

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	オートファジーによる核膜孔複合体/ヌクレオポリンの分解
Title(English)	
著者(和文)	富岡優衣
Author(English)	Yui Tomioka
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11549号, 授与年月日:2020年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中戸川 仁,岩崎 博史,木村 宏,中村 信大,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11549号, Conferred date:2020/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

論文要約

オートファジーによる核膜孔複合体/ヌクレオポリンの分解

生命理工学院 中戸川研究室 富岡優衣

指導教員 中戸川仁

第1章 序論

真核生物はオートファジーと呼ばれる細胞内分解機構を備えている。オートファジーは、細胞内成分の恒常的な新陳代謝を促進するほか、飢餓条件において強く誘導され、分解産物を栄養素として供給するなど、様々な生理的役割を果たしている。その他にも、オートファジーは、異常タンパク質の凝集体や機能不全となったオルガネラ、細胞内に侵入したバクテリアなどの有害物の除去にも重要な役割を果たす。オートファジーが誘導されると、

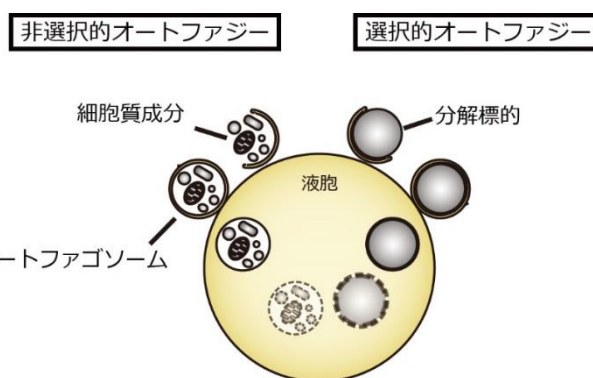


図1 非選択的オートファジーと選択的オートファジー

隔離膜と呼ばれる扁平な膜構造体が細胞質中出现する。これが分解対象を包み込みつつ伸張し、閉じてオートファゴソームと呼ばれる二重膜胞が形成される。オートファゴソームは植物細胞や酵母では液胞と、動物細胞ではリソソームと融合し、その内容物が分解される。細胞質の一部が無作為にオートファゴソーム内に取り込まれる経路は非選択的オートファジー、特定の分解標的が選択的に取り込まれる経路は選択的オートファジーと呼ばれている（図1）。選択的オートファジーにおいては、伸張中の隔離膜に局在する Atg8 が直接、あるいはオートファジーレセプターと呼ばれる分解標的を特異的に認識するタンパク質を介して間接的に分解標的と結合することで、分解標的の効率的なオートファゴソームへの取り込みを媒介する。Atg8 はオートファジーレセプターまたは分解標的が持つ Atg8-family interacting motif (AIM) と呼ばれる配列と相互作用することが知られている。これまでの研究から、ミトコンドリアやペルオキシソーム、小胞体、核、異常タンパク質の凝集体など様々な細胞内成分が選択的オートファジーの標的となることが示されてきた。しかし選択的オートファジーの分解標的となる細胞成分の全体像は不明である。本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、核-細胞質間の物質輸送を担う筒状の巨大タンパク質複合体である核膜孔複合体のオートファジーによる分解について解析した。

第2章 結果

核膜孔複合体の構造は真核生物に広く保存されており、約30種類のヌクレオポリンが7つの部分構造；Cytoplasmic filament、Transmembrane ring、Pore filament、Nuclear basket、Linker、Inner ring、Outer ringを構成している

