

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	出芽酵母におけるオートファジー関連E3酵素複合体のオートファゴソーム前駆体への局在化機構の研究
Title(English)	
著者(和文)	原田久美
Author(English)	Kumi Harada
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11216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,太田 啓之,岩崎 博史,中村 信大,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11216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	原田 久美
<p>(要 旨) (Summary)</p> <p>オートファジーは、酵母から哺乳類までの真核生物に保存された細胞内分解システムである。オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる扁平状の膜小胞が形成され、細胞質成分を取り囲むようにして伸張し、球状となって閉じ、オートファゴソームと呼ばれる二重膜胞を形成する。オートファゴソームは液胞（酵母、植物）あるいはリソソーム（哺乳類）と融合し、これらのオルガネラ内の加水分解酵素によってオートファゴソームの内容物が分解される。分解産物は、液胞／リソソームから細胞質に排出されて新たな栄養源として再利用され、飢餓時の細胞の生存を支える。近年では、オートファジーは栄養飢餓応答に限らず、細胞内タンパク質の品質管理、病原体排除、抗原提示、発生といった多様な生命現象にも関わり、神経変性疾患やがんといった疾患との関連にも注目が置かれている。</p> <p>これまで、オートファゴソーム形成に必要な因子として、約20のオートファジー関連 (autophagy-related, Atg) タンパク質が同定されてきた。Atgタンパク質は、いくつかの機能ユニットに分類される。オートファジーの誘導に伴い、これらのAtgタンパク質が機能ユニットごとに階層性を持って集積することで、液胞近傍にpre-autophagosomal structure (PAS) と呼ばれる構造体を構築し、オートファゴソームの形成を媒介する。オートファジーの分子機構に関する研究が精力的に進められてきたが、オートファゴソーム形成における基本的な膜動態を含め、未だその全貌は明らかにされていない。ユビキチン様タンパク質であるAtg12は、ユビキチン様の反応系を経てAtg5のリジン残基に結合し、Atg5とAtg16との相互作用を介してAtg12-Atg5-Atg16複合体 (Atg16複合体) を形成する。PASに局在化したAtg16複合体は、同じくユビキチン様タンパク質であるAtg8の結合反応においてE3酵素として機能し、Atg8とホスファチジルエタノールアミン (PE) との結合を促進する。Atg8-PE結合体は、PASおよび隔離膜上で、隔離膜の伸張を駆動する他、特定のタンパク質やオルガネラをオートファゴソームに選択的に取り込む際のアダプターとしても機能する。すなわち、Atg8-PE形成の時空間的な制御を担うAtg16複合体は、オートファジーにおいて極めて重要な役割を果たしている。以前から、ホスファチジルイノシトール (PI) 3-キナーゼ複合体IによるPASにおけるPI 3-リン酸 (PI3P) の産生がAtg16複合体のPASへの局在化に重要であることが知られていた。また最近、PI3P結合タンパク質であるAtg21がAtg16と直接相互作用することで、PI3P に依存してAtg16複合体をPASに局在化させることが報告された。しかしながら、ATG21欠失株においてもAtg16複合体のPASへの局在およびオートファジーの活性は完全に消失しないことから、Atg16複合体をPASに局在化させる未知のメカニズムの存在が示唆されていた。本研究では、出芽酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>を用いて、Atg16複合体のPAS局在化機構を解明することを目的とした。</p> <p>オートファジーを誘導した酵母細胞よりAtg5を免疫沈降して質量分析を行い、Atg16複合体と相互作用する候補因子として、PASの足場を形成するAtg1複合体のサブユニットを複数同定した。共免疫沈降解析によってこの複合体間相互作用を確認し、この相互作用は、(i) オートファジーの誘導に依存して起こること、(ii) 両複合体の形成を必要とすること、(iii) 複数のAtg1複合体が集まって形成する高次会合体を必要とすることなどを明らかにした。また、この相互作用がAtg12のユビキチン様ドメインのN末端側領域を介して起こることを見いだした。さらに、このAtg1複合体-Atg12間相互作用は、PI3P-Atg21-Atg16間相互作用を介する経路と協働的にAtg16複合体のPASへの局在化を媒介することを明らかにした。これらの経路のいずれか一方を欠損させても、Atg16複合体のPAS局在およびオートファジー活性は部分的に低下するに留まるが、両経路を同時に破壊させると、Atg16複合体のPAS局在およびオートファジー活性は完全に失われた。また、Atg1複合体-Atg12間相互作用を介して局在化するAtg16複合体には、Atg8-PEの形成するE3酵素としての働きに加えて、Atg1複合体によるPASの足場形成を促進する新たな役割があることも発見した。以上のように、本研究は、Atg16複合体をPASに局在化させる新たなメカニズムとAtg16複合体の新たな機能を解明し、オートファゴソーム形成における核形成 (nucleation) のステップの分子機構の理解を大きく前進させた。</p>				

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	原田 久美
---	-------	-------------	-------

(要 旨)
(Summary)

Autophagy is a bulk degradation system highly conserved in eukaryotes, in which double membrane vesicles called autophagosomes sequester various cellular components and deliver them to lysosomes or vacuoles. In yeast, more than 40 autophagy-related (*ATG/Atg*) genes/proteins have been identified, among which 19 Atg proteins are required for autophagosome formation under nutrient starvation conditions. These “core” Atg proteins compose six functional groups and localize to the pre-autophagosomal structure (PAS) in a hierarchical manner in response to starvation.

Atg8 conjugation to phosphatidylethanolamine (PE) is necessary for autophagosome formation. The Atg12-Atg5-Atg16 complex (the Atg16 complex) promotes Atg8-PE conjugation at the PAS. Recently, it was reported that Atg21 binds both Atg16 and phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) produced at the PAS to target the Atg16 complex to the PAS. However, the localization of the Atg16 complex to the PAS and autophagic activity are not completely abolished even in the absence of Atg21, suggesting the existence of an unknown mechanism for localizing the Atg16 complex to the PAS. In this study, I aimed to elucidate the PAS localization mechanism of Atg16 complex in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

To this aim, mass spectrometry of Atg5 immunoprecipitates was performed to identify proteins interacting with the Atg16 complex. Proteins detected by mass spectrometry contained multiple subunits of the Atg1 kinase complex that serves as a scaffold for PAS formation. Co-immunoprecipitation analysis confirmed the interaction between the Atg16 complex with the Atg1 complex. I showed that this intercomplex interaction (i) depends on induction of autophagy, (ii) requires the formation of both of the complexes, and (iii) requires the supramolecular assembly of Atg1 complexes. I also found that this interaction occurs via the N-terminal region of Atg12. Using an Atg12 mutant lacking this region, I revealed that the interaction of the Atg16 complex with the Atg1 complex mediates the PAS localization of the Atg16 complex along with the previously-described mechanism dependent on the Atg16-Atg21 interaction. When both of these mechanisms were disrupted, the PAS localization of the Atg16 complex was completely lost, and these cells showed no autophagic activity. In addition, I found that the Atg16 complex targeted to the PAS via the Atg12-dependent mechanism not only promotes Atg8-PE formation but also facilitates PAS scaffold assembly by the Atg1 complex. Thus, this study elucidated the new mechanism of the PAS localization of the Atg16 complex, and progressed our understanding of the molecular mechanism of the nucleation step in autophagosome 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.