

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ複合体Iのオートファゴソーム前駆体への局在化機構
Title(English)	
著者(和文)	人見佳菜恵
Author(English)	Kanae Hitomi
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12491号, 授与年月日:2023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,田口 英樹,下嶋 美恵,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12491号, Conferred date:2023/6/30, 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

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工学 系
Department of Graduate major in 生命理工学 コース
学生氏名： 人見 佳菜恵
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (理学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)： 中戸川 仁
Academic Supervisor(main)
指導教員(副)：
Academic Supervisor(sub)

要旨(和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

オートファジーは真核生物に高度に保存されている細胞内の主要な分解経路である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてオートファジーが誘導されると、オートファジー関連タンパク質 (Atg タンパク質) がオートファゴソーム形成の場を集積し、オートファゴソーム前駆体 (pre-autophagosomal structure, PAS) を形成する。PAS が成熟すると、小胞体から脂質が供給され、隔離膜と呼ばれる膜層板が分解する細胞内成分を包み込むように伸張り、閉じることで、オートファゴソームと呼ばれる二重膜小胞が形成される。オートファゴソームは分解酵素を含む液胞またはリソソームと融合し、オートファゴソームに内包された成分が分解される。

オートファゴソーム形成に必須である約 20 種類の Atg タンパク質はコア Atg タンパク質と呼ばれ、これらは 6 つの機能ユニットを構成している。これらの機能ユニットは液胞膜上に逐次的に集積し、PAS を構築する。これまでの研究により、5 つの機能ユニットの PAS への局在化機構が明らかとなってきたが、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ複合体 I (PI3KCI) の PAS 局在化機構は明らかになっていない。PI3KCI は、ホスファチジルイノシトールをリン酸化することでホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) を産生する PI3-キナーゼの Vps34 を含む複合体である。PI3KCI によって産生された PI3P は、PI3P 結合タンパク質を含む機能ユニットである Atg2-Atg18 複合体および Atg16 複合体の PAS への招集に重要である。

本研究では、PI3KCI のサブユニットである Atg14 にエピトープタグを付加して PI3KCI を免疫沈降し、PI3KCI と相互作用するタンパク質をイムノブロッティングおよび質量分析により同定し、解析することにより、PI3KCI の PAS 局在化機構の解明を目指した。解析の結果、PI3KCI はオートファジーに重要な液胞膜結合タンパク質 Vac8、PAS の足場を形成する Atg1 複合体および PAS に局在化する膜小胞のタンパク質である Atg9 と相互作用することが明らかになった。Vac8 との相互作用には、PI3KCI は Atg14 の C 末端領域が重要であることがわかった。Atg14 に緑色蛍光タンパク質 mNeonGreen を付加し、PI3KCI の細胞内局在を蛍光顕微鏡を用いて解析した結果、PI3KCI-Vac8 間相互作用に欠損のある *atg14^Δ*細胞においては PI3KCI の液胞膜への局在や PAS (赤色蛍光タンパク質 mCherry を付加した Atg1 複合体サブユニット Atg17 が形成する輝点) への局在が顕著に低下した。さらに、細胞質タンパク質である Pgl1 の分解を指標に評価した結果、*atg14^Δ*細胞においてはオートファジー活性が低下していることがわかった。Vac8 は Atg1 複合体を液胞膜に繫留する役割を担うことが報告されている。Vac8 は、PI3KCI の液胞膜への繫留や、液胞膜上での PI3KCI と Atg1 複合体との会合を促進することにより、PI3KCI の PAS への局在化に関与することが示唆された。次に、PI3KCI と Atg1 複合体の相互作用は、PI3KCI のサブユニットである Atg38 の C 末端領域と Atg1 複合体のサブユニットである Atg29 の C 末端領域との相互作用を介して起こることを明らかにした。さらに、PI3KCI と Atg9 との相互作用には、PI3KCI のサブユニットの 1 つである Vps30 の BARA ドメインが重要であることを明らかにした。また、この相互作用には Atg9 が Atg1 複合体との相互作用を介して PAS に局在化することが示唆された。PI3KCI-Atg1 複合体間相互作用および PI3KCI-Atg9 間相互作用の両者を欠損した変異体の作製を試みたが、Atg38 の欠失と Vps30 の BARA ドメインの欠損 (*vps30^{BARAΔ}*) の二重変異体では PI3KCI が不安定になることがわかった。Atg38 は自身の C 末端領域で 2 量体を形成し、N 末端領域で Atg14 および Vps34 と相互作用することで PI3KCI を安定化することが報告されていた。そこで、Atg38 の C 末端領域を欠失させ、そこに Gen4 というタンパク質の二量体化を担う coiled-coil 領域の配列を付加した (*atg38^Δ-GCN4^C*)。 *atg38^Δ-GCN4^C vps30^{BARAΔ}* 二重変異体においては、PI3KCI が安定化し、さらに共免疫沈降解析により、PI3KCI と Atg1 複合体および Atg9 との相互作用が欠損していることを確認した。蛍光顕微鏡解析の結果、PI3KCI-Atg1 複合体間相互作用が欠損した *atg38^Δ-GCN4^C* 株、PI3KCI-Atg9 間相互作用が欠損した *vps30^{BARAΔ}*株において PI3KCI の PAS への局在は部分的に低下し、両相互作用に欠損のある *atg38^Δ-GCN4^C vps30^{BARAΔ}*株では PI3KCI の PAS への局在はほぼ完全に失われた。オートファジー活性においても同様に、片方の相互作用が欠損した株ではオートファジー活性が部分的に減少し、両相互作用が欠損した株ではオートファジーはほぼ停止した。以上の結果から、PI3KCI-Atg1 複合体間および PI3KCI-Atg9 間相互作用の両者が PI3KCI の PAS への局在化およびオートファジーに重要であることが明らかとなった。