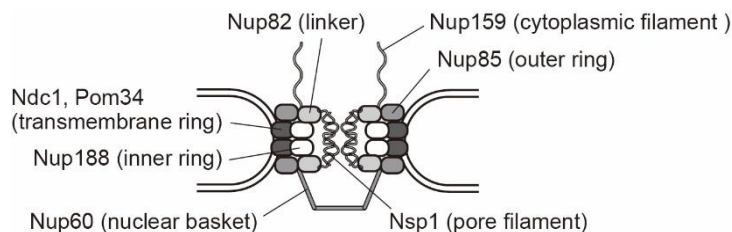


図2 核膜孔複合体の模式図

(図2)。本研究ではまず、それぞれの部分構造に属するヌクレオポリンを一つずつ選び、GFP タグを付加して、これらがオートファジーによって分解されるかを調べた。この融合タンパク質がオートファジーによって液胞へ輸送されると、ヌクレオポリン部分は液胞内で分解されるが、液胞プロテアーゼに比較的耐性のある GFP 部分は液胞内に蓄積する。この GFP 断片を抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティングにより検出することができる。富栄養条件でオートファジーを抑制しているタンパク質リン酸化酵素複合体 TORC1 の阻害剤である rapamycin で細胞を処理したところ、野生型の細胞では GFP 断片が検出された一方で、オートファゴソーム形成に必須の *ATG1* 遺伝子欠失細胞ではこのような断片の蓄積は見られなかった。窒素飢餓培地を用いた場合にも同様の結果が得られた。核膜孔複合体は TORC1 不活性化条件でオートファジーによって分解されることが初めて示された。オートファジーレセプターと相互作用しオートファゴソーム形成の足場を形成する Atg11 や、前述の Atg8 の AIM との相互作用部位もヌクレオポリンの分解に重要であることも、同様の実験から明らかとなり、核膜孔複合体はオートファジーレセプター依存的なメカニズムにより分解されることが示唆された。一方で、核の選択的オートファジー(ヌクレオファジー)のレセプターである *ATG39* を欠失させても GFP 断片の量は部分的に減少するにとどまったため、Atg39 の核膜孔複合体の分解への寄与は限定的であり、核膜孔複合体は主に未知のオートファジーレセプターに依存して分解されることが示唆された。さらに免疫電子顕微鏡解析により、核膜孔複合体は核膜由来の二重膜小胞に埋め込まれた状態でオートファゴソームに取り込まれることが示唆された。

本研究において、核膜孔複合体の分解に特異的に機能するオートファジーレセプターを同定することはできなかったが、ヌクレオポリンの1つである Nup159 が AIM を介して Atg8 と相互作用することを明らかにした。Nup159 の AIM に変異を導入すると、Nup159 と Atg8 との共免疫沈降は見られなくなり、Nup159 の分解に欠損が生じたが、他のヌクレオポリンの分解には欠損が見られなかった。したがって、この相互作用は、Nup159 自身の分解に重要であるが、他のヌクレオポリンの分解には必要ないことが明らかになった。すなわち、Atg8 と Nup159 の相互作用は、核膜孔複合体に組み込まれていない Nup159 のオートファゴソームへの取り込みを媒介することが示唆された。

第3章 考察

本研究では、核膜孔複合体が複数のオートファジー経路を経て分解されることを初めて明らかにした。*S. cerevisiae* において、TORC1 不活性化条件で核膜孔複合体は核膜由来の小胞に組み込まれた状態でオートファゴソームに取り込まれると考えられる。核膜孔複合体の一部は Atg39 依存的ヌクレオファジーに巻き込まれて分解されるが、主には未知のレセプターを必要とする経路で分解されることが示唆された。さらに、核膜孔複合体に含まれない Nup159 が単体、もしくは他のいくつかのヌクレオポリンとの複合体としてオートファジーによって分解されることを見いだした。前者を「NPC (nuclear pore complex) ファジー」、後者を「ヌクレオポリノファジー」と呼ぶことを提唱した。核膜孔複合体の分解に関わるレセプターを同定し、解析することにより、オートファジーによる核膜孔複合体の分解のメカニズム及び生理的意義が明らかになると期待される。本研究は、他の生物種におけるオートファジーによる核膜孔複合体の分解機構や生理的重要性の研究の端緒となると期待される。