

オートファゴソーム形成機構の最新像

中戸川 仁, 小谷 哲也

オートファゴソームの形成はマクロオートファジーを象徴するイベントである。隔離膜と呼ばれる小さな扁平状の膜小胞が分解対象を飲み込むように大きく伸展し、球状となり、閉じて、二重膜小胞であるオートファゴソームが完成する。マクロオートファジーの誘導機構や、完成したオートファゴソームとリソソーム／液胞との融合機構についてはここ数年で理解が大きく進んだ。一方、オートファゴソーム形成におけるダイナミックな膜動態を支えるメカニズムにはいまだ多くの謎が残されている。しかしながら、最近の研究によりその全容解明の糸口がみえてきた。本稿では、前駆体膜の形成から隔離膜の伸張、そして閉鎖まで、オートファゴソーム形成機構の最新像を紹介する。

1. はじめに

マクロオートファジーにおいては、さまざまな細胞成分が“オートファゴソーム”と呼ばれる二重膜小胞（2枚の脂質二重層で仕切られた小胞）内に隔離され、リソソームあるいは液胞に輸送され、分解される^{1,2)}（図1）。オートファゴソームは“隔離膜”と呼ばれる扁平な膜小胞が湾曲しながら球状に伸展して形成される。この過程で、湾曲した隔離膜の凹面に結合する分子やオルガネラなどは“選択的”に、隔離膜の凹面側に偶然存在した細胞質は“非選択的”にオートファゴソーム内に封入されることになる³⁻⁵⁾（選択的オートファジーについては小松の稿、松田の稿を参照）。細胞の種類や条件にもよるが、直径1μm程度のオートファゴソームが約10分で完成する。このダイナミックな膜現象に多くの研究者が興味を持ち、その謎の解明に取り組んできた。大隅良典博士は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてオートファゴソームの形成に必要な autophagy-related (ATG) 遺伝子／タンパク質を発見し、これらの分

子機能や細胞内動態を解析し、オートファゴソーム形成の分子メカニズムを明らかにしてきた。その業績が評価され、2016年、大隅博士はノーベル生理学・医学賞を受賞した。しかし、マクロオートファジーのメカニズムには、本稿で議論するように、まだ基本的な問題が解明されずに残されている。それでも、最近の研究により全容解明の糸口がみえてきたように思われる。本稿では、そのような成果を中心に、オートファゴソーム形成機構の最新像を概説する。

2. Atg タンパク質

Atg タンパク質には、分解標的のオートファゴソームへの選択的取り込みに関わるもの（オートファジー受容体など）も含まれるが、オートファゴソームの形成に関わるものは“コア”Atg タンパク質と呼ばれる^{3,4)}。コア Atg タンパク質は六つの機能ユニット、すなわち、① Atg1/ULK1 タンパク質リン酸化酵素複合体、② Atg9/ATG9 小胞、③ ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ複合体I (PI3K 複合体I)、④ Atg2-Atg18/ATG2-WIPI 複合体、⑤ Atg12-Atg5-Atg16/ATG12-ATG5-ATG16L 複合体（以下、Atg16/ATG16L 複合体）、⑥ Atg8 ファミリータンパク質-ホスファチジルエタノールアミン (PE) 結合反応系を構成している（スラッシュの後は哺乳類ホモログの名称）（図2）。マクロオートファジーが誘導されると、これらの機能ユニットはまず、オートファゴソーム形成の場を集積し、pre-autophagosomal structure (PAS) を構築する⁶⁾。オートファゴソーム形成の場は、出芽酵母では液胞と小胞体の近傍⁶⁾、

東京工業大学生命理工学院 (〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 B-20)

The latest image of the mechanisms of autophagosome formation
Hitoshi Nakatogawa and Tetsuya Kotani (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, B-20 4259 Nagatsuta-cho Midoriku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910602

© 2019 公益社団法人日本生化学会

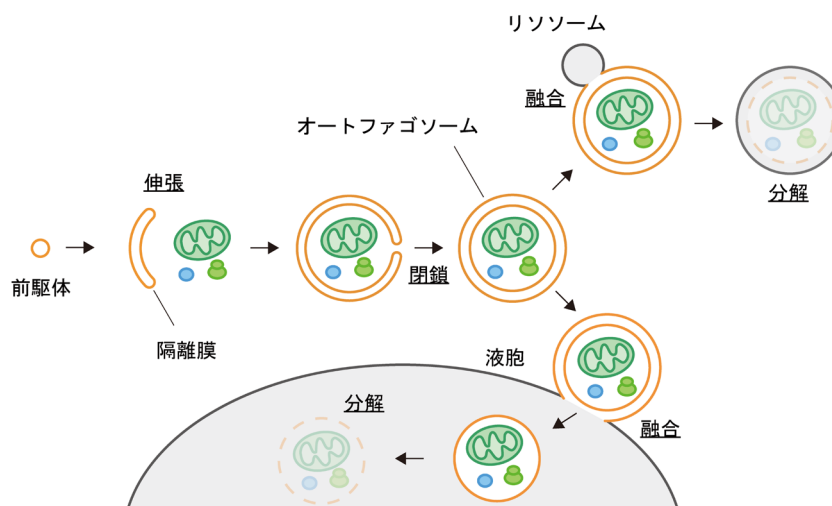


図1 マクロオートファジーのプロセス

マクロオートファジーでは、コアAtgタンパク質の働きにより前駆体膜（どのようなものかは未解明）が形成され、これが伸張して隔離膜となり、球状となった隔離膜の開口部が閉鎖してオートファゴソームが完成する。オートファゴソームの外膜がリソソームあるいは液胞の膜と融合し、オートファゴソーム内に隔離された細胞内成分がオートファゴソームの内膜とともに、リソソーム／液胞内の酵素によって分解される。

