

タンパク質分解機構 Golgi membrane-associated degradation (GOMED) の分子機構と生理機能

清水 重臣

オートファジーは、リソソームを利用し、自己構成成分を分解する細胞機能であり、小胞体膜を起源として Atg5 分子などを用いて実行される。一方、我々は、同様にリソソームを利用し、自己構成成分を分解するものの、ゴルジ体膜を起源として Atg5 分子などを用いない Golgi membrane-associated degradation (GOMED) pathway を発見した。GOMED 実行には、Ulk1, Wipi3, Rab9 などが関わっている。両者が分解する蛋白質の種類は異なっているために生体での役割は自ずと異なってくる。GOMED はインスリン分泌制御や神経細胞の維持、赤血球分化など幅広い生命現象において決定的な役割を果たしている。

1. はじめに

ゴルジ体は、分泌タンパク質や細胞膜タンパク質を目的の場所に適切に運搬するために、糖鎖付加などのタンパク質修飾を行うなど、細胞内の分子輸送を担っている細胞小器官（オルガネラ）である。これらのタンパク質は、小胞体で合成され、ゴルジ体のシス槽、メディアル槽、トランス槽を順に経路する間に、適切な修飾を受け、適切な目的地が設定され、小胞輸送によって運搬される。このようなゴルジ体の古典的な機能に加えて、我々は最近、ゴルジ体膜を利用した新たな細胞内タンパク質分解機構を発見し、Golgi membrane-associated degradation (GOMED) pathway と命名した。GOMED は、その形態学的な特徴や機能の類似性から、当初、新規オートファジー (alternative autophagy) と命名したが、解析が進むにつれて、通常のオートファジーとは多くの面で異なっていることが明らかとなった。形態学的にはオートファジーの一種であるものの、別の細胞機能と考えられることから GOMED の名称とした。GOMED は生体におけるさまざまな臓器において、生体の恒常性を維持するために決定的な役割を果たしている。本

稿では、GOMED の発見の経緯を含め、最新の知見を紹介する。

2. GOMED の発見

マクロオートファジー（以下、オートファジー）は、細胞内のタンパク質などを大量に分解する機構として詳細な解析がなされている。オートファジーは、オメガソームと命名された小胞体膜の一部を起点として形成される。その初期段階では、まず隔離膜と呼ばれる「柿の種」様の構造物が形成される。この隔離膜は伸長するとともに湾曲し、細胞質やオルガネラを囲い込み、最終的には両端が融合して二重膜構造のオートファゴソームができていく。オートファゴソームが形成されると、その後リソソームが直接融合してオートリソソームとなり、囲い込まれた内容物が、リソソームに含まれる消化酵素によって分解される^{1,2)} (図1)。リソソームには、カテプシンなどのタンパク質分解酵素、リソソーム酸性リパーゼ、DNase II などさまざまな種類の消化酵素が含まれているため、内容物はほぼ完全に分解される。このようなオートファジーが実行されるためには、Atg5 や Atg7 などのコア実行分子が必要であると考えられている。

我々は、このようなオートファジーを解析するために、野生型マウスと Atg5 欠損マウスより細胞を調製し、まずラパマイシン (mTor 阻害を介してオートファジーを誘導する) を投与したところ、野生型細胞においてオートファジー構造やタンパク質分解が認められた。一方、Atg5 欠損細胞においてはこのような反応はまったく認められず、Atg5 依存的にオートファジーが実行されていることが確

東京医科歯科大学難治疾患研究所病態細胞生物 (〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45)

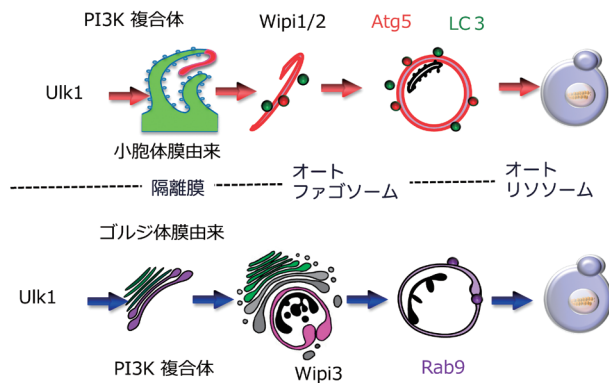
Molecular mechanisms of Golgi membrane-associated degradation (GOMED) and its physiological relevance

Shigeomi Shimizu (Tokyo Medical and Dental University, Medical Research Institute, Pathological Cell Biology, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930466

© 2021 公益社団法人日本生化学会

一般的なオートファジー



GOMED

図1 オートファジーとGOMEDの比較

オートファジーもGOMEDも、(1)隔離膜の形成、(2)伸長、(3)オートファゴソームの形成、(4)オートリソソームの形成(リソソームと融合)の順序で進行する。また、Ulk1を起点とし、PI3K複合体を介して実行される。オートファジーの場合には、小胞体膜を起源とし、Wip1/2を経由して隔離膜が伸長する。Wip1/2の下流では、Atg5が必須分子であり、LC3はAtg5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。一方、GOMEDの場合には、ゴルジ体膜を利用してWip3ならびにRab9依存的にオートファゴソーム形成が進行する。

認された。ところが、同じ細胞にエトポシド(DNA傷害誘導剤)を投与したところ、Atg5欠損細胞においても、野生型細胞とほぼ同程度に、隔離膜、オートファゴソーム、オートリソソームが出現し、それによるタンパク質分解も認められた(図2)。すなわち、Atg5不存在下でも、オートファジー様構造とそれによるタンパク質分解が生じることが見いだされたのである³⁾。de Duveが定義づけたオートファジー⁴⁾は、二重膜で囲まれたオートファゴソームの形成と、その内容物のリソソームによる融解であるため、エトポシド投与で出現したAtg5非依存性のオートファジー様構造も、オートファジーの定義に合致するものであった。

3. オートファジーとGOMEDの比較

Atg5非依存性のオートファジー様構造体について解析を進めたところ、通常のオートファジーとの共通点としては、隔離膜、オートファゴソーム、オートリソソームの細胞内構造の形態がほぼ同一であることが見いだされた(図2)。また、酵母細胞から哺乳動物細胞まで進化的に保存されている点も共通していた。一方、相違点に関しては、誘導刺激が異なるほか、オートファジー膜の起源や主な実行分子が異なっていた。特に重要な点は、分解され

