

図2 オートファジーの模式図

オートファジーは、(1)Ulk1 puncta 形成、(2)オメガソーム形成、(3)隔離膜形成、(4)オートファゴソーム形成、(5)オートリソソーム形成(リソソームとの融合)の順序で進行する。飢餓の場合、Ulk1 puncta 形成は、PP2A による脱リン酸化によって誘導される。一方、DNA 傷害の場合には、p53 の標的分子である PPM1D による脱リン酸化によって誘導される。その後、Atg14L/PI3K を介してオメガソーム以降のステップが進行する。隔離膜の伸長には、Atg5-12 複合体が必須である。LC3 は水溶性であるが、オートファジーに伴って LC3-PE が形成され、Atg5-12 複合体依存的に隔離膜に結合し、オートファゴソーム形成に寄与する。

ンドリア等)を壊す作業を行っている。即ち、新陳代謝を担っているのである。一方、細胞に強いストレスが加わると、オートファジーの活性は一気に上昇し、ストレスにより傷害を受けた細胞内成分を積極的に除去し、細胞を傷害から守ろうとする。放射線に曝露したときに生じるオートファジーが、これに該当する。オートファジーはこのように生理的に重要な役割を果たしているため、その機能に変調が生じると、生体に異常を来すこととなる。

オートファジーの形態はユニークな特徴を有しているため、電子顕微鏡等を用いることによって、オートファジーの多寡を解析することができる。細胞にオートファジー刺激が加わると、最初に刺激固有のシグナル伝達機構が動き、引き続いて Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (Ulk1) の膜への集約(puncta 形成)、オメガソーム形成、隔離膜形成へと進行する(図2)。「柿の種」様の構造物から始まる隔離膜は、伸長すると共に湾曲し、分解するべき細胞質やオルガネラを囲い込み、オートファゴソームと呼ばれる特徴的な二重膜の構造体を形成する。オートファゴソームはリソソームと直接融合し、その結果、オートファゴソームの内容物が、様々なリソソーム消化酵素によって消化される(図2)²⁻⁴⁾。

オートファジーに処理される分解基質に目を向けると、従来は基質の選択性は無く、細胞質成分やオルガネラ等がひとまとめに分解されるものと考えられてきた(バルクオートファジー)。しかしながら、

最近では、特定のタンパク質やオルガネラを選択的に分解する選択的オートファジーの存在が明らかになってきた。例えば、ミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジーや特定の分子を分解するオートファジーが存在するのである。DNA 傷害の際には、Noxa に対する選択的オートファジー(後述)が細胞の生死決定に大きく関わっている。

3 DNA 傷害によるオートファジーの分子機構

哺乳動物細胞においてオートファジーの実行に関わる分子は、これまでに 30 種類以上発見されており、栄養飢餓時に誘導されるオートファジーを対象に、詳細な分子メカニズムが解明されてきた(図2)。これらの分子の中でも、Ulk1、PI3 キナーゼ(PI3K)、Atg5、Atg7、LC3 等は、オートファジーの実行には欠かせない分子として考えられている²⁻⁴⁾。Ulk1 は定常状態で mTORC1 や AMPK によってリン酸化されている。飢餓刺激が加わると、mTORC1 や AMPK の刺激が途絶えると共に PP2A が活性化されて、Ulk1 が脱リン酸化される。脱リン酸化された Ulk1 は、ミトコンドリア融合小胞体膜の局所に集まって来るため、Ulk1 を可視化すると細胞質中の puncta として観察される。その後、Atg14L/PI3K が活性化され、オメガソーム形成へと進行する。続いて起こる隔離膜の伸長やオートファゴソーム形成には Atg5 や LC3 が重要な役割を担っている。LC3 は水溶性タンパク質のため、通常は細胞質に存在しているが、オートファジー誘導時には phosphatidyl ethanolamine (PE) が共有結合して脂質化し、オートファジー膜に局在するようになる。この現象は、オートファジーの指標として頻用されている(図2)。

