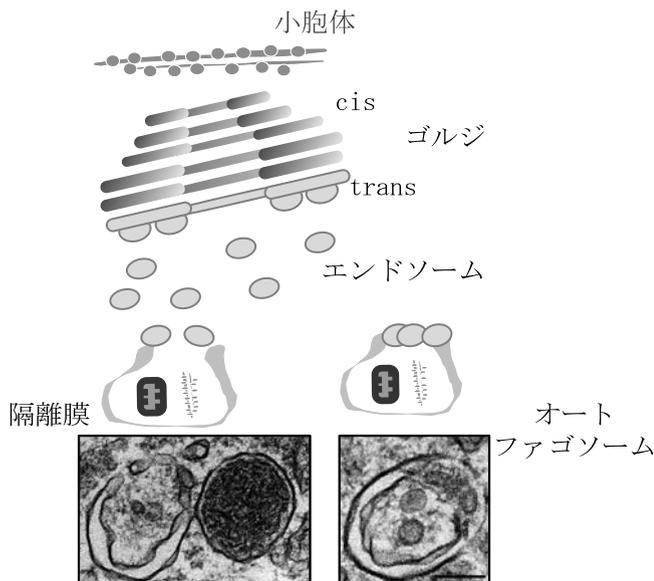


図2 Atg5非依存性オートファジーの実行機構の模式図

新規オートファジーにおけるオートファゴソーム形成は、隔離膜とトランス・ゴルジ/エンドソームとの融合によって実行される。電子顕微鏡像にて、融合途中の隔離膜（左）と融合が終了したオートファゴソーム（右）を示す。Scale bar = 0/1 μ m.

ジーは赤血球の最終分化時におけるミトコンドリアの排除にも貢献していた⁷⁾。新規オートファジーの制御分子であるUlk1を欠損したマウスにおいて、赤血球のミトコンドリア除去が遅延することも報告されており¹⁰⁾、新規オートファジーが赤血球におけるミトコンドリア排除に関わっていることは間違いないと思われる。このように、哺乳類のオートファジーにはAtg5依存性の従来から知られているオートファジーとAtg5に依存しない新規オートファジーの少なくとも2種類が存在しており、両者は細胞の種類や刺激の種類によって使い分けられているものと思われる（図3）。

6. おわりに

本稿では、Atg5やAtg7に依存しない新規オートファジー機構に関して概説したが、現状において、新規オートファジーの全体像が明らかになっている訳ではない。具体的には、①新規オートファジーのメカニズムの詳細、②2種類のオートファジーの機能分担や相補性、③過去に報告されてきたオートファジーの形態学的な観察結果は、どちらのオートファジーに由来しているか、④種々の疾患との関連性、など、今後解決していきべき問題は多い。

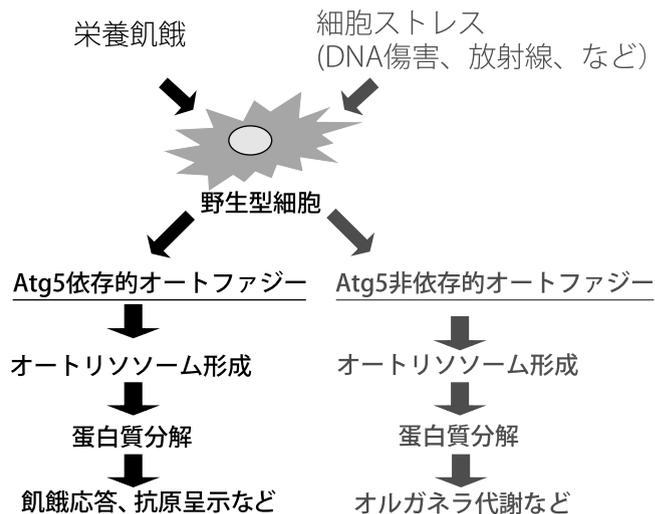


図3 哺乳動物にはAtg5に依存したオートファジーと依存しないオートファジーが存在しており、両者は刺激依存的に使い分けられているものと考えられる。

謝 辞

本研究成果は、主に医薬基盤研究所の委託事業「オートファジー細胞死の制御を基盤とした癌分子標的治療薬の開発」にて為されたものである。

文 献

- 1) Ashford, T.P. and Porter, K.R.: *J. Cell Biol.*, 12, 198–202 (1962)
- 2) Novikoff, A.B. and Essner, E.: *J. Cell Biol.*, 15, 140–146 (1962)
- 3) Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. and Ohsumi, Y.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 458–467 (2009)
- 4) Yang, Z. and Klionsky, D.J.: *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 335, 1–32 (2009)
- 5) Mizushima, N.: *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 335, 71–84 (2009)
- 6) Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T. and Mizushima, N.: *Nature*, 432, 1032–1036 (2004)
- 7) Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y. and Shimizu, S.: *Nature*, 461, 654–658 (2009)
- 8) Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.: *EMBO J.*, 19, 5720–5728 (2000)
- 9) Riederer, M.A., Soldati, T., Shapiro, A.D., Lin, J. and Pfeffer, S.R.: *J. Cell Biol.*, 125, 573–582 (1994)
- 10) Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C.Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M.A., Ney, P.A. and Thompson, C.B.: *Blood*, 112, 1493–1502 (2008)