

氏 名 鈴木 邦 律

学位 (専攻分野) 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第609号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Molecular dynamics in the process of autophagosome
formation in yeast

論文審査委員 主 査 教授 上野 直人
教授 大隅 良典
教授 小林 悟
助教授 村田 昌之 (岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター)

論文内容の要旨

Macroautophagy is a bulk degradation process induced by starvation in eukaryotic cells. In yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, at least 15 Apg proteins are essential for the formation of autophagosomes. Recently, several key reactions mediated by Apg proteins have been described: two ubiquitin-like conjugation systems, a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) system and a protein kinase system. Two ubiquitin-like systems consist of Apg12 system and Aut7/Apg8 system. Apg12p, Apg7p, Apg10p, Apg5p and Apg16p are involved in Apg12 system. This system finally produces a stable complex, namely the Apg12p-Apg5p-Apg16p complex. In Aut7 system, phosphatidylethanolamine-conjugated Aut7p (Aut7p-PE), which is required for the progression of autophagy, is generated by the sequential reactions of Aut2p/Apg4p, Apg7p and Aut1p/Apg3p to Aut7p. Vps30p/Apg6p and Apg14p form a specific PI3-kinase complex essential for autophagy. The protein kinase complex is composed of Apg1p, Apg13p and Apg17p. The kinase activity of Apg1p is enhanced by induction of autophagy. Despite of such detailed molecular analyses, the overall network between these reactions still remains to be elucidated.

Electron microscopic study showed that Aut7p is localized on the membranes of autophagosomes in the course of formation, and finally in the lumen of autophagosomes. Green fluorescent protein (GFP)-fused Aut7p was constructed and its dynamics was examined by fluorescence microscopy. GFP-Aut7p labeled autophagosomes, autophagic bodies and a novel structure which he designated as the pre-autophagosomal structure. Further analyses demonstrated that this pre-autophagosomal structure, containing at least five Apg proteins, i. e. Apg1p, Apg2p, Apg5p, Aut7p and Apg16p, is localized in the vicinity of the vacuole and directly involved in autophagosome formation. Analysis of *apg* mutants revealed that the formation of both Aut7p-PE and the Apg12p-Apg5p conjugate is essential for the localization of Aut7p to the pre-autophagosomal structure. Vps30p and Apg14p, components of an autophagy-specific PI3-kinase complex, Apg9p and Apg16p are all required for the localization of Apg5p and Aut7p to the structure. The Apg1p protein kinase complex functions in the late stage of autophagosome formation on the pre-autophagosomal structure. The pre-autophagosomal structure, which is organized by concerted interactions of two conjugation systems and the PI3-kinase system, plays a pivotal role in autophagosome formation.

Aminopeptidase I (API) is a vacuolar hydrolase, which is selectively delivered via autophagosomes under starvation conditions and becomes mature form after processing by vacuolar proteases. Electron microscopic study demonstrated that the proform of API forms the cytosol-to-vacuole targeting (Cvt) complex, which is enwrapped by autophagosome and delivered to the vacuole. He constructed a strain expressing API-GFP and investigated the dynamics of cargo delivery by autophagosome. Fluorescence microscopy showed that API-GFP is concentrated on a dot close to the vacuole. This dot, which corresponds to the Cvt complex, mostly appears very close to the pre-autophagosomal structure. Interestingly, formation of the Cvt complex is not impaired in the absence of any Apg protein examined or Cvt19p, a receptor for the Cvt pathway. The time-lapse observation using *apg1^{ts}* cells clarified that the Cvt complex stays outside the

vacuole at the non-permissive temperature and is transported to the vacuole after shifting to the permissive temperature. The whole Cvt complex is delivered to the vacuole by one step, indicating the complex is engulfed into one autophagosome. The complex, which entered the vacuole, is immediately disintegrated and diffused throughout the vacuole in one minute. API-GFP enables me to analyze the localization of Cvt complexes and the dynamics of cargo delivery mediated by autophagosome.

In this study, He discovered and described the pre-autophagosomal structure involved in generating autophagosomes. Several Apg proteins are converged upon the structure as a consequence of interaction of Apg proteins. Moreover, he successfully visualized the process of a cargo transport to the vacuole with API-GFP. API forms a Cvt complex on the pre-autophagosomal structure. This complex is enclosed into autophagosome and finally delivered to the vacuole. Here, he described the overall image of autophagosome formation and cargo delivery during autophagy by GFP-Aut7p and API-GFP as markers of autophagosome and the pre-autophagosomal structure, and a cargo, respectively.

論文の審査結果の要旨

従来の解析から酵母の自食作用に必須な APG 遺伝子が 15 個得られており、いずれもオートファゴソーム形成過程に関与している明らかとなっている。それらはユビキチン様の修飾システムを介するタンパク質結合反応、脂質結合反応、タンパク質キナーゼ複合体、PI3 キナーゼを構成している。しかしながらそれらの相互の関係は明らかでなかった。Apg8 はオートファゴソームの形成中間体に局在していることから膜形成過程の良い指となる。ホスファチジルエタノールアミン結合型 Apg8p (Apg8p-PE) と Apg12p-Apg5p 共有結合体はどちらも自食作用に必須である。申請者はそれらの生成物の細胞内動態を GFP-Apg8p と Apg5p-GFP の高感度顕微鏡観察を行うことにより、液胞近傍に1個ないし2個の Apg5p と Apg8p を含む新規の”前オートファゴソーム構造 (PAS)”を発見した。

Apg8p-PE の生成は、Apg12p-Apg5p 共有結合体の生成と密接に関係しており、Apg8p が PAS に局在するためには Apg8p の PE 化が必須であることが分かった。それに対し、Apg5p の局在は Apg12p との結合により、影響を受けない。Apg12p-Apg5p 共有結合体の局在は、APG16 の遺伝子破壊により障害を受けるため、Apg12p-Apg5p 共有結合体は Apg16p と結合することによって、初めて PAS に局在できる。Apg6p と Apg14p を含む、自食作用特異的なホスファチジルイノシトール3キナーゼ複合体が Apg5p と Apg8p の局在に必要であることを見出した。プロテインキナーゼである Apg1p もまた PAS に局在するが、Apg12p-Apg5p と Apg8 の PAS へのリクルートには影響がない。apgl 温度感受性変異株を作製しその解析から、PAS が AP の形成に直接関わっている構造であるという強い証拠が得られた。PAS は、Apg タンパク質の協調作用によって生じ、AP の形成中心としての役割を担っていると考えられる。この研究によって複雑な Apg 遺伝子群の相互関係に関する重要な知見を与えるものであり、オートファゴソーム形成の分子機構に迫る研究であり、学位論文に相応しい内容であると判断される。

論文の内容をめぐって、新規に見いだされた構造の本体、蛍光ラベルによる動態解析をめぐって質疑がなされ、申請者はこれらの質問に対して的確な返答をし、問題点も良く把握していることが確認された。また細胞生物学に関する広範な質問にも明確に回答がなされた。この結果審査委員全員一致して鈴木邦律が博士の学位授与に足る学識と能力をもつと判定した。

博士論文は十分なレベルの英語で作成され、既に原著論文が一流専門誌に掲載されていることから英語の能力も十分であると判断した。