

1. 研究課題名：オートファジーの分子機構と生理的役割

? オートファゴソームはいつ、どこで、どのように作られるか ?

2. 研究者氏名：水島 昇

3. 研究のねらい

生命を維持するためには、一旦合成したタンパク質を環境変化に応じて適切に分解処理する必要がある。オートファジーはリソソームにおける非特異的な主要分解機構であり、すべての真核生物に保存されている。しかし、オートファジーの分子機構はまだほとんど不明である。本研究では酵母および動物細胞を用いてオートファゴソームの形成機構を明らかにし、それを足がかりとして哺乳動物におけるオートファジーの生理的役割の研究へと発展させることを目指した。

4. 研究結果

(1) オートファゴソーム形成の分子機構

真核細胞は二つの主要な細胞内分解系をもっている。ひとつはユビキチン・プロテアソーム系であり、これは厳密な認識機構をもった選択的タンパク質分解系である。一方、オートファジーは大部分の長寿命タンパク質やミトコンドリアなどのオルガネラを分解する大規模なバルク分解系である。図 1 に示すようにオートファジーは巧妙な膜動態を伴うが、

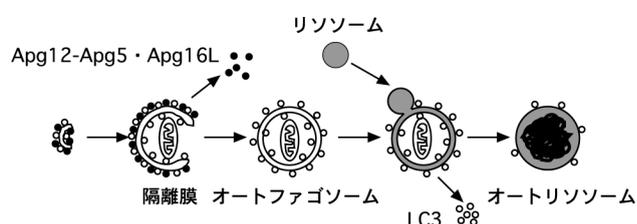


図 1 オートファジーの模式図と Apg タンパク質の局在

その分子メカニズムは不明な点が多かった。私は Apg12 と Apg5 という二つのタンパク質が共有結合するという極めて特殊な翻訳後修飾システムを発見し、これが酵母オートファジーに必須であることを見出した。そこで本さきがけ研究ではこのシステムを手がかりに、オートファゴソーム形成の分子機構の解析を行った。酵母を用いたその後の研究によって、Apg12-Apg5 結合体が機能するには、さらに別の分子 Apg16 と結合することが必要であり、これらは Apg12-Apg5-Apg16 複合体としてはじめて機能することを示した。一方、得られた知見を哺乳動物へと応用することによって、ほとんど未知であった動物細胞のオートファジーのメカニズムの研究に着手することができた。まず Apg12 と Apg5 ホモログを単離し、それらが酵母と全く同様の結合反応によって共有結合することを明らかにした。さらに、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) の APG5 遺伝子をホモに破壊することによって、哺乳動物においてもこの結合システムがオートファジーに必須であることを示した。結果としてオートファジーの機能を完全に欠損した初めての動物細胞を作成し得た。この細胞は正常に増殖するが、アミノ酸飢餓時のバルク分解が著明に低下しており、オートファジーが実際に主要な細胞内分解系であることを直接的に示した。次に、詳細な局在などの解析の結果、Apg12-Apg5 共有結合体がオートファゴソーム完成前の隔離膜に特異的に局在し、その膜の伸長に必須であることを示した (図 1)。そして、生きた細胞内で蛍光標識した Apg5 を観察することによって、オートファゴソームが形成される過程を実時間観察することに初めて成功した。オートファゴソームがどのように形成されるかは依然多くの謎があるが、一連の研究によって、小さな膜がその場で伸長して形成されることが示された。

(2) 哺乳動物個体におけるオートファジーの意義

酵母では、栄養飢餓時の生存維持、胞子形成の際の細胞再構築にオートファジーが重要であることが明確に示されている。一方、哺乳動物でのオートファジー研究の歴史は古いものの、個体における役割は不明である。酵母の研究に基づいた哺乳動物ホモログの解析の結果、哺乳動物でのオートファジー関連タンパク質を多数得ることができた。そこで、哺乳動物個体におけるオートファジーの進行状況を簡便かつ特異的に観察する目的で、オートファゴソームが蛍光標識される GFP-LC3 トランスジェニックマウスを作成した。このマウスを用いて、いつ、どこでオートファジーが

おこっているかの網羅的解析に着手した。これまで飢餓時の肝臓のオートファジーばかりが強調されてきたが、実際は骨格筋、心筋、外分泌腺（胃主細胞、膵外分泌細胞、精嚢）、胸腺上皮細胞、眼レンズ上皮細胞、肺胞2型上皮細胞、腎足細胞などでもオートファジーが活発におこっていることが観察された。このことは、オートファジーは単に日常的な細胞内タンパク質やオルガネラのリサイクルを担っているだけではなく、各組織で特化した役割を果たしていることを示唆する。

5. 自己評価：

本研究課題ではオートファジーの分子機構と多細胞生物における生理的役割の解明の2本の柱を掲げた。前者については当初の目標に極めて近い成果が得られ、一部は教科書の記載の修正へとつながった。一方、後者の生理的役割については、遺伝子破壊マウスの作製と解析が研究期間内に終了しなかったことが残念であったが、研究は着実に進行し近くその結果が得られる予定である。またオートファジー標識マウスを開発し得たことは大きな成果であり、これは今後のオートファジー研究の非常に重要なツールとなろう。オートファジー研究はこれまでの既存の研究領域には該当しない新しい生命科学の分野であるが、本さきがけ研究において大切な進歩が得られたと考えている。

6. 研究総括の見解：

細胞内の殆どのタンパク質、一部の核酸や糖質、またミトコンドリアなどのオルガネラはオートファジー機構によりゆっくりと分解され、リサイクルされる。まず出芽酵母を用いた研究で、この現象の主要過程であるオートファゴソームの形成に必要なタンパク質3種を検出した。次いでマウスを用いた実験で、これまで認められていた肝臓のみでなく、広く様々な臓器・器官の細胞でもオートファゴソームが、同様なタンパク質の関与のもとで機能することを検証した。これらの成果は、これまで殆ど不明であった細胞内物質リサイクルのメカニズムの解明に糸口を付け、医学におけるリソソーム異常疾患への対応をはじめ、細胞培養工学全般に影響を及ぼすことが期待される。学会奨励賞の受賞と多くの招待講演は、その学術的評価の高さを示している。

7. 主な論文等：

1. Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2002). Formation of the ~350 kD Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 18619-18625.
2. Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 20, 5971-5981.
3. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657-667.
4. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.
5. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720-5728.

その他

受賞：平成13年度日本生化学会奨励賞「オートファジーの分子機構に関する研究：Apg12結合システムの役割」(平成13年10月)
招待講演：19件(うち海外3件)