哺乳類では小胞体上（特にミトコンドリアとの接触部位）とされているが⁷⁻⁹⁾、これらがどのように決定されるのかは不明である。

3. オートファゴソーム前駆体の形成機構

オートファジーは細胞内外のさまざまな環境変化や分解標的の出現などを引き金として誘導されるが¹⁰⁾、ここではオートファジーが強く誘導される栄養（アミノ酸）飢餓におけるメカニズムを述べていく。出芽酵母のAtg1複合体は、Atg1, Atg13, Atg17, Atg29, Atg31からなる^{11, 12)}。Atg17, Atg29, Atg31は恒常的に複合体を形成しているが、富栄養条件では、Atg13がTorキナーゼ複合体1（TORC1）によってリン酸化され、Atg1およびAtg17との相互作用が阻害されることでAtg1複合体の形成が抑制されている¹³⁻¹⁵⁾。飢餓に伴いTORC1の活性が低下すると、Atg13が脱リン酸化状態となり、Atg1複合体が形成される^{13, 14)}。さらに、Atg1複合体内のAtg13が別のAtg1複合体内のAtg17と結合することで複合体間を架橋し、複数のAtg1複合体からなる超会合体が形成され、これがPAS構築の“足場”となる¹⁶⁾（詳細は野田の稿を参照）。ULK1, ATG13, FIP200, ATG101からなる哺乳類のULK1複合体もTORC1によるリン酸化を介した制御を受けるが、出芽酵母のAtg1複合体とは異なり、複合体形成のステップでは制御されていないようである¹⁷⁻²⁰⁾。また、ULK1複合体もオートファジーの誘導に応じて集合するが^{8, 21)}、Atg1複合体にみられるようなメカニズムで超会合体を形成するかについては不明である。

Atg1複合体による足場が形成されると、Atg13のHORMAドメインとAtg9との相互作用を介してAtg9小胞がPASに招集される²²⁾。Atg9小胞は膜タンパク質であるAtg9が積み込まれたゴルジ体由来の直径50nmほどの膜小

胞である^{23, 24)}。Atg9小胞は長らくオートファゴソーム形成における膜の供給源と考えられてきた。この考えと合致して、隔離膜および完成したオートファゴソームの膜にもAtg9の存在が確認された^{23, 25)}。しかし、一つのオートファゴソームを形成する間にAtg9小胞は数個程度しか招集されないことから、Atg9小胞は主要な膜供給源ではなく、オートファゴソーム膜を形成するための“シード”となっていると考えられる²³⁾。Atg9小胞は続いてPASに局在化してくる他の因子の働きでその組成や形態を変化させ、“隔離膜前駆体”となると考えられるがその詳細は不明である。哺乳類では、ATG16Lを含む小胞とATG9を含む小胞が細胞膜から別々に形成され、ATG16L陽性小胞はATG16L陽性小胞どうしでの融合を経て、リサイクリングエンドソームにてATG9陽性小胞と融合し、オートファゴソーム前駆体となることが提唱されているが^{26, 27)}、広く受け入れられているとはいえない。

PAS／オートファゴソーム形成場へのAtgタンパク質の局在化については、遺伝学的ヒエラルキー解析や局在化の経時的解析の結果に基づき、逐次局在化モデルが提唱されている^{8, 28, 29)}。遺伝学的ヒエラルキー解析から示唆されるモデルでは、Atg9/ATG9に続いてPI3K複合体Iが局在化し、これに依存してAtg2-Atg18/ATG2-WIPI複合体とAtg16/ATG16L複合体が局在化し、最後にAtg16/ATG16L複合体に依存して、Atg8/LC3が局在化する（図3A）。一方、経時的解析（哺乳類細胞）では、ULK1複合体とATG16L複合体がほぼ同時に、続いてPI3K複合体IとATG2-WIPI複合体がほぼ同時に、そして最後にLC3が局在化するようすが観察されている（図3B）。遺伝学的ヒエラルキー解析では、各ATG遺伝子の破壊細胞における各Atgタンパク質のPAS局在が系統的に調べられたが、遺伝学的に上流に位置する因子は時間的にも先に局在化するであろうという

