

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	中辻 拓実
論文題目	Molecular mechanisms of vacuolar dynamics and lipid metabolism in yeast autophagy (酵母オートファジーにおける液胞動態と脂質代謝の分子機構)		
(論文内容の要旨)			
オートファジーは、多様なタンパク質やオルガネラを液胞やリソソームに運び込み分解する真核生物に保存された細胞内分解機構である。オートファジーは恒常的に作動するほか、栄養源の枯渇への応答、ミスフォールドタンパク質や損傷オルガネラの除去にも関与することから、細胞内恒常性の維持に重要な役割を果たしており、その機能異常は疾患の発症とも密接に関連することが明らかにされている。分解経路における膜動態の違いにより、ミクロオートファジーとマクロオートファジーに分類され、また分解基質の選択性の有無により選択的オートファジーと非選択的オートファジーに大別される。 脂肪滴はステロールエステルなどの中性脂質を貯蔵するオルガネラである。細胞内の脂質量の厳密な調節は、生体膜の機能やエネルギー代謝に深く関わるため、脂肪滴を選択的に分解する経路であるミクロリポファジーの役割や分子メカニズムの詳細な解析は脂質恒常性を理解するうえで重要である。しかし、その分子機構については不明な点が多かった。そこで本論文では、出芽酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>ミクロリポファジー誘導時の脂肪滴分解機構を明らかにすることを目的とした。 一方、オートファジーと細胞内脂質動態の関係は、単に脂肪滴が分解基質となるだけではない。膜の新生や形態変化が起こる過程では、脂質の供給や組成変化が不可欠である。そこで本論文では、マクロオートファジーにおいて新生される膜構造であるオートファゴソーム形成に必須の因子であるホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ複合体構成因子であるAtg14に着目した。これまで未同定であったメタノール資化性酵母<i>Komagataella phaffii</i> (<i>Syn. Pichia pastoris</i>) のAtg14を同定し、オートファジーにおける機能を解析した。 第一章では、<i>S. cerevisiae</i>の脂肪滴局在ステロールエステル加水分解酵素Tgl1の新たな局在と機能を明らかにした。ミクロリポファジーにより液胞に取り込まれた脂肪滴に含まれるステロールエステルの分解機構に着目し、Tgl1が定常期に液胞に取り込まれ、ステロールエステル加水分解酵素として機能することを蛍光顕微鏡観察と薄層クロマトグラフィーにより明らかにした。また、Tgl1の液胞内への輸送が、マクロオートファジーに依存せず、Endosomal sorting complex required for transport(ESCRT)-I, II, III複合体およびVps4を介したミクロオートファジー様の経路に依存することを見出した。さらに、ミクロオートファジーによる細胞質成分の取り込みに関与する液胞膜ミクロドメインの形成に、Tgl1によるステロールエステルの加水分解が寄与することを示した。 第二章では、<i>S. cerevisiae</i>のミクロリポファジー誘導時に選択的に脂肪滴が分解される機構に着目した。脂肪滴とESCRTとの相互作用を可視化するため、脂肪滴局在タンパク質Erg6とESCRT-I複合体構成因子であるVps23に、蛍光タンパク質EGFPのC末端領域とN末端領域をそれぞれ融合発現させ蛍光顕微鏡観察を行い、定常期に液胞膜上で脂肪滴とESCRTが相互作用することを見出した。また、ESCRT-0複合体構成因子であるVps27のユビキチン認識ドメインであるVHSドメインとUIMドメインに加え、ユ			

ビキチンE3リガーゼRsp5が脂肪滴とESCRTとの相互作用に寄与することを明らかにした。さらに、脂肪滴局在タンパク質Erg27がマイクロリポファジー誘導時にRsp5依存的にユビキチン化されることを見出すとともに、vacuolar-lipid droplet contact site (vCLIP) が脂肪滴とESCRTとの相互作用およびマイクロリポファジーに必要であることを明らかにした。

第三章では、Fluorescence-activated cell sorting (FACS) によるスクリーニングおよびPSI-BLAST解析により*K. phaffii*のAtg14を同定し、様々なオートファジーへの寄与を調べた。イムノブロット解析によりKpAtg14欠損株のオートファジー活性を測定したところ、KpAtg14が非選択的マクロオートファジー、マクロペキソファジーおよびマイクロペキソファジーに関与することを明らかにした。また、蛍光顕微鏡観察により、KpAtg14がオートファジー経路の下流因子であるKpAtg5の局在に影響を及ぼすことを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

真核生物に広く保存された細胞内分解機構であるオートファジーは、細胞内恒常性の維持において重要な役割を果たしており、その分子機構の解明が進められてきた。しかしながら、出芽酵母*S. cerevisiae*において脂肪滴を分解するミクロリポファジー経路の分子機構や、メタノール資化性酵母*K. phaffii*におけるオートファゴソーム形成の分子機構については、不明な点が多く残されていた。本論文は、酵母のオートファジーにおける液胞動態と脂質代謝の分子機構を明らかにしたものである。*S. cerevisiae*のステロールエステル加水分解酵素Tgl1の新たな局在と機能を明らかにし、ミクロリポファジーにおける選択的脂肪滴認識機構へのユビキチン化とESCRT複合体の関与を示したものである。また、*K. phaffii*のオートファジー関連タンパク質Atg14を初めて同定しその機能を明らかにしたものである。評価すべき点として、以下の3点が挙げられる。

1. *S. cerevisiae*において、ステロールエステル加水分解酵素Tgl1が液胞内で酵素活性を有すること、Tgl1がESCRT-I, II, III複合体およびVps4に依存したミクロオートファジー様の経路で液胞内に輸送されることを明らかにした。また、Tgl1が液胞膜ミクロドメインの形成に寄与することを見出した。
2. *S. cerevisiae*において、ミクロリポファジー誘導時に脂肪滴とESCRTが液胞膜上で相互作用することを見出した。また、Vps27のユビキチン認識ドメインやユビキチンE3リガーゼRsp5、vCLIPが脂肪滴とESCRTとの相互作用に寄与することを明らかにした。
3. *K. phaffii*のAtg14を同定し、非選択的マクロオートファジーやマクロペキソファジー、ミクロペキソファジーに必要であることを見出した。また、オートファジー経路における下流因子の局在に影響することを明らかにした。

以上のように本論文は、出芽酵母*S. cerevisiae*における脂肪滴成分の分解機構およびミクロリポファジーにおける脂肪滴の認識機構を明らかにし、メタノール資化性酵母*K. phaffii*におけるAtg14を同定して多様なオートファジー経路への寄与を明らかにしたものであり、細胞内恒常性に重要な役割を持つオートファジーにおける液胞動態、脂質代謝への新たな知見を得られたことから、制御発酵学、分子細胞生物学、応用微生物学の発展に寄与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、令和8年1月21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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：令和8年6月23日以降（学位授与日から3ヶ月以内）