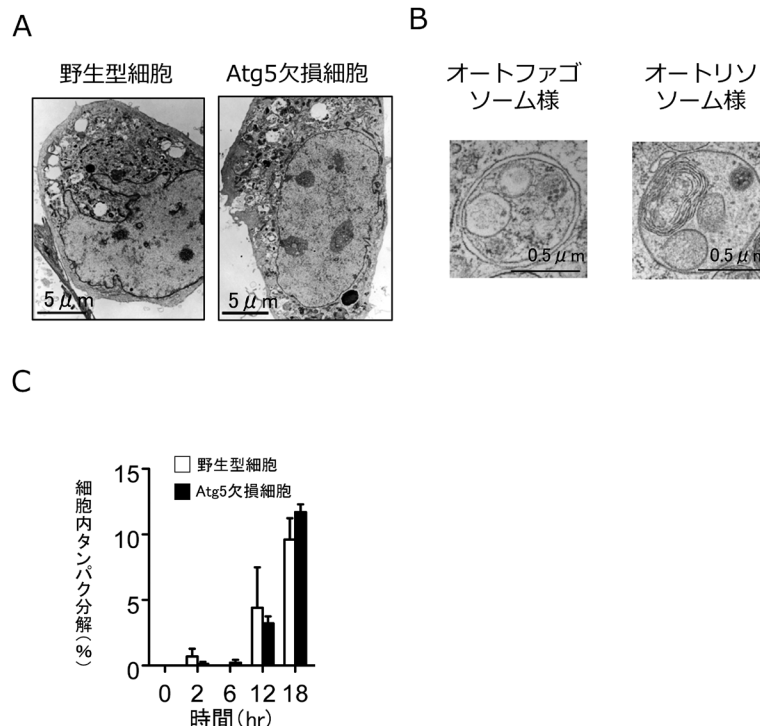


図2 GOMEDの形態

(A)野生型およびAtg5欠損線維芽細胞をエトポシドで刺激したところ、野生型ではオートファジーが、Atg5欠損細胞ではGOMEDが誘導された。両者の形態に違いは見られない[Nishida et al. (2009) *Nature*, **461**, 654–658より改変引用]。(B)Atg5欠損線維芽細胞をエトポシドで刺激した細胞におけるGOMEDの形態を示す。二重膜で囲まれたオートファゴソームと一重膜で内部が溶けかかったオートリソソームが観察される[Yamaguchi et al. (2020) *Nat. Commun.*, **11**, 5311より改変引用]。(C)エトポシド投与後に、タンパク質分解活性を測定したところ、野生型およびAtg5欠損線維芽細胞では同程度であった[Nishida et al. (2009) *Nature*, **461**, 654–658より改変引用]。

る基質分子が大きく異なっていることであり、このために生体における役割も異なっていた。すなわち、オートファジーの亜型というより、独立した細胞機能であると考えられた。

4. GOMEDの膜の起源

Atg5に依存したオートファジーの膜は小胞体を起源とすることが広く知られている⁵⁾。しかしながら、Atg5欠損細胞にエトポシドを投与したときに形成されるオートファジーの起源は、ゴルジ体膜に由来する。これは、超微形態学的には、①小胞体の形態に変化がないこと、②ゴルジ体はミニスタック化し、ゴルジ体のトランス側（トランス・ゴルジ）から隔離膜様構造体の形成が認められること、③オートファゴソームの形成において、隔離膜とゴルジ体輸送小胞／エンドソームとの融合が見られること、④オートファジー様構造物はすべてミニスタックゴルジ体に接して存在すること、などの知見³⁾によって支持されている（図3）。さらに、④Brefeldin Aを用いてゴルジ体を分散させると、オートファジー様構造物が認められなくなること、⑤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Rab9が、オートファゴソーム／オートリソソーム上に存在していること、⑥Rab9の発現を抑制するとオートファジー様構造がみられなくなること、などの知見が得られ³⁾、Atg5非依存性のオートファジー様構造は、ゴルジ体膜に起源し、Rab9を介した膜融

合によって実行されているものと考えられた（図1）。

Atg5非依存性のオートファジー様構造は、酵母においても観察される。Atg5欠損酵母細胞に、抗真菌薬のアンホテリシンB1を投与すると、(1)細胞質中のオートファゴソーム形成、(2)オートファゴソームと液胞（哺乳動物細胞のリソソームに相当）との融合が出現する⁶⁾。このオートファジー様構造も、哺乳動物細胞と同様にゴルジ体

Atg5欠損細胞

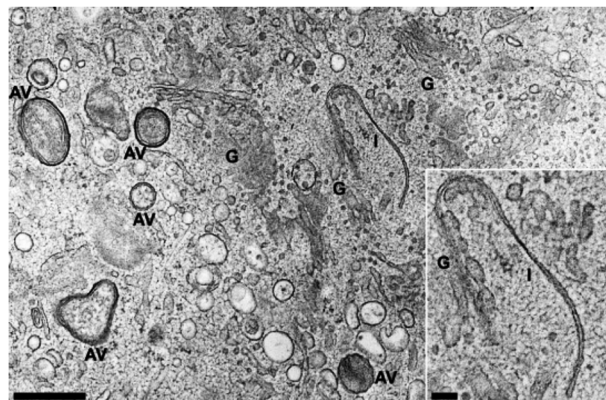
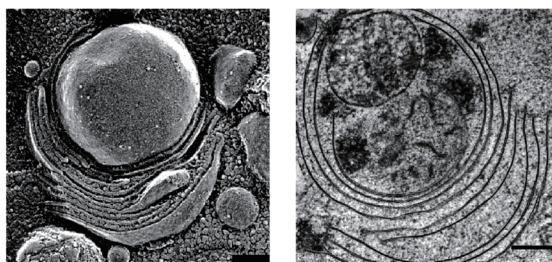


図3 GOMED時のゴルジ体の形態

Atg5欠損線維芽細胞をエトポシドで刺激した細胞におけるゴルジ体の超微形態を示す。ゴルジ体膜(G)から二重膜で囲まれた隔離膜(I)が形成されている。AV：オートファジー様構造。Bar=0.5 μm。 (Inset) 隔離膜の拡大図。Bar=0.1 μm [Nishida et al. (2009) *Nature*, 461, 654–658より改変引用]。

