

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	オートファジックボディの膜分解メカニズムの解明
Title(English)	
著者(和文)	籠橋葉子
Author(English)	Yoko Kagohashi
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12658号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田口 英樹,岩崎 博史,中戸川 仁,加納 ふみ,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12658号, Conferred date:2024/3/26, 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	籠橋 葉子
本論文は「オートファジックボディの膜分解メカニズムの解明」と題し、四章より構成されている。 第一章「序論」では、細胞の自食作用(オートファジー)についての概説に続き、オートファジー関連膜の形成から分解までの分子機構と膜の脂質組成に関する先行研究について述べている。また、過去の報告に端を発して、オートファジーの後期過程である膜分解の研究が約30年もの間ほとんど進展がないことを指摘し、出芽酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>を用いて、オートファジー関連膜であるオートファジックボディ(AB)の分解機構を解明するという本研究の目的を述べている。 第二章「結果」は、本研究で得られた十七項の結果について論じている。第一項と第二項では、ATG15に由来する液胞内リパーゼ活性と液胞内プロテアーゼであるPep4/Prb1の関係性について述べている。初めに、精製した液胞と蛍光リン脂質を用いて、液胞内リパーゼ活性を測定する<i>in vitro</i>系を構築し、液胞内ホスホリパーゼ活性がATG15に依存していることを示している。そして、この液胞内リパーゼ活性がPep4/Prb1に依存することを示している。第三項では、Atg15のN, Cそれぞれの末端に蛍光タンパク質を付加した融合タンパク質を発現させ、顕微鏡で観察することで、Atg15の液胞内での局在様式を推察している。続く第四項ではこれらの融合タンパク質を検出し、局在観察の結果と併せて解析することで、Atg15においてPep4/Prb1に切断されやすい領域があることを推察している。さらに第五項では、Atg15のC末端にタグをつけて発現させた株から液胞を精製し、解析することで、Atg15のN末端領域がPep4/Prb1によって直ちに切断されることを示している。第六項と第七項では、Atg15のN末端から膜貫通領域までを欠いた領域(液胞内腔ドメイン)の解析結果を述べている。N末端から膜貫通領域までを欠いたAtg15(Atg15^{ΔN35})を発現する株を作製して<i>in vivo</i>でのAB分解活性を評価し、液胞内腔ドメインがAB分解に十分であることを示している。また、Atg15^{ΔN35}を発現するPep4とPrb1の二重欠損株では、液胞内リパーゼ活性が見られなかったことから、活性型Atg15の出現にはAtg15の膜貫通領域よりもC末端側(液胞内腔領域)の切断が必要であると推察している。さらに、Atg15^{ΔN35}に蛍光タンパク質を付加し、局在解析を行った結果から、Atg15の液胞内腔領域はAB膜に結合する性質をもつことを述べている。第八項から第十一項では、液胞内で切断を受けたAtg15の存在状態について述べている。まず、液胞内のAtg15切断フォームの解析を行うために、Atg15の内部領域にタグを挿入し、ATG15の欠損を相補することを確認している。このAtg15を発現する株の液胞を遠心分画した結果より、Atg15の切断フォームは膜へ強く結合することを論じている。また、密度勾配遠心によってAtg15の切断フォームが結合する膜を解析し、その考察を述べている。第十二項から第十六項では、活性型Atg15を精製し、その特性について述べている。免疫沈降法により液胞から精製したAtg15は、低い基質特異性をもつホスホリパーゼBの活性を持つことを論じている。さらに、ABの分解活性を評価する<i>in vitro</i>系を構築し、活性型Atg15がABを分解することを示している。最後に、活性型Atg15をグルコース過解析した結果について述べている。第十七項では、本研究で得られた結果を基に、AB分解メカニズム			

ムのモデルを提案している。

第三章「考察」では、本研究で得られた結果をまとめ、考察するとともに今後の展望について述べている。

第四章「材料と方法」では本研究で用いた研究試料と実験方法について説明している。試料の作製方法とその一覧に続き、本研究で行った各種酵素の活性測定方法や物性評価の方法について説明している。

以上を要するに、本論文は液胞内プロテアーゼによる切断を受けて活性化した**Atg15**リパーゼが、**AB**膜を分解する機構を明らかにしたものであり、理学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。

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	Yoko Kagohashi
During autophagy in yeast, autophagosomes deliver cellular components to the vacuole, resulting in the release of a cargo-containing autophagic body (AB) into the vacuole. AB membranes must be disrupted for degradation of cargo to occur. The lipase Atg15 and vacuolar proteases Pep4 and Prb1 are known to be necessary for this membrane disruption, but the mechanistic underpinnings remain unclear. In this study, I investigated the AB disruption mechanism by focusing on Atg15 and Pep4/Prb1. First, I established in vitro lipase assay system that can detect vacuolar lipase activity derived from Atg15. The lipase activity was not detected in the absence of Pep4/Prb1. Western blot analysis showed that most Atg15 in the vacuole was cleaved by Pep4/Prb1 in the N-terminal region including transmembrane (TMD), which acts as a signal sequence for the MVB pathway. The microscopic observation showed that a truncated form lacking the TMD was bound to the AB membrane. Therefore, I conclude that after transport to the vacuole, Atg15 is immediately cleaved from the MVB vesicle and binds to the AB membrane. Using internally FLAG-tagged Atg15, I tried to purify the active Atg15 from the vacuole. The elution fraction obtained by immunoprecipitation had the activity of phospholipase B of broad head-group specificity. Then I established in vitro AB degradation assay system using isolated ABs as substrates and finally demonstrated that the active Atg15 is sufficient to disrupt ABs. Overall, I proposed the AB degradation mechanism model: First, Atg15 is delivered to the vacuole by the MVB pathway, where it is immediately cleaved from MVB vesicles by Pep4/Prb1. The processed forms are bound to the AB membrane and activated by Pep4/Prb1 either during or following the localization of Atg15 to AB membrane. Then, the active Atg15 ruptures the AB membrane by phospholipase B activity.				

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.