このように飢餓誘導性オートファジーの分子機構は、詳細に解析されてきたが、一方で、DNA 傷害によって誘導されるオートファジーの実行メカニズムはほとんど手つかずであった。筆者らは、このメカニズムを明らかにするために、まず DNA 傷害に関わる細胞現象のマスターレギュレーターである p53 の関与を検討した。即ち、正常細胞と p53 欠損細胞における DNA 傷害誘導性オートファジーの多寡を検討したのである。その結果、p53 欠損細胞では、このオートファジーがほぼ完全に抑制されていることが分かり、p53 の必要性が明確に示された⁵⁾

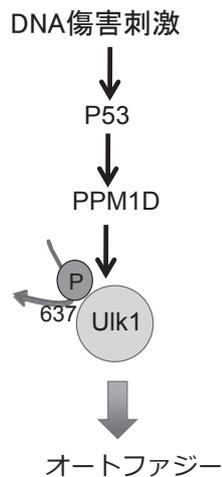


図3 DNA 傷害時のオートファジーは PPM1D による UIk1 脱リン酸化を介して実行される

模式図。DNA 傷害によって、p53 依存的に PPM1D の発現が上昇し、UIk1 が脱リン酸化される。その結果、オートファジーが誘導される。

(図2)。なお、栄養飢餓に対しては、正常細胞も p53 欠損細胞も同程度のオートファジーが誘導されていた。

UIk1 puncta 形成以降は、DNA 傷害誘導性オートファジーも飢餓誘導性オートファジーと同様の分子が関わっていることが予想されたため、実際に UIk1 欠損細胞を用いて検討したところ、UIk1 の必要性が確認された。次に、p53 を介して UIk1 にかかるシグナルが伝達されるかを検討した。その結果、以下の事実の発見に至った。即ち、(1) DNA 傷害を加えると、p53 依存的に UIk1 の 637 番目のセリン残基が脱リン酸化されること、(2) p53 の下流で UIk1 の脱リン酸化を行う分子は Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1D (PPM1D; 別名 Wip1) であること、(3) PPM1D を欠損させた細胞では、UIk1 (S637) の脱リン酸化が起こらず、オートファジーも誘導されないこと(図3)、である。これらの事実は、PPM1D が UIk1 の脱リン酸化を介してオートファジーを正に調節していることを意味する。PPM1D とは、p53 転写調節を受けながら p53 を負に調節している分子であるが、CHK1 等他の DNA 傷害応答に関わる分子に関してもリン酸化制御を行っている。今回の研究によって、UIk1 が PPM1D の下流分子の新たな仲間であることが明らかとなった。

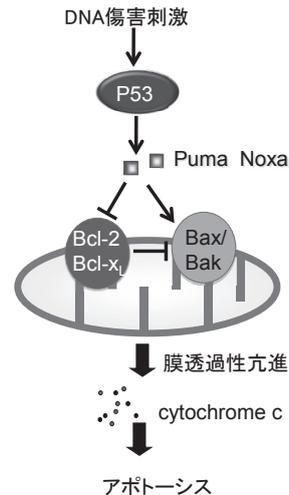


図4 DNA 傷害によるアポトーシスシグナル伝達経路

DNA 傷害により、p53 の転写依存的に Puma, Noxa (BH3-only タンパク質) が発現上昇する。これらの分子は Bax/Bak に働きかけて、ミトコンドリアの膜透過性を亢進する。Bcl-2/Bcl-x_L はこれを負に調節する。ミトコンドリア膜透過性が亢進すると、cytochrome c が細胞質に放出されて、カスベースを介したアポトーシスが実行される。

4 DNA 傷害によるアポトーシスのメカニズム

では、この DNA 傷害誘導性オートファジーの役割はどのようなものであろうか？これを説明する前に、DNA 傷害によるアポトーシスの実行メカニズムを概説する。アポトーシスのシグナル伝達機構は、ミトコンドリアを経由するマシナリーと細胞死レセプターを用いるマシナリーの2つに大別されるが、DNA 傷害によるアポトーシスは前者に該当する⁶⁾。このアポトーシスが実行される際には、まず p53 が決定的な役割を果たしている(図4)。これは p53 欠損細胞が放射線誘導性アポトーシスにほぼ完全に抵抗性を示す事実や、p53 の点突然変異と放射線誘導性アポトーシスの多寡との間に強い相関がある事実等により支持されている。p53 は標的遺伝子のプロモーター部位に結合し、Puma, Noxa 等のタンパク質の発現を促す。これらのタンパク質は、アポトーシス制御遺伝子群 Bcl-2 ファミリーのうち BH3-only タンパク質の範疇に属し、アポトーシスシグナルをミトコンドリアに伝えるメデイエーターの役割を果たしている。これらの分子がミトコンドリアにアクセスすると、Bax 若しくは Bak 依存的にミトコンドリアの外膜透過性が亢進し、外膜と内膜の間の膜間腔に存在するシトクロム c が細胞質に漏出する。シトクロム c はアダプター分子である Apaf-1 を介し