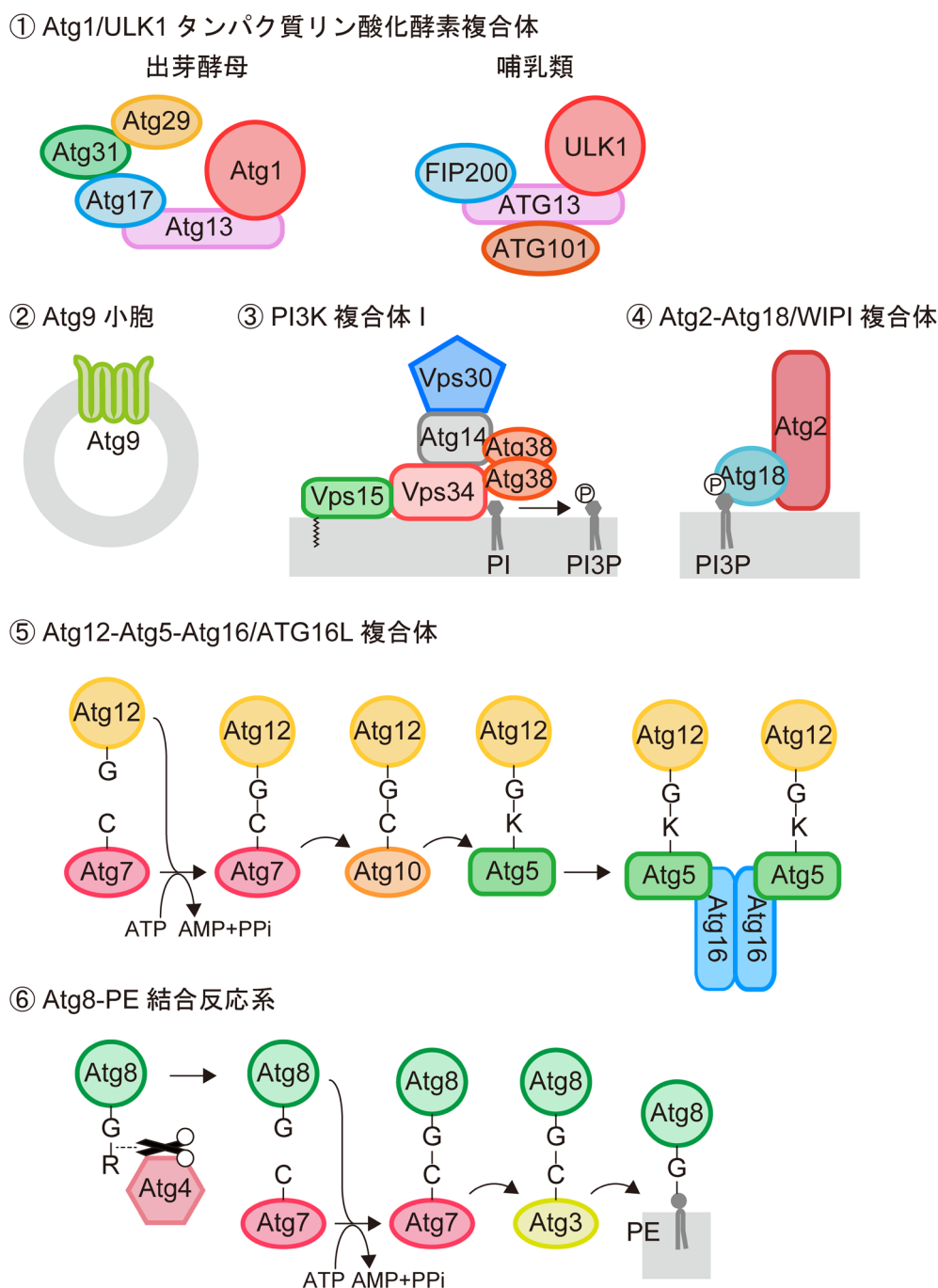


図2 Atgタンパク質の機能ユニット

オートファゴソームの形成に関与するAtgタンパク質は六つの機能ユニットからなる。詳細は本文を参照されたい。

仮定の上での考察であるため、実際の局在順序と合致しない可能性がある。一方、経時的解析は、局在化した（十分に集積した）との判断が蛍光観察の感度やタンパク質ごとの集積量の違いといった要素に影響を受けると考えられるため、やはり実際の局在順序と合わない可能性がある。実際に、Atg8ファミリータンパク質やAtg16/ATG16L複合体はAtg1/ULK1複合体と直接相互作用することが報告されており^{30, 31)}、蛍光顕微鏡では見逃される量のこれらのタンパク質がPAS形成のごく初期にPASに局在化し、機能している可能性が考えられる。PASの形成機構を理解するためには、Atgタンパク質のPAS/オートファゴソーム形成場

への局在化機構をタンパク質間相互作用あるいはタンパク質-脂質間相互作用のレベルで解明し、これらの相互作用がPAS形成の進行に従ってどのように変化していくのかを明らかにしていく必要がある。

4. 隔離膜の伸張機構

オートファゴソームの膜の起源は、オートファジーのメカニズムの研究における最大の謎の一つとしていまだに議論がつきない^{32, 33)}。上述したように、Atg9小胞はオートファゴソームを形成する膜成分の一つといえるが、主要な

