

Title	<翻訳>タンパク質分解酵素欠損変異体を用いて示された酵母におけるオートファジー、並びにその誘導の条件
Author(s)	竹重, 一彦; 馬場, 美鈴; 坪井, 滋 他
Citation	
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/83220
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

2021 年度 大阪大学全学共通教育科目
学問への扉（マチカネゼミ）
オートファジーを読み解こう

本稿は上記科目の成果として、大阪大学学術情報庫 OUKA にて公開するものです。本ゼミは大阪大学歯学研究科教授 野田健司が開講し、様々な学部の1年生、10名が参加しました。

オートファジーとは細胞の中で自分自身の構成成分を分解する現象のことです。2016年に、オートファジーの分子機構を明らかにしたことに對して大隅良典博士にノーベル生理学医学賞が与えられました。その際、ノーベル賞選考委員会より、その発見に関わる主要な論文として4報が選定され発表されています。本ゼミではそのうち一連の研究の発端となる最初の論文、*Journal of Cell Biology* Volume 119, Issue 2, Pages 301 – 312 1992 **Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction** Takeshige K., Baba M., Tsuboi S., Noda T., Ohsumi Y.を、皆で分担しながら少しずつ読み解いていき、日本語に翻訳しました。文系の学生も半分近くおり、受験科目として生物学を勉強していない学生が大多数です。少しずつ読み解き、わからない単語は自ら調べ、最終的には日本語としてできるだけわかり易く表現することを目指しました。教官の野田はこの論文の著者の一人でもあり、訳者として名を連ねるには相応の責任があると考え、同時に、学生たちの成果として発表するためには、過剰な介入もさけるべきとかがえ、訳者としては登録せず、最低限の指導に留めることといたしました。そのため、まだ洗練されていない箇所もみうけられますが、教育の成果の一環としてお目通しただけだと存じます。材料と方法の項は省略しています。公開に当たり著作権の問題は何があるのか、自ら調べ、出版社と交渉もしてもらいました。商業的利用しない限り OUKA で公開して良いとの許可を得ています。また OUKA への掲載の手続きも自ら行ってもらいました。参加学生たちには、学問の基礎をなす論文というものがどういうものであるのか、その一端は覗いてもらえたと思います。（この部分 文責 野田, 2021年7月13日）

タンパク質分解酵素欠損変異体を用いて示された酵母におけるオートファジー、並びにその誘導の条件

竹重一彦 馬場美鈴* 坪井滋 野田健司 大隅良典

日本 153 東京都 目黒区 駒場 3-8-1 東京大学 教養学部 生物学教室

*日本 163-91 東京都 新宿区 西新宿 1-24-2 工学院大学 電気工学部

日本語訳

法学部法学科

高石 晃太郎

法学部法学科

松村 日菜子

医学部保健学科

石田 祐大

医学部保健学科

西本 朱歩

医学部保健学科

山田 桂花

工学部応用自然科学科

水田 京杏

工学部環境・エネルギー工学科

東 生露

外国語学部外国語学科

茶園 真衣

外国語学部外国語学科

黒木 凜

外国語学部外国語学科

山口 和実

要旨

酵母サッカロミセスセレビスエ内での液胞分解の生理学的役割や仕組みの決定のために、タンパク質分解酵素 A,B やカルボキシペプチターゼ Y を持たない突然変異細胞が栄養ある培地から様々な栄養素を欠いた人工培地へと移された。そして、それらの液胞の形態上の変化が調査された。栄養不足の培地で1時間培養したのち、いくつかの球体が液胞内に現れ、活発にブラウン運動をした。これらの構造体は次第に数を増やし、3時間後、液胞をほとんど完全に満たした。それらの蓄積の間、液胞の区画の体積も増加した。電子顕微鏡試験は、これらの構造体が、他のどの細胞内膜よりも薄く見える単位膜によって囲まれていることを示した。構造体の中身は細胞質基質と形態的には見分けがつかなかった。これらの構造体は、細胞質リボソーム、粗面小胞体、ミトコンドリア、脂質顆粒、グリコーゲン顆粒を含んでいて、構造体での細胞質リボソームの密度は、細胞質基質での密度とほとんど同じであった。構造体の直径は、400nm から 900nm に及んだ。これらの構造体を蓄積していた液胞は Ohsumi と Anraku の方法の修正によって調製された。(Ohsumi,Y.,and Y. Anraku. 1981. J.Biol.Chem. 256:2079-2082) 単離した液胞はリボソームを含み、細胞質内酵素のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの潜在的活性を示した。これらの結果は、これらの構造体が液胞内の細胞質基質を隔離したことを示唆している。我々はこれらの球体を「オートファジックボディ」と名付けた。液胞内のオートファジックボディの蓄積は、窒素飢餓だけでなく、細胞周期の停止を引き起こした炭素や単一アミノ酸などの栄養素の枯渇によっても誘発された。

遺伝子分析によって、液胞内のオートファジー構造体の蓄積が、*PRB1* 生成物のプロテアーゼ B の欠乏の結果あり、*PRB1* 遺伝子の破壊がこの結果を確かなものにしたことを明らかにした。PMSF の存在下では、野生型細胞は、複数のプロテアーゼ欠損変異体または破壊された *PRB1* 遺伝子を持つ細胞と同じ方法で、栄養素欠乏条件下で液胞にオートファジックボディを蓄積しました。オートファジー体は正常細胞の培養物から PMSF を除去した後急速に消失したため、通常のオートファジープロセスの中間体であるに違いない。

