

氏 名	やま した しゅん いち 山 下 俊 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1649 号
学位授与の日付	平 成 19 年 5 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	Molecular and cellular biological studies on autophagic protein degradation regulated by a novel phosphoinositide signaling pathway in the methylotrophic yeast <i>Pichia pastoris</i> (メタノール資化性酵母 <i>Pichia pastoris</i> に見いだした新規なイノシトールリン脂質シグナル経路により制御される細胞内タンパク質分解系の分子細胞生物学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 阪 井 康 能 教 授 植 田 和 光 教 授 矢 崎 一 史

論 文 内 容 の 要 旨

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* は、異種遺伝子発現の宿主として広く利用され、ワクチンや有用酵素の生産が工業化されている。異種遺伝子の高発現には、通常、メタノール誘導性プロモーターが用いられ、メタノールを単一炭素源とした培地でタンパク質生産を行うが、このとき、*P. pastoris* はオルガネラの一つであるペルオキシソームを発達させる。ペルオキシソームは、オートファジーと呼ばれる細胞内分解経路により分解を受けるが、その分解が選択的であることから、特にベキソファジーと呼ばれている。液胞が陥没変形してペルオキシソームを直接包み込むミクロベキソファジーの過程では、ペルオキシソーム表層にカップ状の新生膜構造体 (MIPA: micropexophagy-specific membrane apparatus) が合成される。本論文では、ミクロベキソファジーにともなう細胞内膜動態とそのイノシトールリン脂質による制御機構を中心に、本酵母における細胞内分解系について分子細胞生物学的・生化学的に解析し、メタノールを炭素源とした時に誘導される新規のオートファジー経路を発見した。その主な内容は以下の通りである。

- 1) MIPA に局在する PpAtg8 に蛍光タンパク質 YFP を付加した YFP-PpAtg8 を用いて、MIPA の新生過程を蛍光顕微鏡下で可視化することに成功し、ステロールグルコシド合成酵素 PpAtg26 が MIPA 新生に必須であることを示した。
- 2) PpAtg26 の 2 つの PI4P 結合ドメイン、触媒部位である UDP-グルコース結合ドメインの各ドメインを欠失した PpAtg26 変異体を作成して解析を行うことにより、MIPA 新生が、前駆体形成と膜伸長の 2 段階で起きていること、ステロールグルコシド合成は膜伸長に必要であることを分子遺伝学的、生化学的、形態学的に示した。
- 3) *P. pastoris* が持っている 3 つの PI4 キナーゼ構造遺伝子、*PpPIK1*、*PpSTT4*、*PpLSB6* をクローン化し、それぞれ変異株を単離して、MIPA 新生を解析した結果、ゴルジ体に局在する PpPik1 が MIPA 新生に必須であることを明らかにした。
- 4) *Pppik1* 変異株で YFP-PpAtg8 と CFP-PpAtg26 を共発現し、その局在を観察した結果、CFP-PpAtg26 は MIPA 前駆体に局在せず細胞質に拡散した。この結果から、PpAtg26 の MIPA 前駆体局在に PpPik1 の生成する PI4P が必要であることを明らかにした。
- 5) メタノール誘導時、*PpATG26* 破壊株において、YFP-PpAtg8 が細胞質に複数の点状蛍光像を示したことから、PpAtg26 を必要とするオートファジーが、誘導されていることが示唆された。PpAtg8 はホスファチジルエタノールアミン (PE) と結合することでオートファゴソーム膜に局在することが知られている。そこで、メタノール誘導時の、YFP-PpAtg8 の局在と PE 結合型 PpAtg8 (PpAtg8-PE) について解析を行った。その結果、メタノール誘導時間とともに PpAtg8-PE 量が増加し、YFP-PpAtg8 が液胞に輸送された。以上の観察結果から、タンパク質・オルガネラ合成の活発なメタノール誘導時にも、細胞内タンパク質分解系であるオートファジーが誘導されていることを明らかにし、メタノール誘

導性オートファジーと名付けた。

6) 非選択的に液胞に輸送される細胞質レポータータンパク質 Pho8 Δ 60, 選択的に液胞に輸送されるアミノペプチダーゼ I に CFP を付加した CFP-Ape1 を, 野生株の他, *PpATG26* 破壊株, 選択的オートファジー経路が欠損している *Ppatg11* 変異株, 非選択的オートファジー経路が欠損している *Ppatg17* 変異株などへ導入し, メタノール誘導性オートファジーの被分解基質の特異性について特徴付けを行った。その結果, メタノール誘導条件下では, 窒素飢餓条件で見られるような非選択的なオートファジーは誘導されていないことがわかった。

7) PpApe1 の選択的合成経路である cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) 経路について検討した結果, 従来, 構成的と考えられてきた Cvt 経路が, メタノール誘導時には大きく誘導されていることがわかった。またメタノール誘導時には Cvt 経路が誘導されるのに加えて, PpAtg26 を必要とする新規の選択的オートファジー経路が, その後で誘導されてくることを示した。