A Atg5欠損酵母



B

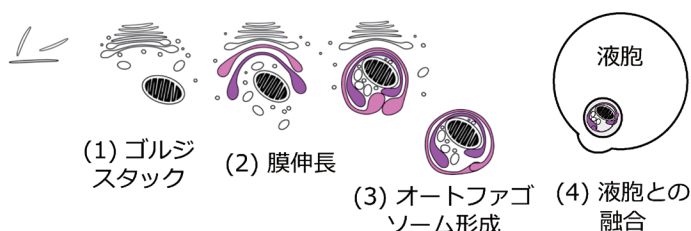


図4 酵母でみられるGOMED

(A) Atg5欠損酵母細胞をアンホテリシンBで刺激した細胞におけるゴルジ体の電子顕微鏡像を示す。何枚も重なったゴルジ体膜の層が形成され、distal endに球形のオートファゴソーム様構造が認められる。左：レプリカ法、右：切片法。内部にミトコンドリアが囲まれている [Yamaguchi et al. (2016) *EMBO J.*, 35, 1991–2007より改変引用]。(B)酵母におけるGOMEDの模式図。(1)ゴルジのスタック形成、(2)膜伸長反応、(3)トランス・ゴルジ膜の変形によるオートファゴソーム形成、(4)液胞との融合の順で進行する。

膜を起源としている。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のゴルジ体は通常細胞質中に散在しているが、アンホテリシンB1を投与すると、ゴルジ体が集積・多層化（スタック形成）し、その遠心部でトランス・ゴルジ膜が湾曲して細胞質成分やミトコンドリアを包み込むオートファゴソームが出現する（図4）。実際に、ゴルジ体のスタック形成に関わる分子であるGRH1や湾曲に関わる分子であるGRASP65を欠損した酵母細胞では、オートファゴソーム様構造の形成が起こらない。また、免疫電子顕微鏡において、オートファゴソーム膜上にゴルジ体分子が確認できることより、ゴルジ体膜を起源とするオートファジー様構造であることは明らかである⁶⁾。これらの形態学的特徴より、Golgi membrane-associated degradation (GOMED) pathway という名称を付した⁶⁾。

5. GOMEDの分子機構

オートファジーの分子機構は、酵母から哺乳動物細胞までよく保存されており、初期段階においてはセリン-トレオニンキナーゼであるUlk1（酵母ではAtg1）やAtg9, Beclin 1（酵母ではAtg6；PI3キナーゼclass III複合体の構成分子）などの分子が重要となる（図1）。続いて起こる隔

離膜の伸長には、lipid transfer活性を有するWip1もしくはWip2分子が必要であり、さらにその下流で2種類のユビキチン様の結合システムが重要な役割を果たしている。一つは、Atg5とAtg12の共有結合を中心とするAtg5システム（Atg5, 7, 10, 12, 16により機能する）である。Atg5-12複合体は隔離膜の外膜に偏って分布し隔離膜の伸長を促し、オートファゴソームが形成される前後に膜から離脱する。もう一つは、LC3（酵母ではAtg8）とホスファチジルエタノールアミン（PE）の共有結合を中心とするLC3システム（Atg3, 4, 7, 8により機能する）である。LC3-PE複合体は、Atg5-12複合体依存的に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形成に寄与する^{1,2)}（図1）。

形態学的相同性から、これらの複数の分子がGOMEDにも関与しているものと考えられる。実際に、種々のオートファジー関連分子をノックダウンしたところ、Ulk1やBeclin 1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、GOMEDにおいても重要な役割を果たしていた³⁾。一方、Atg5, Atg7, Atg9, Atg12, Atg16, LC3などのオートファジーコア分子は、GOMEDには関わっていない³⁾。

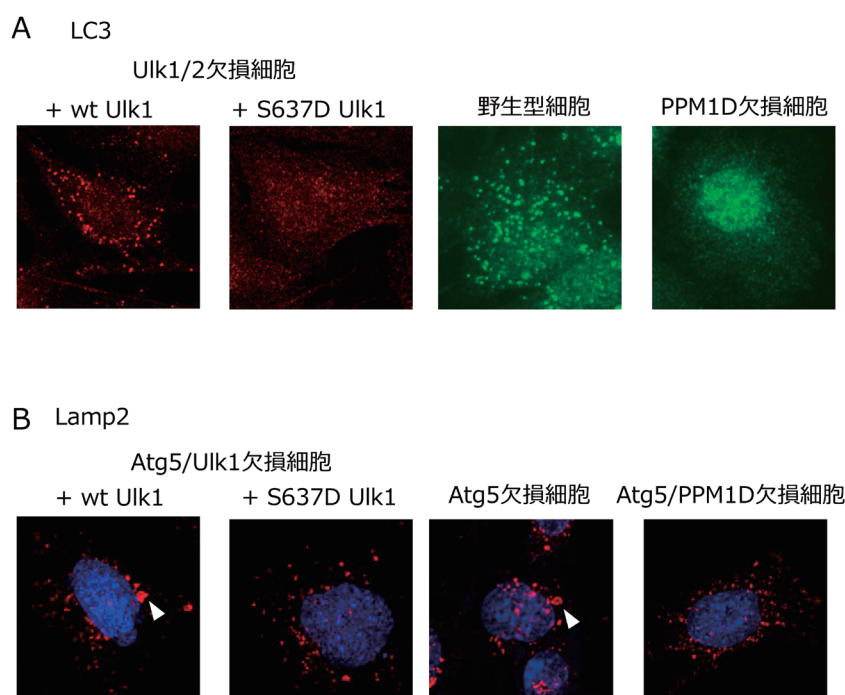


図5 DNA傷害時のオートファジーやGOMEDの実行は、PPM1DによるUlk1セリン637の脱リン酸化を介して実行される

(A)図に示す細胞にエトポシドを投与して、オートファジーの多寡をLC3のドット様構造で評価した。Ulk1/2欠損細胞に正常なUlk1を戻した細胞や野生型細胞では、LC3のドット構造が多発し、オートファジーの誘導が見られた。一方、Ulk1 (Ser637) の脱リン酸化が起こらないS637D変異Ulk1を戻した細胞やPPM1D欠損細胞では、オートファジーは誘導されなかった [Torii et al. (2016) *EMBO R.*, 17, 1552–1564より改変引用]。 (B)図に示す細胞にエトポシドを投与して、GOMEDの多寡をリング状のLamp2構造体（オートリソソーム；矢印）で評価した。Atg5/Ulk1欠損細胞に正常なUlk1を戻した細胞やAtg5欠損細胞では、GOMEDが誘導されたが、S637D変異Ulk1を戻した細胞やAtg5/PPM1D欠損細胞では、GOMEDは誘導されなかった [Torii et al. (2016) *EMBO R.*, 17, 1552–1564, Torii et al. (2020) *Nat. Commn.*, 11, 1754より改変引用]。