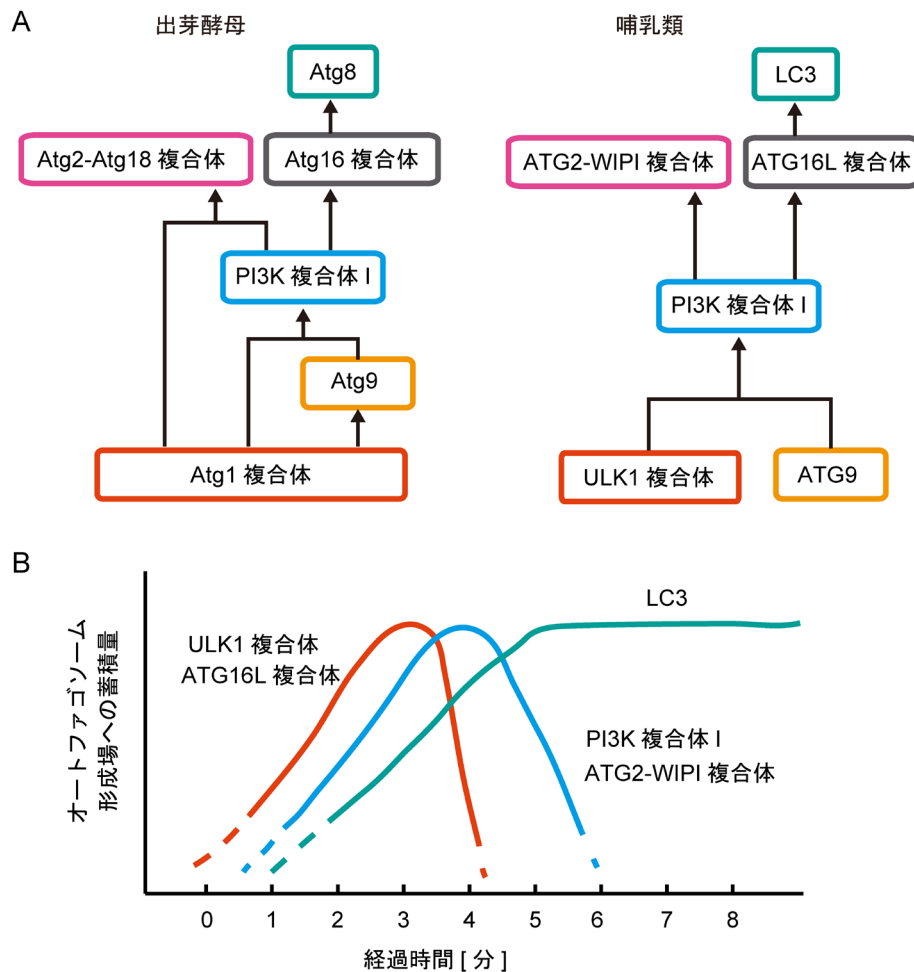


図3 Atg タンパク質のPAS/オートファゴソーム形成場への局在化におけるヒエラルキー
(A) 出芽酵母および哺乳類細胞における遺伝学的解析から示されたPAS/オートファゴソーム形成場への局在化におけるAtgタンパク質のヒエラルキー。矢印の上流の因子が欠損すると下流の因子の局在が消失あるいは低下する。(B) 哺乳類細胞における経時的局在解析によって示されたATGタンパク質のオートファゴソーム形成場への蓄積量の経時変化の模式図。

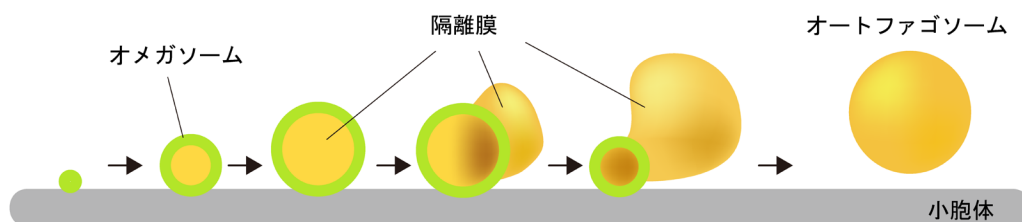


図4 オメガソームとオートファゴソーム形成
哺乳類細胞においては、オートファジーの誘導に応じて、小胞体上にATGタンパク質が招集されると、PI3K複合体Iが産生するPI3Pに富んだリング状の構造体“オメガソーム”が形成される(緑色の部分)。このモデルでは、隔離膜はオメガソームのリング内の膜が突き出すようにして伸張し、形成される。

膜成分は他から供給され则认为られる。これまで、小胞体^{7, 34, 35)} やミトコンドリア³⁶⁾ など、複数のオルガネラがオートファゴソーム形成における膜の供給源であると提唱されてきた。しかしながら近年、小胞体とオートファゴソーム形成との密接な関係が明らかにされてきた。まず、哺乳類細胞において、Atgタンパク質が小胞体上で集積すると、小胞体の一部がホスファチジルイノシトール3-リン酸(PI3P)陽性のリング状のドメインを形成することが

蛍光顕微鏡で捉えられた⁷⁾。このリング状の構造体は“オメガソーム”と名づけられ、このリング内の膜が突き出すように伸張して隔離膜となるモデルが提唱された(図4)。また、電子線トモグラフィーにより、小胞体が隔離膜に張りつくように存在し、ところどころで隔離膜と連結していることも示された^{34, 35)}。さらなる電子線トモグラフィーによる解析の結果、小胞体と隔離膜の開口端が多く細かいチューブでつながっているようすが観察された。オメ

ガソームの超微細形態が捉えられたと考えられ、これらのチューブを介して小胞体の脂質が隔離膜に流入するというモデルが提唱された³⁷⁾。

出芽酵母においては、隔離膜の伸張端が小胞体のCOPII小胞形成部位(ER exit site: ERES)と近接していることが示された^{25, 38)}。COPII小胞は、小胞体で合成されたタンパク質などをゴルジ体へ輸送するための小胞である³⁹⁾。COPII小胞の形成やCOPII小胞とゴルジ体との融合に関わる因子の変異体においてはオートファゴソーム形成が不全となる^{38, 40-42)}。また、オートファジー誘導条件においてCOPIIタンパク質であるSec24がHrr25(カゼインキナーゼ1δ)によってリン酸化され、Atg9と相互作用するようになること、この相互作用がオートファゴソーム形成に重要であることが報告された⁴³⁾。これらの結果は、COPII小胞が隔離膜に融合し、その膜の伸張に寄与する可能性を示唆するものであるが、これに関する実験的証拠は得られていなかった。