8) PpAtg26 が有する 2 つの PI4P 結合ドメイン (GRAM-PH ドメインと GRAM ドメイン) の, メタノール誘導性オートファジーならびに MIPA 形成における役割について解析した。MIPA 形成時には GRAM-PH ドメインが重要な役割を果たしたが, メタノール誘導性オートファジーでは, GRAM ドメインが必須であることを明らかにした。これにより, ミクロペキソファジーとメタノール誘導性オートファジーで, PpAtg26 上の異なる PI4P 結合ドメインを介して PI4P シグナルが伝達されていることを示した。

9) ミクロペキソファジーにおける, 液胞によるペルオキシソームの包み込みを解析した結果, 液胞膜タンパク質 PpVac8 が必要であることを明らかにした。

10) PpVac8 のドメイン欠損変異株を用いて, 液胞分配とミクロペキソファジーにおける役割を比較した結果, PpVac8 の液胞分配に必須なアルマジロ反復配列が, ミクロペキソファジーには不要であったことから, PpVac8 のミクロペキソファジーにおける役割が, 液胞分配とは異なることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

異種遺伝子発現宿主として広く利用されているメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* はメタノールを単一炭素源として生育させるとオルガネラの一つであるペルオキシソームが発達する。オルガネラ分解過程の一つであるミクロペキソファジーの過程では, 液胞がペルオキシソームを取り込む過程でペルオキシソーム膜表層に新生膜構造体 (MIPA) が形成される。しかしその細胞内シグナル伝達経路やミクロペキソファジー過程における膜動態制御機構は不明であった。

本論文では, MIPA 新生に必須なホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) シグナル経路とそのエフェクタータンパク質である PpAtg26 について解析した。その解析過程で, タンパク質合成が盛んなメタノール誘導時に誘導される新規のオートファジー経路を発見し, その特徴について明らかにした。液胞によるペルオキシソームの包み込みに必須なタンパク質 PpVac8 を同定した。評価すべき点は以下の 7 点である。

1) PpAtg8 に蛍光タンパク質 YFP を融合した YFP-PpAtg8 をマーカーとして MIPA を可視化し, その新生過程を解析した。その結果, *PpATG26* 破壊株では MIPA が形成されないことを明らかにした。PpAtg26 は, ステロールグルコシドを合成する触媒部位の他, 2 つの PI4P 結合ドメイン (PH-GRAM 及び GRAM ドメイン) を持っている。各ドメインの欠失変異体を用いて解析した結果, MIPA の膜新生過程が前駆体形成と膜伸長という 2 つの段階に解剖でき, ステロールグルコシド合成は膜伸長段階に必要であることを明らかにした。

2) *P. pastoris* がもつ 3 種の PI4 キナーゼ, PpPik1, PpStt4, PpLsb6 のペキソファジーと MIPA 新生での役割について解析した。その結果, *Pppik1* 変異株ではペキソファジーならびに MIPA 形成が起こらず, PpAtg26 は MIPA 前駆体に局在しなかった。以上の結果から, MIPA 新生過程では, PpPik1 によって合成された PI4P が, PpAtg26 を MIPA 前駆体に回収してステロールグルコシド合成を行い, 膜伸長を引き起こすことを明らかにした。

3) MIPA やオートファゴソームなどの膜構造体の新生には, Atg8 がホスファチジルエタノールアミン (PE) と共有結合した Atg8-PE の形成が必要である。*P. pastoris* でメタノール誘導時間とともに, PpAtg8 発現量の増加, PpAtg8-PE の形成, YFP-PpAtg8 の与える細胞質点状蛍光像が液胞内へ移行していくことを認めた。以上から, メタノール誘導時にもオ

オートファジー経路が誘導されていることを示し、メタノール誘導性オートファジーと命名した。

4) 出芽酵母の液胞アルカリフォスファターゼ ScPho8 の N-末端欠失変異体 ScPho8 Δ 60 を非選択的オートファジーのレポーター分子として用い、メタノール誘導性オートファジーの選択性について解析した結果、メタノール誘導性オートファジーは、PpAtg26 を必要とする選択的オートファジー経路であることがわかった。

5) PpApe1 などを液胞へ選択的に輸送している Cvt 経路がメタノール誘導時に大きく誘導されていることを明らかにした。

6) メタノール誘導性オートファジーについて、PpAtg26 ドメイン欠損変異株を用いて解析した結果、ミクロペキシソファジー時とは異なる PI4P 結合領域を必要とすることを明らかにした。

7) ミクロペキシソファジー時に起こる液胞のペルオキシソームの包み込みに液胞膜タンパク質 PpVac8 が必要だが、液胞分配とは異なる機構で起こることを明らかにした。

以上のように、本論文は異種有用タンパク質生産に利用されているメタノール資化性酵母 *P. pastoris* で、細胞内タンパク質分解に必要な膜構造体の新生とオルガネラ膜の動態を、遺伝的生化学的に解剖して、それを制御する新規のイノシトールリン脂質シグナル経路の分子機構を明かし、細胞内膜動態、タンパク質分解およびその制御機構の解明に重要な知見を提供していることから、分子細胞生物学、生化学、応用微生物学などの分野に大きく寄与するものである。

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19年3月12日、論文なら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。