本研究により、PI3KCI の PAS への局在化機構および PAS におけるタンパク質間相互作用に関する重要な知見が得られた。本研究の成果は、哺乳動物を含む他の生物におけるオートファジーの分子機構の研究においても重要な指針となると期待される。

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 : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

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。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	人見 佳菜恵		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	中戸川 仁	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Macroautophagy (hereafter autophagy) is a major intracellular degradation system in most eukaryotic cells. When autophagy is induced, a membrane cisterna called the isolation membrane or phagophore forms in the cytoplasm, and it expands, bends, and closes to form a double membrane vesicle called the autophagosome. In autophagy, various cellular components are sequestered within autophagosomes and transported to lysosomes/vacuoles for degradation. Upon autophagy induction, autophagy-related (Atg) proteins assemble and organize the pre-autophagosomal structure (PAS) to initiate autophagosome formation. Although previous studies revealed the mechanisms that target these proteins to the PAS, that for phosphatidylinositol 3-kinase complex I (PI3KCI) remains unknown. To investigate the mechanism that targets PI3KCI to the PAS, I focused on proteins that associate with PI3KCI. In *Saccharomyces cerevisiae*, PI3KCI is composed of the PI3K Vps34 and the conserved regulatory subunits Vps15, Vps30, Atg14, and Atg38. In this study, I tagged the PI3KCI-specific component Atg14 with the FLAG sequence, performed immunoprecipitation of PI3KCI, and discovered that PI3KCI associates with the vacuolar membrane anchor Vac8, the PAS scaffold Atg1 complex, and the pre-autophagosomal vesicle component Atg9 via the Atg14 C-terminal region, the Atg38 C-terminal region, and the Vps30 BARA domain, respectively. While the Atg14-Vac8 association is constitutive, the Atg38-Atg1 complex and Vps30-Atg9 associations are enhanced upon autophagy induction depending on Atg1 kinase activity. A previous study revealed that Atg9 binds to a subunit of the Atg1 complex, and is thereby recruited to the PAS. I found that the association of PI3KCI-Atg9 was decreased in cells defective in Atg9 binding to the Atg1 complex. These data suggest that the PAS localization of Atg9 is a prerequisite for the association of PI3KCI with Atg9. Fluorescence microscopy analysis showed that the associations of PI3KCI with the Vac8, the Atg1 complex, and Atg9 are important for the PAS localization of PI3KCI. Our results allow us to propose the following model for the mechanism of the PAS localization of PI3KCI: (i) PI3KCI is recruited to the vacuolar membrane by associating with Vac8 via the Atg14 C-terminal region. (ii) Upon autophagy induction, PI3KCI binds to the Atg1 complex via the Atg38 C-terminal region at the PAS. (iii) The BARA domain of Vps30 in PI3KCI associates with Atg9 in the Atg9 vesicle associated with the Atg1 complex at the PAS. These associations cooperate to target PI3KCI to the PAS. This study establishes the molecular basis of the PAS targeting of PI3KCI during autophagosome biogenesis.

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：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

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。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).