あるオルガネラの形成において、別のオルガネラから脂質あるいは膜貫通型膜タンパク質が流入することを示せば、これは後者が前者の形成における膜供給源であることを示す端的な証拠となりえる。しかしながら、COPII小胞の積荷タンパク質に蛍光タンパク質を融合しても、その融合タンパク質の隔離膜やオートファゴソームへの局在化が観察されたことはなかった。最近、理化学研究所の黒川量雄博士、中野明彦博士のグループは、出芽酵母においてCOPII小胞を可視化するシステムを構築した⁴⁴⁾。このシステムでは、COPII因子の温度感受性変異株において、積み荷膜タンパク質Axl2(出芽に関わる細胞膜タンパク質)にGFPを付加し、熱応答性SSA1プロモーター下で発現させる。この細胞を23°C(許容温度)で培養すると、COPII小胞は形成され、Axl2-GFPの発現は抑制される。培養温度を37°C(非許容温度)に上げると、Axl2-GFPの発現が誘導されるが、COPII小胞の形成が停止し、Axl2-GFPは小胞体に蓄積する。ここから温度を再び23°Cに下げると、Axl2-GFPで高度に標識されたCOPII小胞が形成される。我々はこの系を利用し、Axl2-GFPが小胞体からCOPII小胞への積み込みに依存してオートファゴソームの膜(内容物としてではなく)や隔離膜上に移行することを蛍光顕微鏡および免疫電子顕微鏡解析により示すことに成功した⁴⁵⁾。すなわち、COPII小胞がオートファゴソーム形成における膜供給源の一つである実験的証拠を提示した。これにより、「COPII小胞は主要な膜供給源であるのか?」「COPII小胞は膜伸張の材料として使われているのか?あるいは膜伸張に重要な特定の脂質やタンパク質の供給を担っているのか?」など、さらなる課題が明確に提示されることとなった。哺乳類においても、蛍光顕微鏡下においてオートファゴソーム関連膜(LC3の輝点)とERESの近接が観察されること^{38, 46)}や、ULK1複合体のサブユニットであるFIP200がCOPIIタンパク質であるSEC12と相互作用すること⁴⁷⁾が報告されており、COPII小胞がオートファゴソーム形成において膜を供

給していることが示唆される。哺乳類細胞においてもこの可能性について明確な答えが得られることが期待される。

COPII小胞は本来ゴルジ体に向かうべき小胞である。COPII小胞はどのようにしてオートファゴソーム形成の場へリクルートされるのだろうか? 前述したAtgタンパク質とCOPIIタンパク質との相互作用がこのプロセスを担っている可能性がある。また、隔離膜とERESとの物理的な近接によってCOPII小胞の隔離膜へのターゲティングが効率的に起こるのかもしれない。(おそらくはSNAREタンパク質を介する)融合のメカニズムも今後明らかにすべき重要な課題である。

隔離膜と小胞体とのコンタクトサイト形成の分子基盤について、最近大きな進展があった。以前より、出芽酵母において、隔離膜と小胞体(ERES)のコンタクトサイトにAtg2-Atg18複合体が局在化することが見いだされていたが^{25, 38)}、同複合体の分子機能は長らく不明であった。特に、PI3P結合タンパク質であるAtg18は複合体のPASへの局在化に重要であることがわかっていたが⁴⁸⁾、Atg2に関する情報はほとんど得られていなかった。我々は、出芽酵母のAtg2のドメイン解析を行い、Atg2がN, C両末端に独立して機能する二つの膜結合ドメインを持つことを発見した⁴⁹⁾。酵母細胞から単離したAtg2と人工膜小胞を用いて、Atg2にはこれらの二つの膜結合ドメインを介して二つの膜をつなぎ合わせる機能があることを示した。C末端側の両親媒性 α ヘリックスはAtg2自身の膜結合に関与する他、Atg18とPI3Pを含む膜との結合を促進することを明らかにした。このヘリックスを欠損したAtg2変異体は、Atg18との複合体は形成するが、PASへの局在化能を失う。すなわち、C末端側の両親媒性 α ヘリックスは、Atg18とともに、Atg2-Atg18複合体のPASへの結合(局在化)を担うことが示唆された。一方、N末端領域の欠失変異体は、複合体形成およびPASへの局在化には異常を示さなかったが、隔離膜の伸張に欠損がみられた。また、Atg2のN末端46残基をGFPに融合すると小胞体への局在化がみられ、オートファゴソーム形成能が失われる変異をこのN末端領域内に導入すると、融合タンパク質は細胞質に局在するようになった。さらに、N末端欠失変異体に小胞体膜タンパク質であるSec71の膜貫通領域を付加すると、部分的ではあるもののオートファジーの活性が回復した。これらの結果は、間接的ではあるが、Atg2のN末端領域は小胞体膜への結合に関与しており、このようなAtg2の機能は隔離膜の伸張に重要である可能性を示唆している。以上の結果から、Atg2-Atg18複合体はPAS/隔離膜を小胞体につなぎ止める役割を担うことを提唱した⁴⁹⁾(図5A)。我々の報告と前後して、哺乳類のATG2にも膜をつなぎ止める機能があることが示されたが⁵⁰⁾、哺乳類細胞においては、ATG2-WIPI複合体と小胞体との関係はまだ明らかになっていない。今後の解析が待たれる。

