

氏名	あ の よし たか 阿 野 嘉 孝
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1465 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Regulation of membrane dynamics during selective degradation of peroxisomes by PpAtg1-PpAtg24 complex in <i>Pichia pastoris</i> ( <i>Pichia pastoris</i> PpAtg1-PpAtg24 複合体によるペルオキシソーム選択的分解の制御)
論文調査委員	(主査) 教授 加藤 暢夫 教授 清水 昌 教授 植田 和光

### 論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞は外界の環境変化を迅速に感知し細胞内構造を再編成して適応している。この適応プロセスには、タンパク質分解機構としてのオートファジーが重要な役割を果たしており、タンパク質は液胞あるいはリソソームに輸送された後に分解され細胞内構造の再編成に利用される。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* は、オートファジーによるペルオキシソームの選択的分解（ペキソファジー）を顕著に誘導するため、オルガネラの選択的分解研究のモデル細胞といえる。

*P. pastoris* は、メタノールを炭素源として培養すると細胞内にペルオキシソームを大きく発達させるが、それをメタノール以外の炭素源を含む培地に移すと、その炭素源に応じてマイクロペキソファジーとマクロペキソファジーという膜動態の異なる二つの様式の分解機構を誘導する。本研究はこの二つのペキソファジー様式の転換が細胞内エネルギーレベルに依存して起こること、およびその膜動態制御の分子機構を明らかにしたものである。得られた結果は以下の3点に要約できる。

1) 従来ペキソファジーは、メタノールからグルコースへの移行によりマイクロペキソファジーが、エタノールへの移行によりマクロペキソファジーがそれぞれ誘導するとされていたが、メタノール培養した *P. pastoris* を様々な条件でペキソファジーを誘導し、蛍光顕微鏡を用いた形態統計学的解析によってペキソファジー様式を調べた結果、グルコースやエタノールといった分子種がペキソファジー様式を決定する直接的な要因ではないことを見出した。すなわち、ペキソファジーはATP依存的なタンパク質分解であり、それぞれのペキソファジー誘導基質によって生じる細胞内ATPレベルがペキソファジー様式の決定と強く関連することを明らかにした。

2) ペキソファジー様式の決定に関わると考えられる PpAtg1 複合体に着目し、その遺伝子欠失破壊によるペキソファジーへの影響を蛍光顕微鏡観察により調べた。その結果、PpAtg1 複合体の中心である PpAtg1 のキナーゼ活性が、ペキソファジー過程で出現する特徴的な膜構造体の形成に必須であることを明らかにした。また、PpAtg1-キナーゼ活性の調節因子である PpAtg13 や PpAtg17 に相当する遺伝子の破壊株ではマイクロペキソファジー誘導条件下でもマクロペキソファジーを誘導したことから、両タンパク質による PpAtg1-キナーゼ活性の調節がペキソファジー様式、すなわち各ペキソファジー過程での特徴的な膜構造体形成に必須の関わりがあることを明らかにした。

3) 新たに見出したタンパク質 PpAtg24 のペキソファジーにおける分子機能を蛍光顕微鏡観察、遺伝学生化学的解析により検討し、*PpATG24* 遺伝子欠失破壊 (*Ppatg24Δ*) は両ペキソファジー過程に障害を引き起こすとともにメタノール培養時においても異常な液胞形態を誘引することを見出し、PpAtg24 はペキソファジーが誘導される以前から機能しているタンパク質分子であることを明らかにした。ペキソファジーに特徴的な膜構造体のマーカーとして蛍光タンパク質を付加した YFP-PpAtg8 を *Ppatg24Δ* 株に導入したところ、*Ppatg24Δ* 株は両ペキソファジー過程において正常に膜構造体を形成できるが、その膜構造体は液胞膜上に蓄積したままでペキソファジーを完結できないことから、PpAtg24 は膜構造体が液胞と融合する際に機能するタンパク質であると結論づけた。同様に PpAtg24-CFP を導入した場合には、PpAtg24 が液胞とペキソファゴソームが接触する部位に、また、マイクロペキソファジー過程では液胞が隔壁を形成しながら変形するその基

