

氏 名	むかい やま ひろ ゆき 向 山 博 幸
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1355 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	Isolation of novel PAZ genes essential for pexophagy in the methy- lotrophic yeast <i>Pichia pastoris</i> , and functional analysis of Paz2 mod- ification pathway (メタノール資化性酵母 <i>Pichia pastoris</i> におけるベキソファジーに必須な新 規 PAZ 遺伝子群の同定, 及び Paz2 タンパク質修飾機構の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 喜 多 恵 子

論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞は、飢餓・ストレス・栄養源などの変化に応答して、細胞内構造を再構築する。この過程には、オルガネラ分解機構としてのオートファジー（自食作用）が大きな役割を果たしており、オルガネラは液胞に輸送された後に分解され、新しい環境に適応すべく再利用される。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* は、メタノールを含む培地で培養するとオルガネラのひとつであるペルオキシソームが顕著に発達する。この細胞をグルコースを含む培地へ移すと、メタノール代謝にのみ必要なペルオキシソームは、ミクロベキソファジーと呼ばれるダイナミックな膜動態を含む過程を経て液胞に取り込まれて分解を受ける。

本研究では *P. pastoris* を用いて、ミクロベキソファジーの過程に必須な PAZ 遺伝子群を網羅的に同定するとともに、ミクロベキソファジーにおける Paz タンパク質の役割を蛍光顕微鏡観察および遺伝生化学的な検討によって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) *P. pastoris* から変異株を得るためのジーンタギング法を新たに開発し、ミクロベキソファジーの過程が不完全な多数の *paz* 変異株を取得した。得られた変異株よりミクロベキソファジーに必須な14の PAZ 遺伝子群を同定し、これらの遺伝子産物の機能を解析して、ミクロベキソファジーの進行には液胞輸送タンパク質やアミノ酸飢餓応答因子などさまざまな要因が関与していることを明らかにした。また、これらの遺伝子には、もう一方のベキソファジー過程であるマクロベキソファジーに必須な APG 遺伝子と相同なものを数多く含んでいることを示し、ミクロベキソファジーとマクロオートファジーはその膜動態が異なる過程であるにもかかわらず、共通の分子装置が関わることを明らかにした。

2) これの遺伝子の中から PAZ2 および PAZ3 遺伝子に注目し、その生化学的機能を調べた。PAZ2 遺伝子は約 15kDa のタンパク質をコードしており、メタノール生育時に誘導発現した。PAZ2 遺伝子破壊株の生育特性とベキソファジー過程の形態観察から、Paz2 はメタノール資化に必須であり、ミクロベキソファジーや液胞の形態維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。

蛍光タンパク質と Paz2 の融合タンパク質 (GFP-Paz2) を構築し、本タンパク質の細胞内局在変化を蛍光顕微鏡下で可視化してミクロベキソファジー進行中における本タンパク質の局在化を詳細に観察した。その結果、ペルオキシソームを包み込むために伸張した液胞膜の近傍に GFP-Paz2 が局在することを見出した。さらに、Paz3 についても同様に黄色蛍光タンパク質との融合タンパク質 (CFP-Paz3) を構築し、GFP-Paz2 と CFP-Paz3 が共局在することを認めた。電子顕微鏡によるより詳細な観察により、ミクロベキソファジー誘導時にペルオキシソームを覆う新規な膜構造体 MIPA (micropexophagic apparatus) が形成されることを見出し、Paz2 と Paz3 が MIPA 上に共局在することを明らかにした。さらにこの MIPA 形成がミクロベキソファジーに必須な過程であり、Paz2 や Paz3 などのようにマクロオートファジーと共通な分子装置が、MIPA 形成に関与していることを示した。

3) Paz2が他のPazタンパク質によって修飾される過程を明らかにした。まずPaz2は、Paz8により116残基以降がプロセッシングを受け、その結果C末端に露出したグリシン残基 Gly116が、Paz12が関与するユビキチン修飾様経路によって脂質様修飾を受ける。次いで、PAZ8およびPAZ12遺伝子破壊株を用いた検討により、Paz2修飾系がPaz2の膜への結合性を規定し、細胞内での局在を決定する要因であることを明らかにした。

一方、非修飾型Paz2自体は、ミクロペキソファジーを促進する機能と拮抗することでペルオキシソームの液胞膜による包み込みを抑制する効果があることを認めた。すなわち、Paz2は、修飾を受けた場合にはペルオキシソームの分解に必須な役割をもち、非修飾型Paz2はメタノール生育時のペルオキシソームの構造維持に関与するという機能の二面性を有している。

論文審査の結果の要旨

真核生物は様々な環境変化に対応するために細胞内構造を再構築する必要があるが、その過程のひとつであるオートファジーはオルガネラや細胞質タンパク質の分解と再利用に関与している。従来、ペルオキシソームの生成および増殖に関しては形態学的あるいは遺伝学的な研究が進められていたが、ペルオキシソームの特異的な分解機構についての分子レベルでの解明は進展していなかった。本論文では、炭素源に応じてペルオキシソームが大きく増減するメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて、ペルオキシソームを選択的に分解する機構のひとつであるミクロペキソファジーについて、関与するタンパク質の機能の詳細を明らかにしたもので、評価すべき点は以下の3点である。

1) 新たに開発したジーンタギング法を *P. pastoris* に適用し、ミクロペキソファジーの進行が不完全な *paz* 変異株を多数取得し、その中から14種のPAZ遺伝子を同定した。これらの中には、もう一方のペキソファジー過程であるマクロペキソファジーに必須な遺伝子を含んでおり、その膜動態が異なる両ペキソファジーの過程には共通の分子装置が関与することを明らかにした。

2) PAZ2遺伝子破壊株を用いた実験より、Paz2がミクロペキソファジーの進行にも重要な役割を果たす一方、メタノール培地での生育および液胞の形態維持に必須であることを明らかにした。さらに、Paz2およびPaz3とGFPおよびCFPとの融合タンパク質(GFP-Paz2, CFP-Paz3)をそれぞれ構築してこれらを可視化することによって、ミクロペキソファジー誘導時における両Pazタンパク質の細胞内挙動をリアルタイムで観察することに初めて成功した。さらに、詳細な電子顕微鏡観察の結果から、ミクロペキソファジー誘導時に新規な膜構造体が形成されることを発見し、Paz2とPaz3がともにMIPA上に局在することを認めた。このようにMIPAの形成がミクロペキソファジーの完遂に必須な過程であり、マクロペキソファジーとの共通の分子装置がMIPA形成に関与していることはペキソファジーの過程における新知見である。

3) Paz2を精製してその生化学的性質を調べることにより、これがユビキチン様の脂質様修飾を受けることによって膜への結合性を規定し、細胞内局在を決定する要因となることを見出し、MIPAの正常な形成とミクロペキソファジーの進行には、Paz2の修飾と非修飾型への変換反応とのサイクルが必須であることを明らかにした。一方、非修飾型Paz2自体には、液胞形態を維持する機能があり、これが修飾型Paz2のミクロペキソファジー促進機能と拮抗することで、ペルオキシソームの包み込みを制御し、分解とは逆にペルオキシソームの構造維持にも関与するというPaz2機能の二面性を見出した。

以上のように本論文は、メタノール資化性酵母を用いて、ミクロペキソファジーの機構を分子レベルで明らかにするとともに、新規膜構造体の存在を見出した。これらの知見は、メタノール資化性酵母のペルオキシソームに有用タンパク質を蓄積せしめる新しいバイオテクノロジー技術の開発のための基盤となるものであり、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多い。

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15年2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。