これは、栄養欠乏条件では酵母の細胞の液胞でのオートファジーによる細胞質基質成分の分解が大規模に起こるということを示す初めての報告書である。

導入

ほとんどの真核生物¹は、働かなくなり退化したタンパク質²や細胞小器官³のための特有の細胞内システムを持っていることが知られている。動物の細胞においては、リソソーム⁴と非リソソームの両方の経路が、内在性タンパク質の分解を担っている。多くの種類の非リソソームタンパク質分解経路が報告されている。(Pontremoli and Melloni,1986) すなわち、シグナルペプチターゼ⁵、Ca²⁺-活性化中性プロテアーゼ⁶、とユビキチン介在性 ATP 依存タンパク質分解経路⁷ (Schlesinger and Hershko, 1988 ; Rechsteiner, 1991) これらの経路は標的基質⁸に特異性があり、主に短命または異常なタンパク質の分解や未成熟なタンパク質の活性化の原因である。

¹ 細胞小器官があり、染色体が核膜に包まれている核を持つ生物(高等学校生物基礎 第一学習社)

² 多数のアミノ酸が結合した高分子(理系総合のための生命科学 羊土社)

³ 核や葉緑体のような細胞内でみられる特定の働きを持つ構造体 (高等学校生物基礎 第一学習社)

⁴ 一重膜でできた直径 0.4~数 μm の小胞でゴルジ体から生じる。内部は酸性で多数の消化酵素を含む。古い細胞小器官や細胞外から取り込んだ遺物の消化に関わる。(スクエア最新図説生物)

ゴルジ体-動物の細胞の中に存在する。粒状あるいは網状の器官。細胞内の分泌物を合成したり排出物を一時的に蓄えたりする機能を持つ。

⁵ 膜を通過する特定の物質の相互扉として機能する膜貫通型タンパク質のシグナル配列(細胞内での特有の性質を与えるための主となる配列部分)を切断するための酵素。(膜貫通型たんぱく質・シグナル配列 WEBLIO 膜貫通タンパク質 BIOINFORMATIC)

⁶ activated neutral proteinases=activated neutral proteases=活性化中性プロテアーゼ

プロテアーゼ：タンパク質のペプチド結合を加水分解する酵素の総称

ペプチド結合：1級アミノ酸とカルボキシル基が脱水縮合してできた酸アミド結合で、特に アミノ酸間の結合

加水分解：化合物に水が作用して起こる分解反応

中性プロテアーゼ：中性付近に至適pHをもつプロテアーゼ

⁷ ユビキチン・プロテアソーム系 76 個のアミノ酸からなる小型のタンパク質のユビキチンが分解の標的となるタンパク質に多数付加する。それが巨大なタンパク質複合体であり、筒状の構造のプロテアソームに運ばれ、分解される。異常なタンパク質、損傷を受けたタンパク質など不要なタンパク質を選択的に分解する(スクエア最新図説生物 第一学習社)

⁸ 酵素が作用する物質。(旺文社 生物辞典)

リソソームタンパク質の分解はオートファゴリソソームが行う。これは、オートファゴソーム⁹と、リソソームプロテアーゼ¹⁰やリソソーム膜タンパク質を含む小胞¹¹の融合によって形成される。オートファゴソームは、たいてい役目を終えた過剰の細胞構成要素を分解するために、あるいは細胞構成要素の一部を分解するために形成される。アミノ酸の減少に対するオートファゴソームの形成はネズミの肝臓で報告されている。(Schworer and Mortimore, 1979) オートファジーによるタンパク質の分解は、タンパク質の大きな代謝回転¹²に重要な役割を果たしていると考えられている。

オートファジーは1時間につき全部の細胞タンパク質の3~4%の割合で劇的なタンパク質分解をもたらす、この分解は、少なくとも細胞質¹³の酵素¹⁴の場合においては非選択的だと考えられている。(Kopitz et al., 1990 and references therein)

植物細胞においては、より劇的に分解過程が進行することがある。高等植物¹⁵の老化した葉の中にあるほとんどのタンパク質は分解されて、その分

⁹ タンパク質分解系の1つであるオートファジーの主要なシステムの(マクロ)オートファジーにおいて現れる二重膜で囲まれる細胞小器官のこと。(Google Scholar)

不要なタンパク質や細胞小器官が二重の生体膜で囲まれた構造のこと

¹⁰ タンパク質やペプチド内の特定のアミノ酸のそれぞれアミノ末端側、またはカルボキシ末端側のペプチド結合を切る(加水分解する)性質を持つ酵素の総称。タンパク分解酵素、タンパク質分解酵素ともいう。この性質は基質特異性と呼ばれる。

引用(Japan Knowledge Lib)

¹¹ 細胞内の膜が閉じて袋状になった小さいもの。特に扁平なものをさす。(広辞苑)

¹² 生体の構成物質が、量は一定であっても、代謝による流入と流出によって絶えず交替している現象。(ブリタニカ国際大百科事典)