6. GOMEDにおけるUlk1の関与

キナーゼであるUlk1とホモログのUlk2は、オートファジーの初期反応において重要な役割を果たしている。すなわち、Ulk1（あるいはUlk2）のキナーゼ活性を介したAtg13, Fip200との複合体形成が、隔離膜形成に重要である⁷⁾。一方、Ulk1/Ulk2を欠損した細胞ではオートファジーのみならず、GOMEDも誘導されない³⁾。すなわち、Ulk1（あるいはUlk2）は両方のタンパク質分解機構に関わっていることは明らかである。では、単一の分子が、一つの細胞の中でどのように異なる細胞機能を制御しているのだろうか？

我々は、DNA傷害を与えた細胞を用いて、Ulk1分子の網羅的リン酸化マスを解析を行うことにより、以下のような事実を見出すことに成功した^{8,9)}。すなわち、①オートファジー実行時やGOMED実行時には、Ulk1の637番目のセリンが脱リン酸化されること、②セリン残基のアスパラギン置換体を作製して、脱リン酸化を妨げると、これらのタンパク質分解系が動かないこと（図5）、③この脱リン酸化反応は、DNA傷害後にp53依存的に転写誘導されるホスファターゼPPM1Dが行っていることを見いだした。これらの所見は、PPM1D欠損細胞において、どちらのタンパク質分解系も誘導されないことより確認されている（図5）⁸⁾。

さらに、リン酸化マスの解析を進めたところ、④GOMED時には、上記の脱リン酸化反応の後に、Ulk1の746番目のセリンがリン酸化されること、⑤セリン残基のアラニン置換体を作製してリン酸化を妨げると、GOMEDのみが動かずオートファジーは誘導されること（図6A）、⑥このセリン残基のリン酸化は、p53依存的に転写誘導されるキナーゼRIPK3が行っていることを見いだした⁹⁾。これらの所見は、DNA傷害刺激を加えたRIPK3欠損細胞においてGOMEDが誘導されないことなどにより明らかであった⁹⁾。

以上より、DNA傷害によるシグナル伝達機構は以下のように考えられた。まずp53依存的にPPM1DとRIPK3の発現が上昇する。PPM1Dによって、Ulk1の637番目のセリン残基が脱リン酸化されると、オートファジーならびにGOMEDが誘導される状態となる。その後さらに746番目のセリン残基がリン酸化されるとGOMEDが活性化され、リン酸化されないと通常のオートファジーが実行されるのである（図6B）。なお、746番目のセリンがリン酸化されると、通常のオートファジーで見られるUlk1とAtg13, Fip200との複合体形成は起こらず、Ulk1がゴルジ体に移動した⁹⁾。おそらく、ゴルジ体上で何らかのタンパク質をリン酸化することにより、下流にGOMEDシグナルを伝達しているものと考えられる。

興味深いことに、GOMEDを制御するRIPK3は、細胞死の一つであるネクロプトーシスの必須分子である¹⁰⁾が、TNF- α + z-VAD（カスパーゼ阻害剤）などのネクロプ

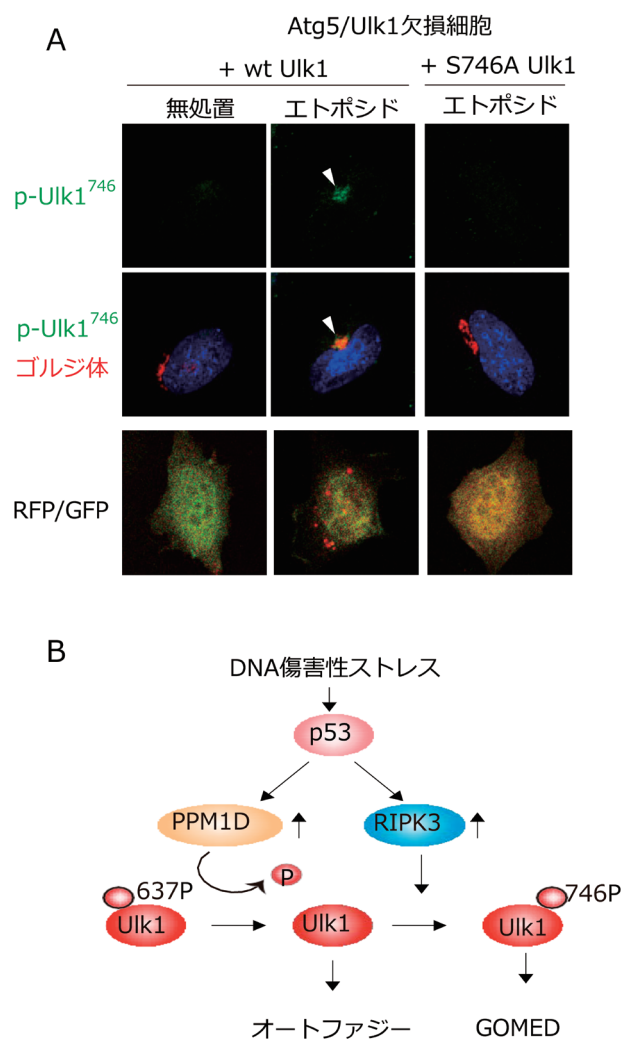


図6 DNA傷害時のGOMEDの実行は、RIPK3によるUlk1セリン746のリン酸化を介して実行される

(A)図に示す細胞にエトポシドを投与して、Ulk1セリン746のリン酸化とGOMEDを観察した。Atg5/Ulk1欠損細胞に正常なUlk1を戻した細胞では、ゴルジ体上でのUlk1セリン746のリン酸化とGOMED（RFP-GFPの酸性化による赤色化によって判定）が観察された。Ulk (Ser746) のリン酸化が起こらないS746A変異Ulk1を戻した細胞では、GOMEDは誘導されなかった [Torii et al. (2020) *Nat. Commun.*, **11**, 1754より改変引用]。 (B) 模式図。DNA傷害によって、p53依存的にPPM1DとRIPK3の発現が上昇する。PPM1Dによって、Ulk1の637番目のセリン残基が脱リン酸化されると、オートファジーならびにGOMEDが誘導される状態となる。その後さらに746番目のセリン残基がリン酸化されるとGOMEDが活性化され、リン酸化されないと通常のオートファジーが実行される。

