

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	出芽酵母のオートファジーにおける隔離膜前駆体の形成と膜伸張のメカニズムの研究
Title(English)	
著者(和文)	志摩喬之
Author(English)	takayuki shima
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11217号, 授与年月日:2019年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中戸川 仁,山口 雄輝,立花 和則,加納 ふみ,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11217号, Conferred date:2019/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論文要旨

(和文2000字程度)

Dissertation Summary (approx. 2000 characters in Japanese)

報告番号 For administrative use only	乙 第 号	氏 名 Name	志摩喬之
---	-------	-------------	------

(要 旨)

(Summary)

オートファジーは、細胞内成分の主要な分解機構の一つであり、酵母からヒトまで真核生物に高度に保存されている。オートファジーが誘導されると、細胞質に扁平状の「隔離膜」が形成され、これが伸展して袋状となり、最終的には球状となって端が閉じ、二重膜構造であるオートファゴソームが完成する。この過程で、細胞質成分の一部がオートファゴソームに封入される。オートファゴソームの外膜がリソソーム/液胞の膜と融合すると、内容物はオートファゴソームの内膜とともに、リソソーム/液胞内の酵素群によって分解される。オートファジーは、栄養飢餓時には細胞内成分を大規模かつ非選択的に分解するが、ミトコンドリアやペルオキシソーム等のオルガネラや、タンパク質凝集塊、細胞内に侵入した細菌などを特異的に認識し分解する選択的なモードのオートファジーも存在する。オートファジーは近年、発生や分化、老化、抗原提示等の様々な生理機能にも重要であることが明らかとなった。さらには、パーキンソン病やアルツハイマー病、肝疾患等の病気の発症にも深く関与するとの報告が相次ぎ、オートファジーは細胞や個体にとって、広く重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。

オートファゴソームの形成には、19の“コアAtg (autophagy-related)タンパク質”が関与する。唯一の膜タンパク質であるAtg9はゴルジ体由来する直径30～60 nmの単膜小胞（Atg9小胞）に局在し、膜形成のための“核”として機能すると考えられている。これまで当研究室を含む多くの研究室が、Atgタンパク質の解析を中心として、オートファゴソーム膜の形成機構の解明に取り組んできたが、「隔離膜の前駆体はどのようなものか」、「膜伸張における膜の供給源は何であるか」など、基本的な問題が未だ明らかになっていない。

最近、当研究室での出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いた研究から、“隔離膜前駆体”と考えられる膜構造が見いだされた。また、最近、膜の供給源として有力な候補であるCOPII小胞（小胞体から形成されるゴルジ体への輸送小胞）を高度に標識する新規手法が開発された。本研究では、このような背景に基づき、「隔離膜前駆体の解析」と「COPII小胞がオートファゴソーム形成における膜の供給源であることの立証」を目標とした。

まず、隔離膜前駆体が蓄積するATG2欠失株を用いて界面活性剤非存在下でAtg9を免疫沈降することにより、隔離膜前駆体の単離に成功した。隔離膜前駆体には、隔離膜伸張に重要なAtg8とホスファチジルエタノールアミン(PE)との結合体や、ホスファチジリノシトール (PI) 3-キナーゼ複合体IのサブユニットであるAtg14、さらにはその産物であるPI3-リン酸が含まれることが明らかとなった。さらに、隔離膜前駆体は、複数のAtg9小胞同士の融合により形成される単膜小胞であり、その融合には、

Atg1やAtg8などのコアAtgタンパク質が必要であることを示した。また、ゴルジ間の小胞輸送に機能する3種類のQ-SNAREタンパク質Sed5、Gos1、Sft1がAtg9小胞に存在することや、R-SNAREタンパク質Ykt6が隔離膜前駆体の形成過程でリクルートされることを明らかにし、これらのSNAREタンパク質が隔離膜前駆体の形成においてAtg9小胞同士の融合を媒介する可能性を示した。

また、COPII小胞の積み荷である膜タンパク質を用いてCOPII小胞を高度に標識する新規手法を利用し、この膜タンパク質が、COPII小胞への積み込みに依存して、オートファゴソーム形成の場に局在化し、最終的に隔離膜及びオートファゴソーム膜の一部となることを示した。

以上のように、本研究により、オートファゴソーム形成の初期に生じる隔離膜前駆体の実体が明らかとなり、その形成機構の理解が大きく進んだ。また、COPII小胞がオートファゴソーム形成における膜の供給源の1つであることを実験的に証明することに成功した。これらの成果をもとに、今後、長らく謎に包まれていたオートファゴソームの形成機構の理解が飛躍的に進展すると期待される。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

Dissertation Summary (approx. 300 words in English)

報告番号 For administrative use only	乙 第	号	氏 名 Name Takayuki Shima
(要 旨) (Summary) In autophagy, an intracellular degradation system involved in various cellular functions, a flattened membrane vesicle called the isolation membrane (IM) appears, and expands to form a double-membrane vesicle called the autophagosome (AP). In this process, cytoplasmic constituents are enclosed within the AP, and delivered to the lysosome or vacuole for degradation. AP formation requires autophagy-related (Atg) proteins. Atg9 is an integral membrane protein localized to Golgi-derived, small vesicles called Atg9 vesicles. These vesicles serve as a “seed membrane”, and Atg9, in cooperation with other Atg proteins, acts to form the IM. These proteins also found in the IM and should function to expand the membrane. In addition, proteins associated with the secretory pathway have also been reported to play crucial roles in these processes. However, the fundamental mechanism of AP formation still remains unclear. In this study, I identified a precursor of the IM (preIM), as a novel structure accumulated in cells lacking Atg2, which functions to tether the pre-autophagosomal structure to the endoplasmic reticulum. My analysis suggested that the preIM was formed at the site of AP formation in a manner dependent on the Atg proteins. The preIM was a single-membrane vesicle, which contained Atg9 but was larger than the Atg9 vesicle. The preIM also contained other Atg proteins and phosphatidylinositol 3-phosphate essential for AP formation, which were not detected in the Atg9 vesicle. My analysis also suggested that the preIM was formed via SNARE-mediated homotypic fusion of a few Atg9 vesicles. Thus, this study revealed membrane dynamics during the nucleation step in autophagosome formation and mechanisms underlying this process. On the other hand, although previous studies suggested that COPII vesicles are closely associated with AP formation, it remains unclear whether these vesicles serve as a membrane source for AP formation. Using a recently developed COPII vesicle-labeling system in fluorescence and immunoelectron microscopy, I obtained several data suggesting that COPII vesicles become part of the AP membrane in the process of AP formation. Based on these results, I propose a model for the mechanism of membrane nucleation and expansion during AP formation.			

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.