¹³ 原形質(核と細胞質を合わせたもの)のうち核を除いた部分。細胞質基質中に細胞小器官が存在している。細胞質の外側には細胞膜がある。(旺文社 生物辞典)(第一学習社六訂版 スクエア 最新図説生物)細胞膜の内側に細胞質と核がある。啓林館

http://www.keirinkan.com/kori/kori_chemistry/kori_chemistry_2_kaitei/contents/ch-2/5-bu/5-1-1.htm

¹⁴ 生細胞内でつくられ、生物体のほとんどすべての化学反応の触媒(化学反応の前後ではその物質自身は変化しないが、ある化学反応の速度を変える役割をする物質)となる物質。(旺文社 生物事典)

¹⁵ 体が根・葉・茎の三器官に分化している植物。種子植物とシダ植物が含まれる。(出典 三省堂 大辞林)

解産物は、師管¹⁶を通じて、貯蔵器官に運ばれる。細胞のプロテアーゼのほとんどを含んだ液胞¹⁷は、機能的に動物のリソソームに相当し、¹⁸タンパク質のターンオーバーの大部分を担っていると考えられている。Matile (1975)は、液胞プロテアーゼの活性は、葉の老化と花の色褪せの間に増加するということを示した。このことは細胞のタンパク質の分解における液胞の役割を強く提唱しているが、液胞内の内在的なタンパク質の分解の明確な証拠は提唱していなかった。

出芽酵母¹⁹の細胞はたいてい、いくつかの液胞を含んでいる。プロテイナーゼ A,B、カルボキシペプチターゼ Y、そしてアミノペプチターゼ I といった主なプロテアーゼは、液胞内に限定して存在する (Wiemken et al., 1979)。これらの酵素や、酵素の生合成²⁰は幅広く研究されてきた (Achstetter and Wolf, 1985; Klionsky et al., 1988, 1990)。そして、これらのタンパク質分解酵素のいくつかの特別な役割が提唱されてきた。近年 (1991 年)、Chiang と Schekman は、液胞プロテイナーゼは、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ²¹による糖新生²²作用において、重要な調節酵素の分解に関与しているかもしれないと提唱した。これらの液胞プロテアーゼの濃度は細胞に供給される炭素源や窒素源によって異なる (Distel et al., 1983; Hansen et al., 1977; Saheki and holzer, 1975)。それらはまた、細胞の成長段階によって変化し、静止期に至った時、最大濃度に達する (Frey and Rohm, 1978; Trumbly and Bradley, 1983)。

¹⁶ 維管束の支部にあり、管状の細胞が縦に並びその上下の細胞壁は多数の小孔があり、ふるい状になっており師板と呼ばれるが、この孔を通じて葉で同化させた養分の移動が行われる。(出典 旺文社 生物辞典)

¹⁷ 細胞内の原形質とは別の水溶液を満した空間。(出典 旺文社 生物辞典)

¹⁸ 損傷したタンパク質がプロテアーゼにより認識されて分解・除去され、その後新規に合成されたタンパク質で置き換えられること。

¹⁹ 細胞の一端から芽が出て、それが成長し、母細胞から離れて娘細胞となる、出芽によって増える酵母(出典 (公財)微生物化学研究会 微生物化学研究所 鈴木浩典)

²⁰ 生物体により行われる合成化学反応 (出典 旺文社 生物事典)

²¹ フルクトース 1,6-二リン酸の 1 位リン酸エステルを加水分解して、フルクトース 6-リン酸と無機リン酸を生じる酵素。(出典 WEBLIO)

²² 血糖が不足した場合、肝臓では糖質以外の物質からもグルコースが合成される。この反応は糖新生と呼ばれ、その過程では ATP が消費される。糖新生は肝臓のほか腎臓でも行われる。(出典 第一学習社 スクエア最新図説生物 neo 八訂版)

胞子形成²³の間に、大規模な細胞タンパク質の分解が起こり、(Esposito et al., 1969; Hopper et al., 1974) いくつかの液胞プロテアーゼの濃度が上昇した (Betz and Weiser, 1976; Klar and Halvorson, 1975; Chen and Miller, 1968)。実際、プロテイナーゼ A と B の活性が欠乏した細胞は、通常の胞子形成の過程を経験することができなかった (Mechler and Wolf, 1981; Teichert et al., 1989; Wolf and Ehmann, 1979; Zubenko and Jones, 1981)。これらの発見は、酵母の液胞内でのタンパク質分解が、栄養不足状態のタンパク質のターンオーバーに必要不可欠であることを示す。しかし、液胞におけるタンパク質分解の詳細なメカニズムと、すべてのタンパク質のターンオーバーへのそのの寄与は未だ不明確である。この研究では、液胞プロテアーゼを欠く菌株を使用して、様々な悪条件において、酵母で活発なオートファジーが発生することを初めて証明した。

²³ 栄養源が少なくなると、分裂酵母は胞子形成を開始します。二つの一倍体細胞が接て、二倍体となり、減数分裂と同時に胞子の細胞膜となる「前胞子膜」が形成されます。分裂により分かれた核を取り囲むように前胞子膜が伸張し、包み込みます。最後に細胞壁が形成され、胞子が完成します。(出典 大阪市立大学 大学院理学研究科・理学部生物学科 細胞機能学研究室分裂酵母グループ)