点部位に点状にそれぞれ局在した。さらに、PpAtg24 タンパク質分子内のPX (Phox homology) ドメインの脂質結合性と細胞内局在との関連を生化学的手法と蛍光観察によって調べた結果、PX ドメインは比較的広い基質特異性を持つもののPI3P (Phosphatidylinositol-3-phosphate) に対し特に強い結合活性を有することを認めた。このことは、PpAtg24 がそのPX ドメインで細胞内のPI3Pを認識して点状に局在することを示している。すなわち、PpAtg24 は、ペキシファジー過程で液胞膜が膜構造体と接触する際に形成されるマイクロドメイン Vertex にPI3Pを認識部位として局在し、融合反応を制御している分子である。以上のことからPpAtg1-PpAtg24 複合体はペルオキシソーム分解過程でペキシファジー様式の決定から液胞膜の融合や変形までを制御する中心的な分子装置であると結論した。

## 論文審査の結果の要旨

タンパク質やオルガネラなど細胞内構成成分の生合成については既に多くの知見が蓄積されているが、その分解に関わる分子メカニズムの詳細は未だ不明な部分が多い。近年、タンパク質の分解に代謝エネルギーが必要であるとの発見を契機に、細胞内タンパク質分解機構の研究は生命活動を理解するための中心的課題となってきた。本論文は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* におけるペルオキシソームの選択的分解過程であるペキシファジーにおいて、細胞のエネルギーレベルがその様式を決定する重要な因子であること、および、その細胞内エネルギーレベルに応答したペキシファジー制御機構を分子レベルで明らかにしたものであり、評価すべき点は以下の3点である。

- 1) ペルオキシソーム分解過程には膜動態が異なるマイクロペキシファジーとマクロペキシファジーとがあり、それぞれ炭素源がメタノールからグルコースあるいはエタノールに変換されることによって引き起こされるとされていた。本研究では、詳細な誘導条件の検討によってグルコースやメタノールがペキシファジー様式を変化させる直接的な要因でなく、その分解によって生じる細胞内のATPレベルがその様式を決定する因子であるとする新知見を提唱している。
- 2) PpAtg1 タンパク質複合体が二つのペキシファジー様式の転換に関わると想定し、遺伝子破壊実験を行い、PpAtg1-キナーゼ活性が両ペキシファジー過程の新生膜合成に必須であることを見出した。また、PpAtg1-キナーゼ活性の調節因子であるPpAtg13とPpAtg17の欠損株がマイクロペキシファジー誘導条件下でもマクロペキシファジーを誘導する事実から、PpAtg1 複合体によるPpAtg1-キナーゼ活性の調節がペキシファジー様式の決定因子であるとしている。
- 3) 本研究で見出したPpAtg24がマイクロならびにマクロペキシファジーの両過程に必須であり、ペキシファジーが誘導される前から液胞膜形態の制御に関与する事実を遺伝子破壊実験の結果から導き出した。PpAtg24はペキシファジー過程で出現する新生膜合成には関与せず、この点で他のPpAtg分子群とは異なる機能をもつとしている。また、PpAtg24は、マクロペキシファジーではペキシファゴソームと液胞が接触している液胞膜上の部位に、マイクロペキシファジーでは液胞が隔壁を形成しながら変形する基点部位にそれぞれ点状の構造で局在することを認めた。さらに、PpAtg24分子内に見出したPXドメインはPI3Pとの結合性を有し、ペキシファジー過程において細胞内PI3Pを認識して点状に局在することを見出した。これらのことは、PpAtg24はペキシファジー過程で起こる異種コンパートメント間の融合反応の分子機構を明らかにした新知見である。

以上のように本論文は、メタノール資化性酵母 *P. pastoris* の2つのペキシファジー様式が細胞内のエネルギーレベルによって選別されることを示すとともに、その過程における液胞膜動態の変化に関与するタンパク質の機能を明らかにし、真核生物のオートファジーの分子機構研究に新しい局面を提供したものであり、制御発酵学、応用微生物学、細胞生理学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年1月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。