

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

## 論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	人見 佳菜恵	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	中戸川 仁	教授	藤田尚信	准教授
	審査員	岩崎博史	教授		
		田口英樹	教授		
下嶋美恵		准教授			

### 論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「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」と題し、以下の 4 章より構成されている。

第 1 章「序論」では、細胞内の大規模分解機構であるオートファジーについて、まず、そのプロセスと基本的な生理機能について概説している。続いて、本論文と直接関係するオートファジーに必須の Atg タンパク質群の分子機能およびオートファゴソーム前駆体 (以下、*pre-autophagosomal structure*, PAS と記す) への局在化機構について、主に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の研究により得られたこれまでの知見を詳細に述べ、その一方で、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ複合体 I (以下、PI3KCI と記す) の PAS への局在化機構についてはほとんど明らかになっていなかったことを記し、本研究の目的とその意義を明確にしている。

第 2 章「結果」では、まず、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、共免疫沈降されるタンパク質の中から PI3KCI の PAS への局在化に関与するタンパク質を同定するという方針を述べ、実際に、PI3KCI の免疫沈降産物の質量分析により、オートファゴソーム形成に重要な液胞膜タンパク質 Vac8 を同定したことを述べている。続いて、PI3KCI は Vac8 とオートファジーの誘導に依らず恒常的に相互作用していることを示している。また、変異解析により、PI3KCI と Vac8 との相互作用には Atg14 の C 末端領域が重要であることを明らかにしている。さらに、蛍光顕微鏡解析などにより、Vac8 との相互作用が損なわれると、PI3KCI の液胞膜および PAS への局在化率が低下し、オートファゴソーム形成にも欠損が生じることを示している。これらの結果から、PI3KCI と Vac8 との相互作用は PI3KCI の液胞膜および PAS への局在化に重要であると結論付けている。

次に、PI3KCI の免疫沈降産物を種々の Atg タンパク質に対する抗体を用いたイムブロッティングによって解析し、PI3KCI は、オートファジーの誘導 (Tor キナーゼ複合体 1 の不活化) に応じて、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 とも相互作用することを見いだしている。さらに、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ている。一方、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ている。PI3KCI-Atg1 複合体間相互作用および PI3KCI-Atg9 間相互作用を欠損した変異体の作製し、解析した結果、それぞれ単独の欠損では PI3KCI の PAS への局在化およびオートファゴソーム形成が部分的に低下し、両相互作用を同時に欠損した細胞においては、PI3KCI の PAS への局在はほぼ完全に失われ、オートファゴソームの形成もほとんど起こらなくなることを示している。これらの結果から、PI3KCI-Atg1 複合体間および PI3KCI-Atg9 間相互作用の両者が PI3KCI の PAS への局在化に重要であると結論付けている。

第 3 章「考察」では、以上および本研究で得られたその他の結果に基づき、PI3KCI の PAS への局在化機構について以下のようなモデルを提唱している。「PI3KCI はまず、Vac8 との相互作用を介して恒常的に液胞膜に局在化する。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ことから、PI3KCI と Vac8 との相互作用は、続く PI3KCI と Atg1 複合体との相互作用を促進する可能性が考えられる。栄養飢餓によって Tor キナーゼ複合体 1 の活性が低下すると、Atg1 のキナーゼ活性が上昇する。この活性に依存して、PI3KCI は、Atg38 と Atg29 それぞれの C 末端領域間相互作用を介して、PAS 内の Atg1 複合体と相互作用する。PI3KCI は、さらに、Vps30 の BARA ドメインを介して、PAS 内の Atg1 複合体と相互作用している Atg9 小胞上の Atg9 とも相互作用する。これらの 2 つの相互作用は互

いに独立して成立し、加算的に働いて PI3KCI を安定に PAS に局在化させる。」また、本研究によって生じた新たな問題について整理、議論し、本研究により PI3KCI の PAS への局在化機構の基本的枠組みが明らかになったことにより、すべての Atg タンパク質の PAS への局在化機構に関する知見が揃ったことを踏まえて、Atg タンパク質群による PAS の形成機構についても再考している。本研究で得られた成果を基に、哺乳類細胞における PI3KCI の局在化機構についても考察し、本研究の成果は、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ことが期待されるなど、本研究の波及効果や今後の展望についても述べている。

第 4 章「材料と方法」では、他の研究者が追試実験を行うことができるよう、本研究で用いた実験手法と実験材料の詳細を述べている。

以上を要するに、本論文は、長年未解明であったオートファジーにおける重要なプロセスの分子機構を明らかにしたものであり、理学上ならびに学術上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」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。