結果

窒素欠乏状態での液胞内の球状構造体の出現

この研究の理論的根拠は、液胞プロテアーゼを欠損した変異細胞が栄養不足に対してオートファジー反応を示すならば、液胞に隔離された細胞成分は、分解せず液胞に蓄積されるはずだというものだ。この可能性を調べるために、我々は表1に記載されている複数の液胞プロテアーゼを欠損した様々な菌株を使って、液胞の形態を調べた。栄養の豊富な培地 YEPD では、これらの変異細胞はよく成長し、それらの液胞は野生型細胞 (図.1, a and b) のものと極めて似ているようであった。これらの液胞は透明で、検出可能な粒子はわずかしかなかった。これらの細胞が YEPD から窒素欠乏培地,SD(-N),へと移されると、それらは成長を止める。SD(-N)培地での一時間の潜伏のあと、絶え間ないブラウン運動を示したさまざまな表面構造が、ほとんどすべての細胞の液胞の中で見られた (図.1,e and f)。これらの構造体は数をだんだんと増やしていき (図.1, g and j)、三時間後には液胞のほとんどを埋め尽くした (図.1, i and j)。この段階では、それらの動きが制限されるほどに、液胞内に詰まっていた。構造体が蓄積するにつれて、液胞の区画の総体積は著しく増えた (図.1 参照)。さらに培養すると、液胞は異常な形になり、光学顕微鏡ではほとんど検出できなかった。

染色体が二倍体の多数の液胞プロテアーゼ欠損株は、2%酢酸カリウムのような孢子形成培地では孢子を形成しない。これらの細胞は、2%酢酸カリウムに移されたとき、構造体に蓄積された。しかしながら、構造体の蓄積は以下の理由で厳密には孢子形成と相まっていない。(a)液胞プロテアーゼに欠陥のある一倍体細胞²⁴ (BJ1991, BJ2168, BJ3501, and BJ3505)もまた、それらが YEPD から 2%酢酸カリウムや SD(-N)培地まで移される際に液胞の中で構造体を蓄積した。(b)グルコースは液胞の中のオートファジックボディの蓄積に干渉しなかった。そして、(c) BJ926 の ρ° 株もまた、積極的にそれらの液胞の中にその構造体を蓄積した。

²⁴ 染色体が半減した細胞(理系総合のための生命科学 羊土社)

液胞に球体が蓄積するための条件

栄養供給の要求が満たされると、YEPD 培地から合成培地自体への変化で、構造体の蓄積は誘引されなかった（表 2）。BJ2407 細胞をアミノ酸のない合成培地である SD(-A)に移したとき、ゆっくりではあるがそれらは構造体を蓄積した。そこで、単一の成分の欠乏の影響を調べた。ロイシンまたはトリプトファン of いずれかの欠乏によって、液胞内に構造体が出現した。しかし、どのアミノ酸が省略されたかに従い、これらの構造体の量は異なった。これらのアミノ酸の欠乏条件下では、液胞は、たとえ長期の培養を行ったとしても、構造体で満たされることは決してない。一方で、栄養要求性のあるウラシルの欠乏は、細胞の成長が止まったけれど、全く形態的な変化は引き起こさなかった。（表 2）。

複数の液胞プロテアーゼ欠損株の細胞が YEPD 培地から SG 培地に移された時、それらは成長をやめ、窒素欠乏培地と同じように構造体を蓄積した。それらは炭素源としてグリセロールを使うことが出来ないの（未発表の結果）、それらはこの培地において、炭素欠乏状態にさらされる。また、グリセロールのない培地でもよく似た結果が得られた。硫酸塩欠乏培地へ移しても同様の液胞内の構造が見られた（データ非表示）。これらの結果は、液胞内の構造体の蓄積が、成長を妨げる条件下でのある種の細胞の一般的な反応であることを示している。液胞内にこれらの構造体の蓄積を引き起こすさまざまな欠乏状態に対して、共通の信号があるかどうかはまだわかっていない。

窒素欠乏細胞の電子顕微鏡での観察

栄養欠乏細胞の液胞内に蓄積された構造体の特徴を調べるために、電子顕微鏡で凍結置換固定法²⁵を用いた。窒素が欠乏している SD 培地における飢餓細胞の典型的な姿は図.2 に示している。この培地では、細胞周期の進行はすぐに止まり、二時間後、細胞周期の段階に関わらず、ほとんどの細胞はたくさんの球体が蓄積した。芽や分裂細胞の母部分の中の小さな液胞でさえも球状

²⁵ 細胞を生きたまま瞬間的に凍結固定し、その後、低温下で細胞内の水分を有機溶媒と置換する技法（企業サイトから引用 <https://www.tokai-ema.com/teq2.html>

の構造体を含んでいる。(図.2, 矢頭)液胞の中の構造体は他のいかなる細胞内膜よりも薄く見えた一重の膜によって囲まれていた。(図.2 b,矢)。この構造体の中身は形態学²⁶的に細胞基質に含まれる細胞質リボソームと区別できなかった。これは、酵母細胞が液胞内にあるそれら自身の細胞質の成分を分離させる能力を持つことを示している。したがって、我々は、液胞内にあるこれらの球状の構造体が、オートファジーの結果として形成されたと結論付けた。そして、それらを「オートファジックボディ」と名付けた。