一方で、ごく最近、Atg2には膜を繫留するだけでなく、脂質分子を膜から引き抜いて別の膜に輸送する活性(lipid

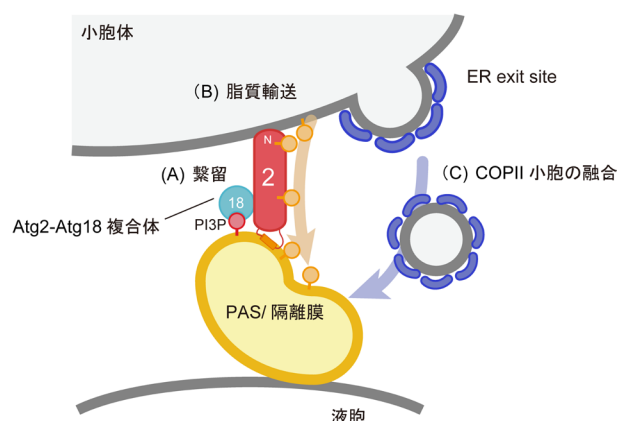


図5 小胞体からPAS/隔離膜への脂質供給機構に関するモデル
Atg2-Atg18複合体はPAS/隔離膜を小胞体上のER exit site (ERES)の近傍につなぎ止める(A)。さらに、Atg2は小胞体から脂質分子を引き抜きPAS/隔離膜へ輸送する(B)(野田の稿も参照されたい)。一方、ERESから形成されるCOPII小胞もPAS/隔離膜と融合し、膜を供給する(C)。詳細は本文を参照されたい。

transfer protein活性)があることが複数のグループによって報告された^{51, 52, 53)}(詳細は野田の稿を参照)。以上の結果をまとめると、Atg2-Atg18複合体は、隔離膜を小胞体のERES近傍につなぎ止め、脂質を直接小胞体から隔離膜へと輸送している可能性がある(図5B)。また、ERESで形成されたCOPII小胞がAtg2-Atg18複合体のごく近傍で隔離膜と融合していることも想像される(図5C)。Atg2-Atg18複合体による繫留がCOPII小胞の隔離膜への融合に重要であるかについてはまだ調べられていない。また、COPII小胞を介した膜輸送とAtg2による脂質輸送との関係も不明である。さらに、哺乳類においては、小胞体からオートファゴソームを介して隔離膜に膜が供給される可能性もある。今後、これらの複数のメカニズムの関係や連携の研究も重要になってくるだろう。

5. 隔離膜の閉鎖機構

隔離膜が伸展し、球状になるにつれて、開口部は収縮していく。最終的には極小となった開口部で膜分裂(membrane fission)が起これ、隔離膜が閉じる(図1)。この過程は、膜融合反応と捉えられることもしばしばあった。しかし、この過程がエンドソーム/多胞体(multivesicular body)での内腔小胞のくびり切りの過程と同等であることや、1枚の膜である隔離膜(扁平な膜小胞)が、開口部の閉鎖後、2枚の膜(オートファゴソームの外膜と内膜)に分かれることを考えると隔離膜の閉鎖は膜分裂と呼ぶべき過程であることが理解されるだろう⁵⁴⁾。この隔離膜の閉鎖のメカニズムも長らく未解明であったが、最近、ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)がこの過程に関わることが報告された。ESCRTはもともと、エンドソーム/多胞体での内腔小胞の形成に必要な因子として同定されたが、その後、細胞膜からのウイルス粒子の出

芽、細胞膜損傷の修復、細胞分裂時の細胞膜の切断、細胞分裂後の核膜再形成など、さまざまなプロセスにおける膜分裂を担うことが明らかにされてきた⁵⁵⁾。隔離膜の閉鎖も同様のプロセスであることから、以前よりESCRTの関与が予測されていたが、最近、哺乳類において、ESCRTが隔離膜の開口部に局在化し、その閉鎖を促進することが示された⁵⁶⁾。また、出芽酵母においても、ESCRTに依存して隔離膜の閉鎖が起こることが報告された⁵⁷⁾。哺乳類細胞におけるESCRTの招集機構は不明であるが、出芽酵母においては、ESCRT IIIのサブユニットであるSnf7がAtg1複合体のサブユニットであるAtg17と相互作用することが示されている⁵⁷⁾。

6. おわりに

本稿では、オートファゴソーム形成における前駆体膜の形成から隔離膜の閉鎖までのメカニズムについて、現時点で我々の理解するところを概説した。ここでは章を立てて述べなかったが、完成したオートファゴソームとリソソーム/液胞の融合機構が解明されたこともオートファジーのメカニズムに関する最近の大きな進展の一つである。哺乳類では、完成したオートファゴソームにR-SNAREであるSyntaxin 17およびYkt6がリクルートされ、可溶性のSNAP29やリソソームに存在するQ-SNAREタンパク質、Rab7およびHOPS複合体とともに、オートファゴソームとリソソームの融合を引き起こす^{58, 59)}。出芽酵母においても、オートファゴソーム上のYkt6が液胞上のSNAREタンパク質(Vam3, Vam7, Vti1), Ypt7(Rab7ホモログ)およびHOPS複合体とともにオートファゴソームと液胞の融合を媒介する^{60, 61)}。オートファゴソームとリソソーム/液胞との融合機構および隔離膜の閉鎖機構についてはその大枠は解明されたといってもよいだろう。一方、前駆体の形成機構および隔離膜の伸張機構については本稿で述べてきたようにいまだ重要な疑問が多く残されている。さらなる解析が必要であることはいうまでもない。しかし、オートファゴソーム形成機構の研究はその全容解明に向けて、着実に前進している。