シス誘導刺激を加えてもGOMEDは誘導されない⁹⁾。また、GOMEDを誘導するDNA傷害刺激によってネクロプトーシスが誘導されることもない。さらに、RIPK3以外のネクロプトーシス分子であるRIPK1やMLKLに関しては、GOMEDとの関与はみられない。これらの事実より、ネクロプトーシスとGOMEDはRIPK3を共同で利用しているものの、システムどうしの相互作用はないものと考えられた。

7. GOMEDにおけるWipi3の役割

GOMEDは、酵母から哺乳動物まで保存されているため、酵母の遺伝学的手法を用いてGOMEDに必要な遺伝子を探索したところHsv2の同定に至った¹¹⁾。Hsv2はProppinファミリーに含まれるタンパク質で、ホスファチジルイノシトールと結合し、脂質を移動させる機能を有している¹²⁾。Hsv2を欠損した酵母細胞では、ゴルジ体膜の伸長反応が起こらずGOMEDが誘導されないこと¹²⁾より、Hsv2がGOMEDの実行分子であることがわかる。そこで、Hsv2の哺乳動物相同遺伝子であるWipi3を欠損させたAtg5欠損細胞を作製し、DNA傷害刺激を加えたところ、酵母細胞と同様にゴルジ体膜の伸長反応が起こらず、GOMEDは誘導されなかった(図7)¹²⁾。Wipi3は、通常細胞質に局在しているが、刺激に応じて、またホスファチジルイノシトール3-リン酸(PI3P)依存的にゴルジ体に移動し、ゴルジ体からの隔離膜形成に機能している。Wipi3は、オートファジーの実行に関わるWipi1やWipi2のホモログであるが、ホモログの一方がオートファジーを、他方

がGOMEDを制御していることは、両者が異なる機能でありながら、起源を同じくしている可能性がうかがえる。

8. GOMEDによるゴルジ体経路分子の分解

オートファジーとGOMEDの最大の違いは、分解基質が異なる点にある。オートファジーの基質として有名なp62は、GOMEDで選択的に分解されることはない。逆に、後述するGOMEDに関わるさまざまな生理現象における基質に関しては、オートファジーが関与することはない。すなわち、両者が互いの機能を代償する事例は現時点では認められていない。

GOMEDは、ゴルジ体膜を利用するため、ゴルジ体を経由して運搬される分子が基質分子になることは想像できる。また、この輸送経路に負荷がかかると、ゴルジ体で停滞したタンパク質を分解するために、GOMEDが誘導されることも予想できる。実際に、酵母でGOMEDを誘導するアンホテリシンB1は、エルゴステロールに作用した後に、ゴルジ体から細胞膜へのタンパク質輸送系あるいは細胞外への分泌系を障害することが知られている。アンホテリシンB1以外にも、ゴルジ体から細胞膜、細胞外への輸送に関わる分子を欠損させたときや、細胞外への輸送を阻害する薬剤CBM [1,3-cyclohexanebis (methylamine)] を投与したときに、GOMEDの誘導が観察される⁶⁾。また、このときに分解される基質分子として、ゴルジ体を経由して運搬される人工タンパク質VSVG-GFP⁶⁾や、内在性のインテグリン⁹⁾などが見いだされている。これらの知見より、GOMEDの主要な機能は、ゴルジ体から細胞膜/細胞外への輸送が障害されてゴルジ体に滞留したタンパク質を分解することであると考えられた。

このようなGOMED機能の代表的なものとして、インスリン分泌制御がある。インスリンは、膵臓のインスリン分泌細胞(β細胞)で合成されゴルジ体を介して分泌されるが、細胞周囲のグルコース濃度が低下する(すなわち血糖値が下がる)と、さらなる低グルコースを防ぐためにインスリン分泌が抑制される。このときβ細胞内では、GOMEDが誘導されてインスリンの滞留が緩和されている⁶⁾。この知見は、β細胞株であるMIN6細胞や、マウスから単離した膵島細胞の培養液を高グルコースから低グルコースに変えたときに観察された⁶⁾。なお、この低血糖時のインスリン分解には、通常のオートファジーは関わっていない。

9. GOMEDによる神経細胞の維持

GOMEDの脳での役割を知るために、我々はGOMED実行分子であるWipi3遺伝子を脳特異的に欠損させたマウスを作製した¹¹⁾。このマウスは7週齢ごろより体の姿勢保持が困難となり、歩行障害が生じた(図8A)。そこで、運動を制御する小脳を調べたところ、(1)小脳のプルキンエ細

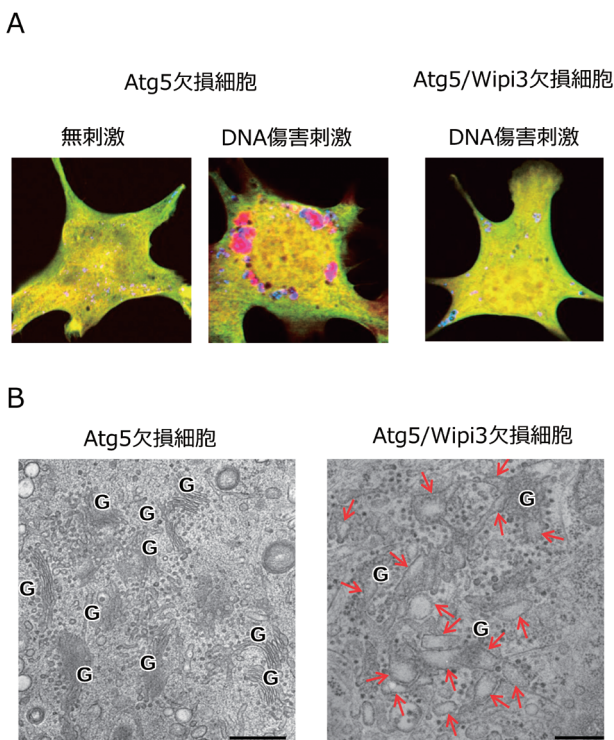


図7 DNA傷害時のGOMEDの実行はWipi3を介して実行される

(A)図に示す細胞にエトポシドを投与して、GOMEDの多寡をRFP-GFPの酸性化による赤色化によって評価した。Wipi3欠損細胞では、GOMEDは誘導されなかった[Yamaguchi et al. (2020) *Nat. Commun.*, 11, 5311より改変引用]。(B)図に示す細胞にエトポシドを投与して、電子顕微鏡にて観察を行った。Atg5欠損細胞では、ゴルジ体のミニスタック化(G)と、膜の伸長が見られた。一方、Atg5/Wipi3欠損細胞では、ゴルジ体の変形、膨潤(矢印)がみられ、膜の伸長は見られなかった。Bar = 0.5 μm [Yamaguchi et al. (2020) *Nat. Commun.*, 11, 5311より改変引用]。