炭素欠乏細胞におけるオートファジックボディの蓄積

YEPD で成長したプロテアーゼ欠乏細胞の液胞に貯蔵されたオルガネラは、非常に正常に見える。いくつかの薄い部分は、6から8枚のシステルナを伴う典型的なゴルジ体として正しく組織化されて見えた。YEPDにおいて、すべての成長段階のこれらの細胞の液胞は、(オートファジックボディのような)小さな粒子(図.3 a, 矢頭)を除き、検出可能な構造を含まなかった。しかし、SG 培地においては、直径約 400 ナノメートルのオートファジックボディが 30 分以内に現れた。3 時間の培養ののち、液胞はほとんど直径約 400~900 ナノメートルのオートファジックボディで満たされており、それは窒素欠乏条件下で誘導されたものと明らかな形態学的な違いを示さなかった。8 時間の培養ののち、ほとんどのオートファジックボディはまだ傷ついていなかったが、少し壊れたものもあった。そしてそれらの膜片(図 3 d 矢印)やリボソームは液胞液に現れた。SG 培地でのオートファジックボディの蓄積は、SD(-N)培地でのオートファジックボディの蓄積より少しだけ遅かった。さらに、このような炭素欠乏条件下では、液胞はオートファジックボディで決して満たされることなく、それゆえにブラウン運動を示し続けた。

液胞内のオートファジックボディの中身

ほとんどのオートファジックボディの細胞質リボソームと同じ濃度のリボソームを含んでいたが、いくつかはより高濃度のリボソームを含んでお

²⁶ 生物学の一分科で、生物の体制や構造を研究する学問
デジタル大辞泉

り、それらが凝縮したことを示している。(図3c, 矢印)。現在、この凝縮がいつどこで起こるのかはわからない。

ときおり、オートファジックボディがRER(図3, bとc)ミトコンドリア(図3d, 矢印)及び、糖質顆粒、グリコーゲン顆粒、小胞膜などの他の細胞内器官を囲った。ある場合では、それらはミトコンドリアだけしか含んでいなかったが(図3d, 矢印)、またある場合では細胞質基質も含んでいた(図4a, 矢印)。ミトコンドリアの液胞への取り込みは、DAPIによる生体染色によっても実証された。通常成長している細胞では、染色されたミトコンドリアのDNAは通例、玉の列(図4b, 矢印)や点(図4b, 矢印)で現れた。これらの細胞がSD(-N)培地で培養されたとき、ミトコンドリアのDNAは数個の点が合体した形で現れた。欠乏状態の間、液胞内にミトコンドリアDNAの点が現れた(図4, b, c, and d)。これらの液胞内に取り込まれたミトコンドリアの核様体の点は、活発なブラウン運動を示したので、容易に区別できた。数時間の培養の後、ほとんどの細胞の液胞内にはミトコンドリアの核様体の点が4~6個あり、中には10個もの点があるものもあった。これらの結果は、ミトコンドリアのかなりの部分が、窒素欠乏条件下で分解されるために液胞の中に隔離されたことを示している。

広範にわたる電子顕微鏡による観察の間、私たちは膜状の細胞小器官が優先的に液胞内に隔離されるという指標を得なかった。したがって、不利な状況下で退化し液胞内に物理的に隔離されたものは主に、密集したりボソームと多くのハウスキーピング酵素を含む細胞基質そのものであったようだ。

液胞でのオートファジックボディの蓄積に関する突然変異

上記と同じような結果は、多種多様なプロテイナーゼ欠損株で得られた。欠損のある液胞酵素が、液胞でのオートファジックボディの蓄積の原因であるのかを明らかにするために、野生型細胞と多数の液胞プロテアーゼ欠損突然変異株(BJ3505)を交配し、たった一つの液胞プロテアーゼが欠損している突然変異体を作成した。10組の四分子²⁷(子嚢孢子)を調べると、プロテイナーゼA(PrA)か、あるいはプロテイナーゼB(PrB)を欠損している細胞はオー

²⁷ 1 孢子母細胞が4個に分かれて生じるもので、この際減数分裂が行われる。(ブリタニカ国際大百科事典)

オートファジックボディを蓄積したということが示された。四分子分析²⁸の典型的な結果は表Ⅲに示した。KYT 1-3A と 3C は、*PEP4* (*PRA1*) 遺伝子と *PRB1* 遺伝子の欠損株であり、どちらも液胞内にオートファジックボディを蓄積した。しかし、*PRC1* 遺伝子が欠損している YW12 はオートファジックボディをほとんど蓄積しなかった。これらの結果は、CPY 自体がこの現象に関係しないことを示している。PrA をコードする *PEP4* 遺伝子の突然変異は他の液胞酵素の多面的な欠陥を引き起こす(Jones, 1984)。なぜなら、PrB を含む様々な液胞酵素の不活性前駆物質を活性化するのに PrA が必要であるからだ。それゆえ、液胞におけるオートファジックボディの蓄積はおそらく、PrB 活性が失われた結果だろう。

この結論を確立するために、標準的な方法で YPH499 の *PRB1* 遺伝子を破壊し、STY99 株を作成した。YPH499 と *PRB1* 遺伝子破壊株 (STY99) を様々な飢餓状態で 3 時間培養した。STY99 細胞は複数のプロテアーゼ欠損細胞と全く同じ方法でオートファジックボディを蓄積したが、YPH499 細胞の液胞ではオートファジックボディの蓄積は観察されなかった(データ未表示)。したがって、*PRB1* 遺伝子の産物である PrB が欠乏すると液胞でのオートファジックボディの蓄積がされると結論づけた。そして、さらなる生化学的分析では主に STY99 細胞を使用した。