文 献

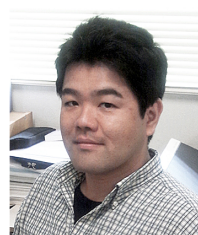
- 1) Ohsumi, Y. (2014) Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.*, **24**, 9–23.
- 2) Yang, Z. & Klionsky, D.J. (2010) Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 814–822.
- 3) Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 458–467.
- 4) Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011) The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 107–132.
- 5) Gatica, D., Lahiri, V., & Klionsky, D.J. (2018) Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat. Cell Biol.*, **20**, 233–242.

- 6) Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.*, **20**, 5971–5981.
- 7) Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N.T. (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **182**, 685–701.
- 8) Itakura, E. & Mizushima, N. (2010) Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, **6**, 764–776.
- 9) Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, **495**, 389–393.
- 10) He, C. & Klionsky, D.J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 67–93.
- 11) Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M., & Ohsumi, Y. (2005) Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 2544–2553.
- 12) Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2008) Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2039–2050.
- 13) Fujioka, Y., Suzuki, S.W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., & Noda, N.N. (2014) Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 513–521.
- 14) Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.*, **150**, 1507–1513.
- 15) Kabeya, Y., Noda, N.N., Fujioka, Y., Suzuki, K., Inagaki, F., & Ohsumi, Y. (2009) Characterization of the Atg17–Atg29–Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 612–615.
- 16) Yamamoto, H., Fujioka, Y., Suzuki, S.W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Ando, T., Noda, N.N., et al. (2016) The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes. *Dev. Cell*, **38**, 86–99.
- 17) Mizushima, N. (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 132–139.
- 18) Ganley, I.G., Lam, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009) ULK1–ATG13–FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.*, **284**, 12297–12305.
- 19) Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D.H. (2009) ULK–Atg13–FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 1992–2003.
- 20) Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 1981–1991.
- 21) Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.L., & Mizushima, N. (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, **181**, 497–510.
- 22) Suzuki, S.W., Yamamoto, H., Oikawa, Y., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., & Ohsumi, Y. (2015) Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3350–3355.
- 23) Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., & Ohsumi, Y. (2012) Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.*, **198**, 219–233.
- 24) Kakuta, S., Yamaguchi, J., Suzuki, C., Sasaki, M., Kazuno, S., & Uchiyama, Y. (2017) Small GTPase Rab1B is associated with ATG9A vesicles and regulates autophagosome formation. *FASEB J.*, **31**, 3757–3773.
- 25) Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., Yamamoto, H., & Ohsumi, Y. (2013) Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, **126**, 2534–2544.
- 26) Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., & Rubinsztein, D.C. (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 747–757.
- 27) Puri, C., Renna, M., Bento, C.F., Moreau, K., & Rubinsztein, D.C. (2013) Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*, **154**, 1285–1299.
- 28) Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*, **12**, 209–218.
- 29) Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T.K., & Mizushima, N. (2013) Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy*, **9**, 1491–1499.
- 30) Harada, K., Kotani, T., Kirisako, H., Sakoh-Nakatogawa, M., Oikawa, Y., Kimura, Y., Hirano, H., Yamamoto, H., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2019) Two distinct mechanisms target the autophagy-related E3 complex to the pre-autophagosomal structure. *eLife*, **8**, e43088.
- 31) Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E., Girardin, S.E., Wilson, M.I., & Tooze, S.A. (2014) WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol. Cell*, **55**, 238–252.
- 32) Lamb, C.A., Yoshimori, T., & Tooze, S.A. (2013) The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 759–774.
- 33) Shibutani, S.T. & Yoshimori, T. (2014) A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.*, **24**, 58–68.
- 34) Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., & Yamamoto, A. (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1433–1437.
- 35) Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E.L. (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, **5**, 1180–1185.
- 36) Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., & Lippincott-Schwartz, J. (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, **141**, 656–667.
- 37) Uemura, T., Yamamoto, M., Kametaka, A., Sou, Y.S., Yabashi, A., Yamada, A., Annoh, H., Kametaka, S., Komatsu, M., & Waguri, S. (2014) A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane. *Mol. Cell Biol.*, **34**, 1695–1706.
- 38) Graef, M., Friedman, J.R., Graham, C., Babu, M., & Nunnari, J.