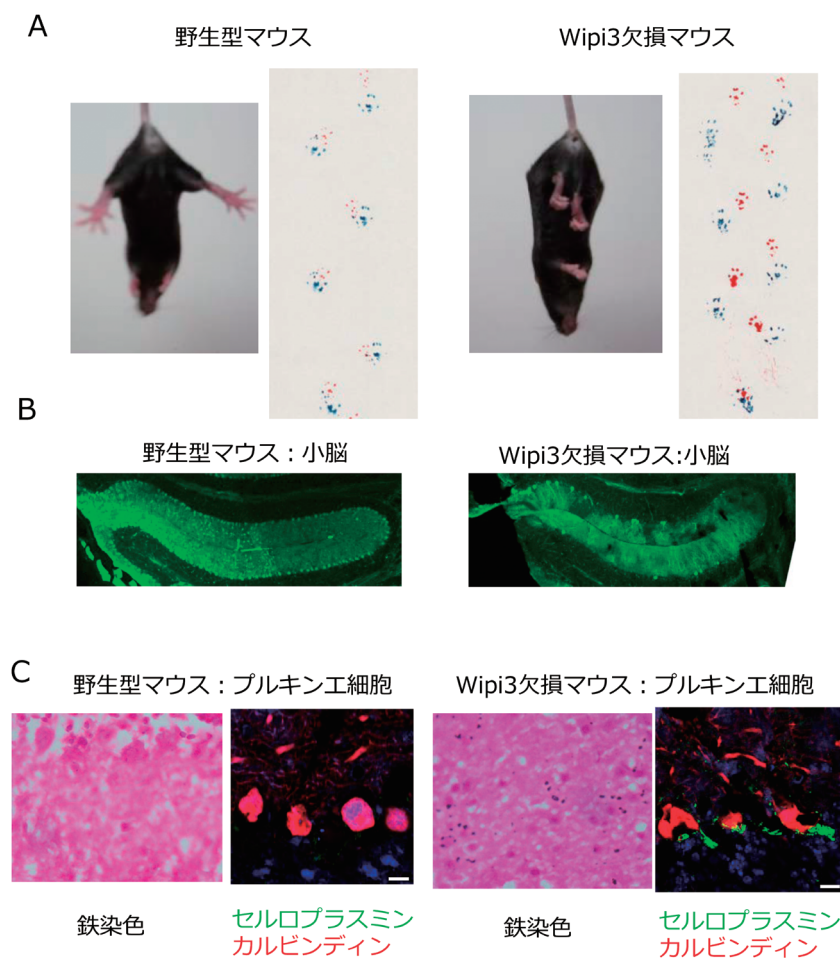


図8 Wipi3欠損マウスの表現型

(A) Wipi3を欠損したマウスでは、体のバランスがとれなくなり、歩行にも異常が認められた。(B) Wipi3を欠損したマウスでは、小脳のプルキンエ細胞が変性脱落していた(カルビンディン染色)。(C) Wipi3を欠損したマウスのプルキンエ細胞では、鉄沈着とセルロプラスミンの蓄積が生じていた[Yamaguchi et al. (2020) *Nat. Commun.*, **11**, 5311より改変引用]。

胞が変性脱落していること(図8B)、(2)脱落前の神経細胞でゴルジ体の形態が異常であること、(3)GOMEDが誘導されない、などの異常が認められた。さらに、詳細な解析を行ったところ、(4)神経細胞に、鉄ならびに鉄輸送タンパク質であるセルロプラスミンが蓄積していること(図8C)が見いだされた¹¹⁾。セルロプラスミンは銅の運搬タンパク質であるが、鉄代謝も行っている。また、肝臓で産生されたセルロプラスミンは血中で機能するが、神経細胞のセルロプラスミンは、ゴルジ体を経由して細胞膜に運搬され、二価鉄を三価鉄に変換する機能を有している¹³⁾。三価鉄は、フェロポーチンを経由して細胞外に排出される。細胞レベルの検討で、セルロプラスミンがGOMEDの分解基質であることが証明されていることを勘案すると、Wipi3欠損マウスにおいては、GOMEDの異常からその基質分子セルロプラスミンが分解されずに細胞質内に異所性に蓄積し、その結果、三価鉄が過剰になり鉄沈着性の小脳変性疾患を起こしているものと考えられた。

オートファジーに必須のAtg7を欠損したマウスの脳でも同様の神経機能異常が見られる¹⁴⁾が、Wipi3欠損マウス

の神経細胞にみられる内部構造とはまったく異なっており、ゴルジ体に異常はなく、小胞体の構造に異常が見られる¹¹⁾。また、セルロプラスミンや鉄の沈着はなく、各々異なる機構で神経細胞の維持に寄与しているものと考えられた。実際に、Wipi3、Atg7の両者を欠損したマウスを作製したところ、生後28日で死亡し、単独の遺伝子欠損マウスよりもはるかに重篤な神経変性を示した¹¹⁾。すなわち、通常のオートファジーとGOMEDは、異なる機構で神経細胞を維持していることが見いだされた。なお、ヒトの脳内鉄沈着神経変性症SENDAは、小児期早期からの非進行性の知的障害と、成人期に急速に進行する錐体外路症状、認知症を呈する神経変性疾患である¹⁵⁾が、Wipi4(Wipi3の相同遺伝子)の遺伝子変異によって発症することが知られている。しかし、Wipi4欠損マウスでは、脳内鉄沈着が見られず、症状もほとんど見られないのに対して、Wipi3欠損マウスでは、脳内鉄沈着が認められ症状も強いいため、SENDAのモデルマウスとなりうるかもしれない。

10. GOMEDによる赤血球からのミトコンドリア除去

これまで、ゴルジ体を経由する分子がGOMEDの基質となることを紹介してきた。しかし、GOMEDが分解する基質はタンパク質だけでなく、ミトコンドリアなどのオルガネラも分解される。代表的な例が、赤血球分化の最終段階で観察されるミトコンドリアの除去である。赤血球が最終分化する時には、まず脱核が起こり、その後24時間以内にミトコンドリアなどのオルガネラが除去される（図9A）。このミトコンドリアの除去機構には、オートファ