オートファジックボディの生化学分析

よりオートファジックボディの特徴を捉えるために、飢えた細胞から液胞を単離させた。窒素欠乏状況下で、液胞は球体の外形を失い、単離が難しくなった。しかし、炭素欠乏状況下では、液胞は球体の外形を保ち、Ohsumi と Anraku による方法の修正によって、良い効率で単離することができた

(1981)。これらの単離した液胞は、図 5(矢頭)で示されているように、そのままのオートファジックボディを含んでいた。キナクリンで染めた細胞内の液胞や核膜、そしてオートファジックボディは SG 培地で培養された。単離された液胞膜とオートファジックボディもまた、キナクリンに染められた。そし

²⁸ 胞子形成・減数分裂における染色体の相同組換えを利用した遺伝的解析手法のひとつ、酵母をはじめ、胞子形成が可能な生物で用いられる。二倍体から形成される 4 つの胞子を顕微鏡下で分離し、それぞれの表現型を観察することにより目的遺伝子を解析する。(羊土社のサイトより引用 <https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/keyword/408.html>)

て、蛍光顕微鏡を使って、我々は5~20個のオートファジックボディを含んだ液胞膜を発見した。液胞の単離に使用される方法は浮力に依存していたため、オートファジックボディの少ない液胞を優先的に収集した可能性がある。

飢餓細胞から単離された液胞全体は、細胞質基質のマーカー酵素であるG6PDHのわずかな活性しか示さなかった。しかし、超音波処理または凍結融解後の調整物には、かなりのG6PDH活性が見られた。このようなG6PDHの潜在的な活性は、図.6(黒丸)でみられるように飢餓の間に上昇した。500nmの単一のオートファジックボディの量が細胞質基質の量の約0.1%であるとする、G6PDHの活性は、分離した液胞を合体したオートファジックボディの全量にちょうど一致する。それどころか、野生型の細胞の液胞では飢餓の間、酵素活性は高くならなかった(図.6 白丸)。これは、潜在的なG6PDHがオートファジックボディのなかに存在することを示す。さらに、ほとんどが細胞質のリボソームからくる、260nmで吸収した物質の蓄積の時間経過は似ていた(データ非表示)。これらのデータは、オートファジックボディの中の細胞質リボソームの蓄積を電子顕微鏡の分析によって観察したデータと一致している。予備の実験では、飢えた細胞の液胞でのG6DPHの特定の活性は、細胞質でのその活性と似ていたということを示した。これは、少なくとも1つの細胞質基質中の酵素が、完全な形態で液胞中に分離していることを示唆する。

野生型細胞の液胞におけるオートファジックボディーの誘導

PrBはセリンプロテイナーゼであり、この酵素のいくつかの特定の阻害剤が報告されている。セリンプロテイナーゼの阻害剤であるオリゴペプチドロイペプチンは、完全な野生細胞のプロテイナーゼに影響を与えなかった。加えて、Riezmanによって1895年に示されているように、エンドサイトーシスによって液胞に誘引するために細胞に適用されたよりも高濃度のロイペプチンも、オートファジックボディーの蓄積を起こさなかった。

しかし、YEPDで成長させた野生型細胞を1mMのPMSFを含むSD(-N)培地で浮かせたとき、*prbl*や複数のプロテアーゼ欠損変異体とちょうど同じ方法で、オートファジックボディがそれらの液胞内に現れた(図7a)。それらは4時間以内に液胞を満たし、安定して液胞内にとどまった。電子顕微鏡での

調査において、野生型細胞で PMSF によって誘引されたこれらのオートファジックボディは、プロテアーゼ欠損細胞で蓄積されたものと形態では見分けがつかなかった。これらのオートファジックボディの蓄積は、PMSF を培地に加えるだけで野生型細胞で誘発される。

オートファジックボディが通常のオートファジックプロセスの途中である場合、それらは *PRB1* 細胞で急速に退化されるはずだ。これを実証するため、我々は液胞内に蓄積されたオートファジックボディでの PrB の働きにおける回復の効果を調べた。PMSF の効果は不可逆的であると知られているため、私たちは PMSF でオートファジックボディを蓄積していた細胞を PMSF なしで新しい YEPD 培地へと移した。これらの細胞内では、オートファジックボディが 3~4 時間以内に完全に消滅した (図 7 b)。この時間の中に、細胞は多くて二回分裂したので、オートファジックボディが急速に消滅したことを希釈によって簡単に説明することはできなかった。この発見は、オートファジックボディが液胞内で分解されることと、それらが分解のために液胞内に隔離されたサイトゾルの一般的な中間の形であるという考えを支持している。