- (2013) ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol. Biol. Cell*, **24**, 2918–2931.
- 39) Sato, K. & Nakano, A. (2007) Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett.*, **581**, 2076–2082.
 - 40) Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001) Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3690–3702.
 - 41) Tan, D., Cai, Y., Wang, J., Zhang, J., Menon, S., Chou, H.T., Ferro-Novick, S., Reinisch, K.M., & Walz, T. (2013) The EM structure of the TRAPP3 complex leads to the identification of a requirement for COPII vesicles on the macroautophagy pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 19432–19437.
 - 42) Wang, J., Davis, S., Menon, S., Zhang, J., Ding, J., Cervantes, S., Miller, E., Jiang, Y., & Ferro-Novick, S. (2015) Ypt1/Rab1 regulates Hrr25/CK1 δ kinase activity in ER–Golgi traffic and macroautophagy. *J. Cell Biol.*, **210**, 273–285.
 - 43) Davis, S., Wang, J., Zhu, M., Stahmer, K., Lakshminarayan, R., Ghassemian, M., Jiang, Y., Miller, E.A., & Ferro-Novick, S. (2016) Sec24 phosphorylation regulates autophagosome abundance during nutrient deprivation. *eLife*, **5**, 1–22.
 - 44) Kurokawa, K., Okamoto, M., & Nakano, A. (2014) Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nat. Commun.*, **5**, 1–7.
 - 45) Shima, T., Kirisako, H., & Nakatogawa, H. (2019) COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes. *J. Cell Biol.*, **218**, 1503–1510.
 - 46) Zhao, Y.G., Chen, Y., Miao, G., Zhao, H., Qu, W., Li, D., Wang, Z., Liu, N., Li, L., Chen, S., et al. (2017) The ER-localized transmembrane protein EPG-3/VMP1 regulates SERCA activity to control ER-isolation membrane contacts for autophagosome formation. *Mol. Cell*, **67**, 974–989.
 - 47) Ge, L., Zhang, M., Kenny, S.J., Liu, D., Maeda, M., Saito, K., Mathur, A., Xu, K., & Schekman, R. (2017) Remodeling of ER-exit sites initiates a membrane supply pathway for autophagosome biogenesis. *EMBO Rep.*, **18**, e201744559.
 - 48) Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., & Ohsumi, Y. (2008) The Atg18–Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.*, **283**, 23972–23980.
 - 49) Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2018) The Atg2–Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 10363–10368.
 - 50) Chowdhury, S., Otomo, C., Leitner, A., Ohashi, K., Aebersold, R., Lander, G.C., & Otomo, T. (2018) Insights into autophagosome biogenesis from structural and biochemical analyses of the ATG2A–WIP1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E9792–E9801.
 - 51) Osawa, T., Kotani, T., Kawaoka, T., Hirata, E., Suzuki, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., & Noda, N.N. (2019) Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 281–288.
 - 52) Valverde, D.P., Yu, S., Boggavarapu, V., Kumar, N., Lees, J.A., Walz, T., Reinisch, K.M., & Melia, T.J. (2019) ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *J. Cell Biol.*, **218**, 1787–1798.
 - 53) Maeda S, Otomo C, Otomo T. (2019) The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes. *Elife*. Jul 4; 8. pii: e45777.
 - 54) Knorr, R.L., Lipowsky, R., & Dimova, R. (2015) Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy*, **11**, 2134–2137.
 - 55) Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E.M., Campsteijn, C., & Stenmark, H. (2017) Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane-scission machinery. *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 42–56.
 - 56) Takahashi, Y., He, H., Tang, Z., Hattori, T., Liu, Y., Young, M.M., Serfass, J.M., Chen, L., Gebru, M., Chen, C., et al. (2018) An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nat. Commun.*, **9**, 2855.
 - 57) Zhou, F., Wu, Z., Zhao, M., Murtazina, R., Cai, J., Zhang, A., Li, R., Sun, D., Li, W., Zhao, L., et al. (2019) Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *J. Cell Biol.*, **218**, 1908–1927.
 - 58) Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, **151**, 1256–1269.
 - 59) Matsui, T., Jiang, P., Nakano, S., Sakamaki, Y., Yamamoto, H., & Mizushima, N. (2018) Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J. Cell Biol.*, **217**, 2633–2645.
 - 60) Gao, J., Reggiori, F., & Ungermann, C. (2018) A novel in vitro assay reveals SNARE topology and the role of Ykt6 in autophagosome fusion with vacuoles. *J. Cell Biol.*, **217**, 3670–3682.
 - 61) Bas, L., Papinski, D., Licheva, M., Torggler, R., Rohringer, S., Schuschnig, M., & Kraft, C. (2018) Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome–vacuole fusion. *J. Cell Biol.*, **217**, 3656–3669.

著者寸描

●中戸川 仁（なかとがわ ひとし）



東京工業大学生命理工学院准教授。博士（理学）。

■略歴 1974年神奈川県に生る。97年中央大学理工学部卒業。99年京都大学大学院理学研究科修士課程修了。2002年同博士課程修了。以後、日本学術振興会特別研究員、基礎生物学研究所助教、JSTさきがけ研究者、東京工業大学フロンティア研究機構特任助教、特任准教授などを

経て、16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.nakatogawa-lab.bio.titech.ac.jp/>

■趣味 趣味ではないが、仕事以外の時間は専ら2人の子供に向けられている。

●小谷 哲也（こたに てつや）



東京工業大学生命理工学院中戸川研究室博士研究員。博士（生命科学）。

■略歴 1986年大阪府に生る。2008年東京大学工学部卒業。13年同大学院新領域創成科学研究科にて学位取得。その後、東京工業大学フロンティア研究機構博士研究員を経て、16年より現職。

■研究テーマと抱負 オートファゴソーム形成における膜伸張メカニズムの解明。オートファゴソームの膜がどこからどのようにして供給されるのかを明らかにして、オートファゴソーム形成反応を試験管内で再構成したい。

■ウェブサイト <http://www.nakatogawa-lab.bio.titech.ac.jp>

■趣味 スポーツ観戦。