ジー様構造体の関与が示唆されていた。実際に、我々が電子顕微鏡を用いて網状赤血球を観察したところ、ミトコンドリアが二重の膜に囲まれているオートファゴソーム様構造、ミトコンドリアの一部の分解が進んでいるオートリソソーム様構造が観察された（図9B）。また、この膜の起源は、拡大して観察した形態からゴルジ体膜であると考えられた。Atg5を欠損したマウスにおいても、ミトコンドリアを囲んだオートファゴソーム様構造やオートリソソーム様構造は同程度に観察された（図9B）。さらに、ミトコンドリアの多寡を胎仔肝臓（赤血球の造血の場である）と血

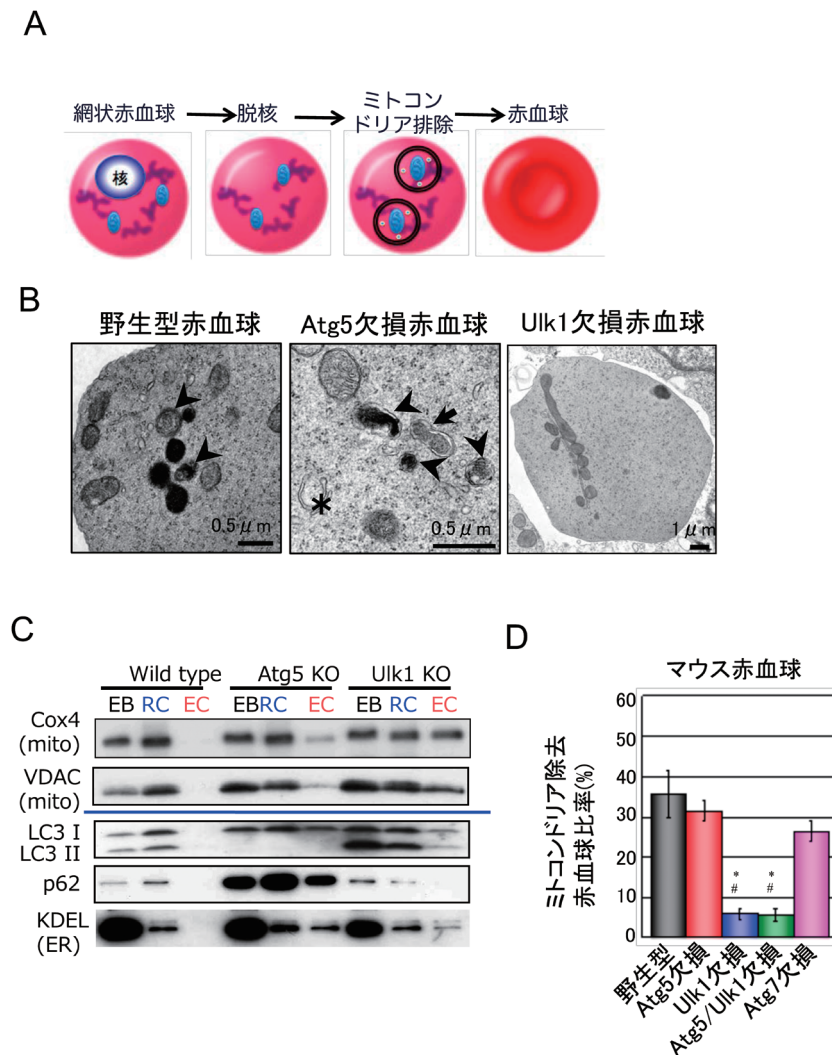


図9 赤血球からのミトコンドリア除去はUik1 依存的、Atg5 非依行的に行われる

(A) 赤血球の最終分化は、網状赤血球から脱核、ミトコンドリア排除が起って、最終的な成熟赤血球となる。(B) 野生型、Atg5 欠損、Uik1 欠損胎仔の赤血球を電子顕微鏡にて観察した。野生型やAtg5 欠損赤血球では、隔離膜（アスタリスク）、ミトコンドリアの入ったオートリソソーム（矢じり）、オートファゴソーム（矢印）が観察され、ミトコンドリアがオートファジーで分解されている像が取得できた。一方、Uik1 欠損赤血球では、ミトコンドリアの分解はみられなかった [Nishida et al. (2009) *Nature*, 461, 654–658 より改変引用]。(C) 各遺伝子型のマウス胎仔 18.5 日目の肝臓から採取した赤血球をセルソーターにて赤芽球 (EB: erythroblast)、網状赤血球 (RC: reticulocyte) に分取し、また血液中の赤血球 (EC: erythrocyte) を採取し、western blot 法にてオルガネラの量を解析した。野生型、Atg5 欠損マウスでは、赤血球のミトコンドリア (Cox4, VDAC) は、ほぼ消失していた。一方、Uik1 欠損マウスでは、赤血球のミトコンドリアの残存が認められた。LC3-II の形成と p62 の減少から判断して、Uik1 欠損赤血球では通常のオートファジーが誘導されていたが、Atg5 欠損赤血球では誘導されていなかった [Honda et al. (2014) *Nat. Commun.*, 5, 144 より改変引用]。(D) 各遺伝子型のマウス胎仔 18.5 日目の肝臓から採取した赤血球におけるミトコンドリア除去赤血球の割合 [Honda et al. (2014) *Nat. Commun.*, 5, 144 より改変引用]。

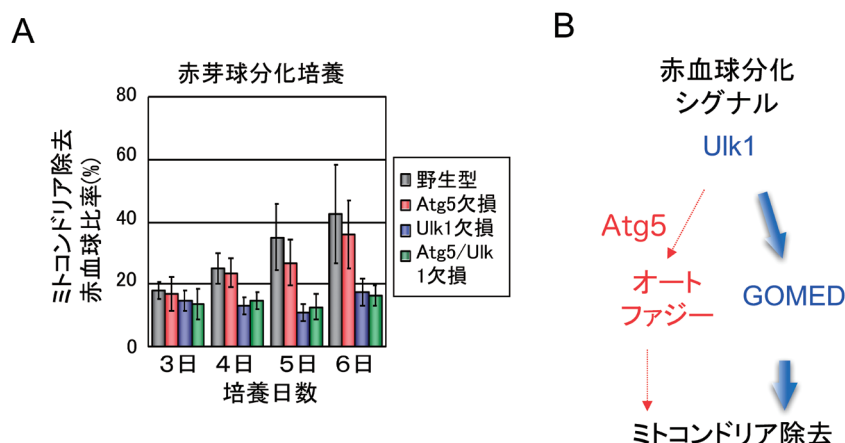


図10 *in vitro*培養系による赤血球からのミトコンドリア除去

(A)各遺伝子型のマウス胎仔14.5日目の肝臓から採取した赤芽球を、シャーレで培養して分化を誘導させた。野生型、Atg5欠損赤芽球では、ミトコンドリア除去赤血球割合が経時的に増加したが、Ulk1欠損赤芽球、Atg5/Ulk1二重欠損赤芽球では、ミトコンドリア除去が起らなかった [Honda et al. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 144より改変引用]。(B)模式図。赤血球からミトコンドリアが除かれるときには、Atg5を利用するオートファジーの関与は小さく、Ulk1を利用するGOMEDが中心である。