飢餓の間のタンパク質分解の概算

生体内でのタンパク質分解は、 $[^{14}\text{C}]$ ロイシンで標識された細胞から培地への放射能の放出として測定された。均一に標識された野生型細胞 (YPH499) が SG(-N)培地か SG 培地で培養されると、放射能はだんだん培地に放出された (図 8a)。*prb1*細胞 (STY99) からの放出は著しく少なかった。さらに、YPH499 からの放射能の放出は PMSF に対して感度が高かったが、STY99 からの放射能の放出はそうではなく、PMSF の存在下で YPH499 からの放出と STY99 からの放出が一致した (図 8, a と b)。これらの結果は、以下の結論を支持している。(a)炭素飢餓は、タンパク質分解と細胞からのアミノ酸 (またはそれらの誘導體) の一部の遊離を誘導する。(b)このタンパク質分解は PrB 活性に完全に依存している。そして、(c)野生型細胞に対する PMSF の主な作用は、液胞における PrB 活性の阻害である。細胞からの放射能の放出は、SG 培地よりも SD(-N)培地でのほうが少なかった。これはおそらく、エネルギー源が存在するところで細胞内のアミノ酸が保持されるためである。これらの結果は、不都合な条件下での酵母によるタンパク質分解の主な経

路が PrB に依存していることを示し、これらの条件下でのタンパク質のターンオーバーにおいて、液胞でのオートファジーが最も重要であることを示唆している。

液胞の中のオートファジックボディの蓄積においてのさまざまな試薬の効果

窒素欠乏状態下での、オートファジックボディの蓄積においての様々な試薬の効果进行测试した。タンパク質の新規合成はオートファジックボディの蓄積の必須条件である。その理由は、それらの蓄積が、飢餓の始まりの状態、 $25\mu\text{g/ml}$ シクロヘキシミドの追加によって完全に阻害されたからである。対照的に、 $50\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールは、多数の液胞のプロテアーゼ欠乏細胞の液胞の中のオートファジックボディの蓄積に影響を及ぼさなかった。(表 IV)

NEMはゴルジ体間のタンパク質の輸送や様々な膜融合現象の阻害をすると報告された (Malhotra et al., 1988; Wilson et al., 1989)。飢餓培地への 0.1mM NEM の添加は、液胞内のオートファジックボディの蓄積を完全に失くした (表 IV) が、細胞の生存率には影響しなかった。したがって、酵母細胞のオートファジーのプロセスには、1つまたは複数の NEM の感受性の段階があるに違いない。

細胞質ゾルの Ca^{2+} 濃度は、カルシウムイオノフォア A23187 で処理することにより上昇した。A23187 の添加は、液胞内のオートファジックボディの蓄積に影響を与えなかった (表 IV)。

BJ926、BJ2407、BJ3505、または STY99 細胞を、キナクリンを含む SD (-N) 培地で培養した場合、キナクリンは液胞に濃縮されたことにより、窒素飢餓中に液胞膜を横切る pH 勾配が維持されていることを示している。液胞の膜を介した pH の勾配がなくなると、液胞内の酵素が誤って輸送されると報告されている (Rothman et al., 1989)。バフィロマイシン A1 は、菌類、植物細胞、動物細胞にある液胞型 H^+ -ATP アーゼに対する強力な阻害剤である。そして、 $10\mu\text{M}$ のバフィロマイシン A1 存在下で、酵母の液胞はキナクリンによって全く染色されなかった (データ非表示)。しかし、オートファジックボディの蓄積は $10\mu\text{M}$ のバフィロマイシン A1 存在下で正常に進行した (表IV)。

このように、液胞の酸性化はオートファジックボディの蓄積に必要ない。この結論は 200mM の酢酸アンモニウムを使うことで裏付けられた。

考察

この論文では、我々は、液胞プロテアーゼを欠く酵母細胞が、さまざまな環境の悪条件下で広範なオートファジックボディの蓄積を示すことを実証した。遺伝子破壊と抑制の影響に関する実験によって、PrB の欠損がこの現象の原因であることを示した。さらに PMSF を使って、我々は野生型細胞におけるオートファジックボディの蓄積を実証し、これらのオートファジックボディが PrB 活性の回復のもとで液胞から急速に消失することを発見した。さらに、野生型細胞が YWPD 培地から栄養欠乏培地へと移されたとき、いくつかのオートファジックボディが 1, 2 時間の間、一時的に観測されたが、さらなる蓄積は起こらなかった。これらの事実は、オートファジックボディが野生型細胞において、急速に分解されたことを示している。

液胞内のこれらのオートファジックボディを特徴づけるために、我々はそれらの観察に急速凍結、凍結置換固定法を用いた。液胞内液は塩水溶液のようなものなので、その中で浮遊する包有物を上手く維持することはとても難しかった。しかし、クライオ固定と凍結置換固定によって、十分な準備が得られた。これらの手法はまた、細胞質基質の最も確かなマーカーを提供した細胞内膜槽と細胞質リボソームの保存を大幅に改善した。オートファジックボディの形成機構は、この研究では取り組まれなかったが、予備実験は、オートファゴソームが細胞質内で形成されたのちに、液胞膜と融合しているだろうということを示している。(Baba,M,et al, 原稿準備中)

オートファジーに関する一つの問題は、物質がリソソームや液胞で隔離されるのは、選択的か非選択的かということである。酵母において、少なくとも電子顕微鏡では、オートファジックボディの中身は細胞質基質そのものとは区別できなかった。いくつかのオートファジックボディには、RER、小胞体、ミトコンドリアなどが含まれていることがわかった。しかしながら、これを示すには量的な分析が必要であるが、ネズミの肝臓におけるオートファジーのいくつかの事例で報告されているように (Seglen, 1987)、これらの膜状の細胞小器官は、選択的にオートファジックボディに蓄積されなかったと思われる。