て細胞死実行プロテアーゼであるカスパーゼを活性化し、生存に必要な多数のタンパク質群を分解することによりアポトーシスを実行する⁷⁾。

5 オートファジーによる DNA 傷害性アポトーシスの抑制

DNA に傷害が加わると、p53 依存的にオートファジーとアポトーシスが誘導されるために、両者の間に何らかの関連性が存在することが疑われる。そこで、正常マウスと PPM1D 欠損マウスから胸腺細胞を単離し、放射線照射によるオートファジーとアポトーシスを定量評価した。その結果、PPM1D 欠損細胞は正常細胞に比べてオートファジーが誘導されず (p62 が分解されていない)、アポトーシスに対する感受性が高い (active caspase3 の発現が多い) ことが判明した。更に、前述したアポトーシス分子機構のうち、どの分子に影響が認められるかを検討したところ、Noxa 分子の発現のみがオートファジーによる影響を受けていることが判明した。オートファジーの役割がタンパク質分解であることを考えると、Noxa が選択的オートファジーによって直接分解されている可能性が考えられた。実際、Noxa は、(1)LC3 と共局在すること、(2)オートファジーの分解基質として LC3 に認識される配列 (LIR モチーフ) を有していること、(3)このドメインを改変すると Noxa の分解が抑制されることより、オートファジーの直接の分解基質であることが明らかとなった。これらの事実により、正常胸腺細胞では、放射線誘導性オートファジーが Noxa を分解し、その結果アポトーシスを抑制していることが明らかとなった (図 5)。

6 おわりに

今回の筆者らの発見により DNA 傷害によるオー

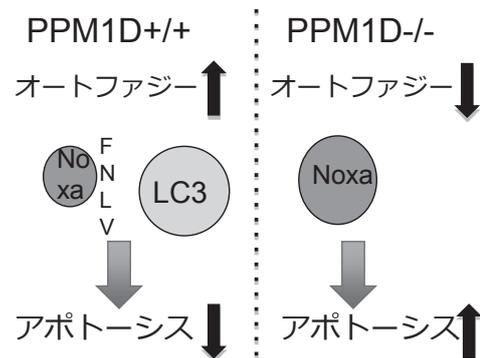


図 5 DNA 傷害時のオートファジーは Noxa を分解してアポトーシスを抑制する

模式図。正常細胞では、p53 の転写によって発現した Noxa が LIR 配列を介して LC3 と結合してオートファジーによって分解される。このため、アポトーシスの程度は弱い。一方で、PPM1D を欠損している、オートファジーが起こらないため、Noxa の発現量が高くなり、アポトーシスが過剰に誘導される。

トファジー実行機構の大枠は明らかにされたように思われる。また、このオートファジーが、アポトーシス抑制に寄与していることも明らかとなった。オートファジーが、放射線障害を緩和する仕組みの 1 つとして機能していることが明らかになったことより、今後放射線障害防護の 1 つの方法としてオートファジー誘導が有効性を示すものと考えられた。

参考文献

- 1) P. Fei, W.S. El-Deiry, *Cell Death Differ.*, **22**, 5774 (2003)
- 2) N. Mizushima, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **335**, 71 (2009)
- 3) H. Nakatogawa, *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 458 (2009)
- 4) Z. Yang and D.J. Klionsky, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **335**, 1 (2009)
- 5) S. Torii, *et al.*, *EMBO R.*, **17**, 1552 (2016)
- 6) A. Konishi, *et al.*, *Cell* **114**, 673 (2003)
- 7) Y. Tsujimoto and S. Shimizu, *FEBF Lett.* **466**, 6 (2000)