液で観察したところ、Atg5欠損マウスにおけるミトコンドリア除去は野生型マウスとほぼ同程度に誘導されており、赤血球の多くはミトコンドリアを含んでいなかった(図9C)¹⁶⁾。すなわち、Atg5に依存したオートファジーは、赤血球におけるミトコンドリア除去に関わっていないものと考えられた。一方で、オートファジーとGOMEDの両者に関わっているUlk1を欠損したマウスにおいては、赤血球内にミトコンドリアが多数残存していた(図9C)。赤血球中の残存ミトコンドリアをより定量的に評価するために、赤血球の分化マーカー Ter119, CD71とミトコンドリア(Mitotracker deep red)を三重染色してフローサイトメーターにて測定したところ、正常赤血球やAtg5欠損赤血球、Atg7欠損赤血球ではミトコンドリアが除去されていたが、Ulk1欠損赤血球、Ulk1/Atg5二重欠損赤血球ではミトコンドリアが残存していた(図9D)⁹⁾。さらに、野生型マウス、Atg5欠損マウス、Ulk1欠損マウス、Atg5/Ulk1二重欠損マウスから、それぞれ赤芽球を調製し、シャーレの中で血球を分化させたところ、野生型赤芽球とAtg5欠損赤芽球では、脱核後にミトコンドリア除去が行われたが、Ulk1欠損赤芽球とAtg5/Ulk1二重欠損赤芽球では、ミトコンドリア除去は行われなかった(図10A)⁹⁾。これらの解析より、赤血球の最終分化時にみられるミトコンドリア除去は、Atg5依存的なオートファジーではなく、Ulk1に依存したGOMEDに依存していることが証明された(図10B)。

11. おわりに

本稿では、GOMEDに関して、発見の経緯から、現時点で明らかにされている分子機構、生理機能に関して概説した。ただし、現状において、GOMEDの全体像が明らかになっている訳ではない。具体的には、①GOMED実行メカ

ニズムの詳細、②基質のさらなる同定、③種々の疾患との関連性、など、今後解決していくべき問題は多い。本稿に記したように脾β細胞、赤血球、神経細胞などにおけるGOMEDの役割は明確であるが、GOMEDは、すべての細胞が保有する機能であるために、それぞれの細胞において変調が生じると、さまざまな疾患を発症することが予想される。このような面を明らかにするために、今後は、遺伝子欠損マウスだけではなく、ヒト試料を用いた解析も必要になるものと考えている。

文 献

- 1) Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., & Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451**, 1069–1075.
- 2) Xie, Z. & Klionsky, D.J. (2007) Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1102–1109.
- 3) Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, **461**, 654–658.
- 4) Deter, R.L., Baudhuin, P., & de Duve, C. (1967) Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.*, **35**, C11–C16.
- 5) Tooze, S.A. & Yoshimori, T. (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 831–835.
- 6) Yamaguchi, H., Arakawa, S., Kanaseki, T., Miyatsuka, T., Fujitani, Y., Watada, H., Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2016) Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. *EMBO J.*, **35**, 1991–2007.
- 7) Wong, P.M., Puente, C., Ganley, I.G., & Jiang, X. (2013) The ULK1 complex: Sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*, **9**, 124–137.
- 8) Torii, S., Yoshida, T., Arakawa, S., Honda, S., Nakanishi, A., & Shimizu, S. (2016) Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO Rep.*, **17**, 1552–1564.
- 9) Torii, S., Yamaguchi, H., Nakanishi, A., Arakawa, S., Honda, S.,

- Moriwaki, K., Nakano, H., & Shimizu, S. (2020) Identification of a phosphorylation site on Ulk1 required for genotoxic stress-induced alternative autophagy. *Nat. Commun.*, **11**, 1754.
- 10) Zhang, D.W., Shao, J., Kin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.-C., Dong, M.Q., & Han, J. (2009) RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, **325**, 332–336.
 - 11) Yamaguchi, H., Honda, S., Torii, S., Shimizu, K., Katoh, K., Miyake, K., Miyake, N., Fujikake, N., Sakurai, H.-T., Arakawa, S., et al. (2020) Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration. *Nat. Commun.*, **11**, 5311.
 - 12) Baskaran, S., Ragusa, M.J., Boura, E., & Hurley, J.H. (2012) Two-site recognition of phosphatidylinositol 3-phosphate by PROPPINs in autophagy. *Mol. Cell*, **47**, 339–348.
 - 13) Hellman, N.E. & Gitlin, J.D. (2002) Ceruloplasmin Metabolism and Function. *Annu. Rev. Nutr.*, **22**, 439–458.
 - 14) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., et al. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, **441**, 880–884.
 - 15) Saitsu, H., Nishimura, T., Muramaatsu, K., Kadera, H., Kumada, S., Sugai, K., Kasai-Yoshida, E., Sawaura, N., Nishida, H., Hoshino, A., et al. (2013) De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat. Genet.*, **45**, 445–449.
 - 16) Honda, S., Arakawa, S., Nishida, Y., Yamaguchi, H., Ishii, E., & Shimizu, S. (2014) Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nat. Commun.*, **5**, 4004.

著者寸描

●清水 重臣 (しみず しげおみ)



東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授。医学博士。

■略歴 1958年福井県に生る。84年大阪大学医学部卒業。以後、外科医として臨床に従事。93年に学位取得。94年より大阪大学医学部助手。2000年より大阪大学医学部助教授。06年より現職。

■研究テーマと抱負 これまでに、細胞死研究とオートファジー研究を行い、ア

ポトーシスがミトコンドリアを介して実行されること、オートファジー細胞死、GOMEDなどを発見してきた。現在は、新たな細胞死の同定やGOMEDの生体応答に注力している。

■ウェブサイト <https://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>

■趣味 クラシック音楽、読書、阪神タイガース。