YEPD のような栄養培地で成長した酵母細胞は急成長に適応し、その培地から栄養を得たりする可能性がある。これらの条件では、細胞の細胞質基

質は多数のリボソームと、エネルギー供給（発酵）とタンパク質合成のための高レベルのハウスキーピング酵素を含んでいる。これらの細胞が細胞の成長を促進しない培地に移されると、悪環境に適応するためにリボソームとハウスキーピング酵素を分解するはずだ。リボソームの数は成長培地に依存し、孢子形成の初期段階で大幅に (>40%) 減少する。(Hopper et al., 1974) 孢子形成過程は窒素飢餓によって引き起こされる。したがって、この細胞分化は、既存のタンパク質の分解に完全に依存しているに違いない。今回の結果は、さまざまな飢餓条件下でのタンパク質分解がオートファジーによって媒介され、液胞内の細胞成分の通常の分解過程の欠陥が、液胞プロテナーゼ変異体の孢子形成陰性表現型の理由である可能性を強く示唆している。窒素や硫酸塩の欠乏状態の時、酵母細胞は、細胞周期の G1 に入ることが知られている。しかし、複数の液胞プロテナーゼの欠乏している変異体は、これらの状況下で細胞周期を通して、進行できない。それゆえ、液胞内のタンパク質分解は、不利な状況下での、細胞周期を通して、プロセスに必要な物質の供給の主要な過程に違いない。

多くのステップを伴うオートファジーは、厳密に制御されているにちがいない。オートファジーの全過程の分子メカニズムを解明するための最も有望なアプローチは、その遺伝子を基本的な段階で分析することかもしれない。この論文で報告されているオートファジーを誘導する実験手順は簡単である。ほとんどすべての細胞を栄養不足の培地に置くことで、オートファジーを同時に誘導することができる。液胞のファゴリソソーム段階でのオートファジックボディの蓄積は、光学顕微鏡によって観察できる。これは、オートファジーの発生が液胞にオートファジックボディが出現することによって判断できることを意味する。それゆえ、オートファジーの過程に欠損のある変異体は容易に特定され、分離されるだろう。酵母の液胞は、動物細胞のリソソームよりもはるかに均質性があり、容易に分離される。遺伝学研究に加えて、生化学や分子生物学の研究方法は、分子レベルでのオートファジーの全過程の理解に役立つかもしれない。

図の説明

図 1

窒素飢餓状態における複数の液胞プロテアーゼ欠損変異体の液胞の形態変化。BJ2407 細胞の各段階における SD(-N)培地での変化 0分 (aとb) 15分 (cとd) 1時間 (eとf) 2時間 (gとh) 3時間 (iとj) 位相差顕微鏡での観察 (a, c, e, f, i) とノマルスキー型微分干渉顕微鏡での撮影 (b, d, f, h, j) 写真下部にある線は、1 μm を表す。全ての変異体において似たような結果が得られた。

図 2

窒素欠乏条件下での、多くのタンパク質が欠乏した細胞内の液胞の形態。BJ3505 細胞が SD(-N)培地で 2 時間培養された。(a)低倍率で(b)ある典型的な細胞を高倍率で AB,オートファジックボディ; V,液胞。使用されたすべての突然変異種において、本質的に酷似した画像が得られた。

図 3

炭素欠乏条件下での液胞の形態的な変化。BJ926 細胞を SG 培地で(a)0分、(b)30分、(c)3時間、(d)8時間培養した。cは高倍率での粗面小胞体を含むオートファジックボディを示している。線は 100 nm を表している。AB はオートファジックボディ、G はゴルジ体、rER は粗面小胞体、V は液胞。

図 4

液胞へのミトコンドリアの取り込み (a)2時間 SD(-N)培地で培養された BJ926 細胞の電子顕微鏡写真 (b-d) 5時間 SD(-N)培地で培養された BJ926 細胞の蛍光顕微鏡写真 細胞は DAPI で染色された。3枚の写真は同じ焦点面で撮影された。核 DNA の位置は 2つの矢印で示されている。(e)同じ細胞の位相差画像 V は液胞

図 5

オートファジックボディーを含む分離された液胞。液胞は 4 時間で SG において生成された BJ3505 細胞から分離された。(a)位相差画像 (b) キナクリンで染色した液胞の蛍光画像

STY499 と他の多数のプロテアーゼ欠乏細胞で同様の準備が得られた。線 1 μ m

図 6

単離された液胞中の細胞酵素 G6PDH の活動現象。液胞中の潜在的な G6PDH の活性は、スフェロプラストの溶解物におけるあらゆる活性としてあらわされる。液胞中の潜在的な活動は STY99 (*prb1::TRP1*) から作成される。液胞中の潜在的な活動は YPH499 (*PRB1*) から作成される。

図 7

PMSF の存在下での野生型細胞におけるオートファジックボディーの蓄積

(a) YEPD で増殖させた YPH449 細胞を、1 mM の PMSF を含む SG 培地に 4 時間移した
(b) 次に、細胞を収集し、新鮮な YEPD 培地に 4 時間再混濁させた。

線 5 μ m

図 8

PrB に依存する、¹⁴C ロイシンで標識された細胞からの放射能の放出

培地内での YPH499(a)あるいは STY99(b)からの放射能の放出は、材料と方法で述べられているように測定された。

1 mM の PSMF を含む場合 (白点)

1%のエタノールを含む場合 (黒丸)