

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	田村 直輝
論文題目	Regulation of yeast vacuolar dynamics by autophagy-related proteins （オートファジー関連タンパク質群による酵母液胞の動態制御機構）		
（論文内容の要旨） オートファジーは、細胞質タンパク質やオルガネラを分解コンパートメントである液胞/リソソームに輸送し分解する過程であり、広く真核生物に保存されている。ペルオキシソームを選択的に分解するミクロペキソファジーは、他のオートファジー過程とは異なり、液胞が形態変化をしながらペルオキシソームを取り込む。本論文では、メタノール資化性酵母<i>Pichia pastoris</i>を用いて、この液胞膜動態の制御に必要な遺伝子を同定し、その作用機序について、遺伝生化学ならびに細胞生物学的なアプローチから分子レベルで解析を行った。その結果、酵母における液胞膜動態制御の分子機構を明らかにすることに成功した。その主な内容は以下の通りである。 1. 液胞形態が異常な<i>P. pastoris</i>変異体を、ジーンタギング法と蛍光顕微鏡観察により探索し、液胞膜動態を制御する遺伝子として<i>ATG4</i>、<i>ATG8</i>、<i>ATG18</i>を同定し、ミクロペキソファジーの液胞膜動態の制御にこれらの遺伝子産物が必要であることを明らかにした。また<i>ATG4</i>と<i>ATG8</i> の遺伝子破壊株では、ミクロペキソファジー誘導前よりその液胞形態が異常であること、<i>ATG18</i>破壊株では液胞が出芽できずペルオキシソームを取り囲めないことを見出した。 2. <i>Atg18</i> と同じPROPPINファミリーに属する<i>Atg21</i>は、液胞膜の動態制御に関与しないが、ペキソファジーには必須であることを示した。<i>Atg21</i>はphosphatidylinositol 3-monophosphate に対して、高い結合能を持つことを脂質結合実験により示した。 3. <i>Atg18</i>タンパク質を精製し、生化学的解析およびLC-MS法などによるリン酸化領域の特定と部位特異的変異体の解析により、<i>Atg18</i>がリン酸化されうることを全生物種で初めて明らかにした。さらに、<i>Atg18</i>のリン酸化部位が脂質結合ドメイン近傍にあり、ヒトなどの高等生物にも保存されていることを明らかにした。			

4. 脂質結合実験から、Atg18がphosphatidylinositol 3,5-bisphosphateに対して高い親和性のあること、Atg18のリン酸化が本脂質への結合を抑制していることを明らかにした。
5. 酵母細胞内においては、ミクロペキソファジーや高浸透圧ストレスなどの液胞が出芽する環境条件で、脱リン酸化型Atg18の量が増加し、それと連動して液胞膜上のAtg18局在量が増加すること、これとは逆に、低浸透圧ストレスなどの液胞が融合する環境条件ではリン酸化型Atg18の量が増加し、液胞膜上の局在量が減少することを見出した。
6. Atg8の脂質化に関わる分子の遺伝子破壊株および脂質化されないAtg8変異体の解析から、Atg8 が液胞融合を制御していることを示した。さらに、液胞融合とオートファジーはそれぞれ独立して起こることを示した。これらの発見はAtg8の脂質化を伴わない生理機能として初めてのものである。
7. Atg8 が持つ膜融合活性の変異体の解析ならびに局在解析から、Atg8 は液胞膜の接着領域に局在し、その融合触媒活性が液胞の融合に必要であることを明らかにした。
8. *ATG4*破壊株ならびに Atg8のC末端変異体を用いた解析から、Atg4によるAtg8のC末端ペプチドの切断除去が、液胞形態制御に必要であることを見出した。

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
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。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、Atg4、Atg8、Atg18が酵母の液胞動態を制御していることを初めて示し、遺伝生化学的ならびに細胞生物学的アプローチにより、液胞動態制御のメカニズムを分子レベルで解明したものである。評価すべき点は以下の点である。

1. 液胞膜動態制御に必要な因子として、Atg4、Atg8、Atg18を同定し、Atg18は液胞の出芽に、Atg8とAtg4 は液胞の融合に必要であることを示した。
2. Atg18 がリン酸化されることを初めて見いだした。Atg18のリン酸化が、脂質シグナル分子であるphosphatidylinositol 3,5-bisphosphate への結合能を抑制していることを見出し、イノシトールリン脂質とタンパク質間相互作用に関する制御モデルを提唱した。
3. Atg18のリン酸化レベルが環境により変化し、それによって制御されるAtg18の細胞内局在が、液胞形態を支配していることを示した。
4. Atg8、ならびにAtg8のC末端ペプチドを切断するAtg4が、液胞融合を制御していること、Atg8による液胞形態制御は、オートファジーと独立していることを示した。

以上のように、本論文は、液胞の形態制御に必要な3種のAtg分子を新たに同定し、これらのAtg分子が液胞の出芽もしくは融合を制御することにより、栄養源・浸透圧などの環境変化に応答していることと、その液胞形態制御の分子基盤を初めて示したものである。これらの成果は、微生物の環境適応とオルガネラの動態制御に新しい知見を提供するにとどまらず、オートファジーに限定されていたAtg分子の生理機能の理解を拡張したもので、制御発酵学、分子細胞生物学、生化学の分野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、平成25年2月12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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成26年 3 月 20 日以降