

氏 名 一 村 義 信

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第607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 Protein lipidation by a ubiquitin-like system is  
essential for autophagy

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 諸橋 憲一郎  
教授 飯田 滋  
教授 大隅 良典  
助教授 吉久 徹（名古屋大学）

## 論文内容の要旨

Autophagy is a dynamic membrane phenomenon for bulk protein degradation in the lysosome/vacuole. When cells face starvation conditions, the cytoplasmic components are nonselectively enclosed by a double-membrane structure, autophagosome and delivered to the lysosome/vacuole to be degraded. Autophagy is ubiquitous in eukaryotes and is essential for survival during starvation and cell differentiation. However, the molecular basis of each process in autophagy is still poorly characterized. Taking advantage of yeast genetics, autophagy defective mutants (*apg*) have been isolated, and so far 15 *APG* genes have been cloned.

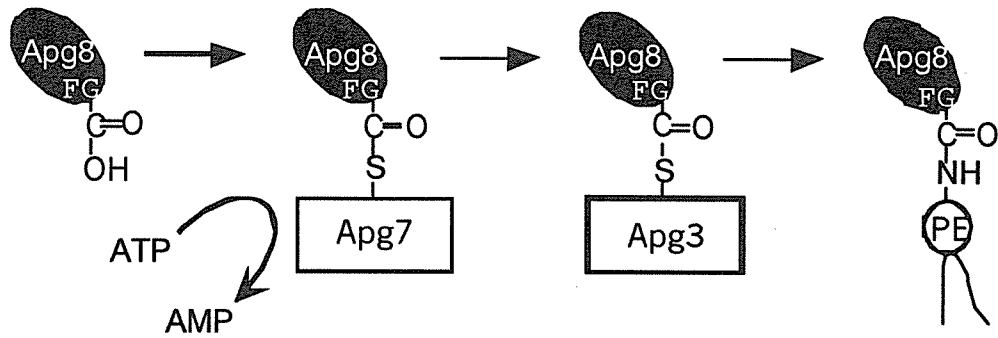
Apg8 is the first molecule found to localize to the intermediate structures of the autophagosome, and is necessary for autophagosome formation. Their recent studies revealed that the carboxy-terminal arginine of newly synthesized Apg8 is removed by Apg4 protease, leaving a glycine residue at the C terminus. This cleavage reaction is essential for production of tightly bound form of Apg8 to unidentified membrane. Interestingly, the membrane bound form of Apg8 is covalently conjugated to phosphatidylethanolamine (PE) through an amide bond between the C-terminal glycine and the amino group of phosphatidylethanolamine.

The biochemical analysis of the mechanism for Apg8-PE conjugation revealed that the Apg8-PE was formed by sequential enzyme reactions, similar to ubiquitination-like system. The C-terminal glycine of processed Apg8 (called as Apg8FG) was activated in ATP dependent manner by Apg7 (E1 enzyme), and linked to a cysteine residue of Apg7 via a high-energy thioester bond. Through a transthioester reaction, Apg8FG conjugated with a novel identified E2 enzyme, Apg3. Finally, Apg8FG covalently conjugated with the PE. Notably, Apg7 activates two different proteins, Apg12 and Apg8, and assigns them to specific E2 enzymes, Apg10 and Apg3, respectively.

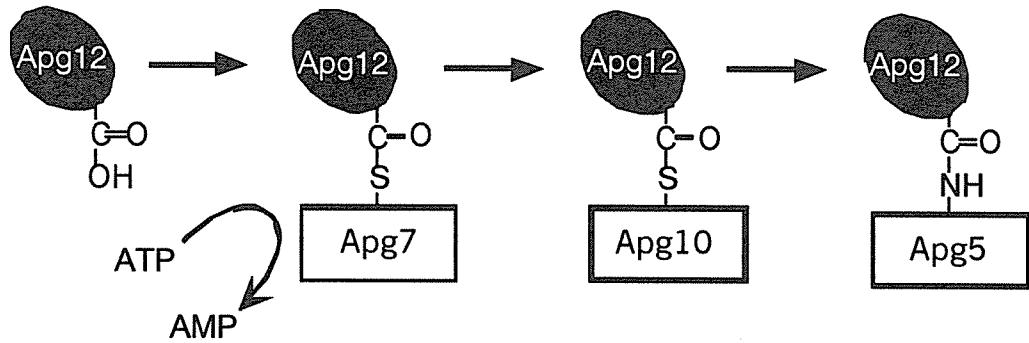
The reactions of Apg8-PE conjugation system were reconstituted *in vitro* by purified Apg7, Apg3, Apg8FG, and PE only, under the presence of ATP. These *in vitro* reconstitution studies demonstrated that the PE content of membrane affects the production of Apg8-PE. Apg8-PE conjugation of the *in vitro* reconstitution was enhanced by high amounts of Apg7 and Apg3. On the other hand, excessive Apg8FG inhibited their PE conjugation in a cell-free system. Apg8-PE conjugation directly occurs from Apg8-Apg3. However, some specific mechanisms seem to be required for the catalytic reactions in the system of Apg8-PE conjugation. The detailed mechanism of Apg8-PE conjugation step and its intracellular localization in yeast might be elucidated by the *in vitro* reconstitution study of Apg8-PE.

Ubiquitination and Ubiquitination-like systems generally mediate a covalent conjugation of modifier to its target protein. However, the target of Apg8 turned out to be a PE. This thesis is the first report that ubiquitination-like system mediates protein lipidation.

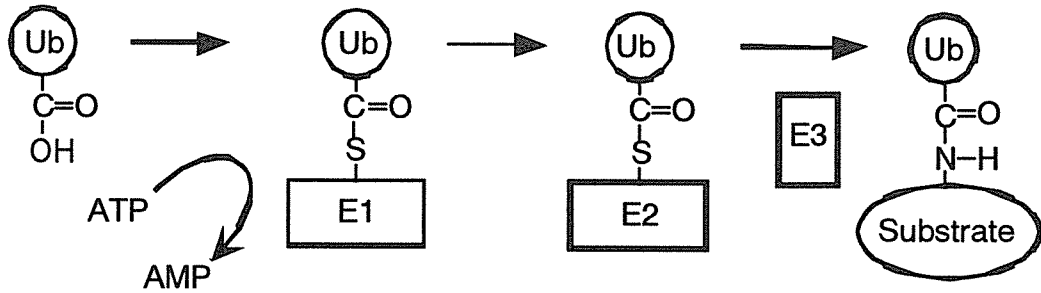
### Apg8-PE conjugation system



### Apg12-Apg5 conjugation system



### Ubiquitination system



## 論文の審査結果の要旨

オートファジーは栄養飢餓により引き起こされる液胞でのタンパク質分解経路である。この過程には大規模な膜動態が観察される。現在の知見では細胞質内での隔離膜の出現に始まり、そして、その膜伸長に伴う非選択的な細胞質構成成分の取り囲みの結果、二重膜からなるオートファゴソームが形成される。その後、オートファゴソームの外膜が液胞膜と融合することによって、その内容物が液胞へ送り込まれ分解される。従来オートファジーの過程は形態学的観察から提唱されてきたが、その分子レベルでの詳細は未だ明らかにされていない。

Apg8 はオートファゴソーム形成過程の膜構造体に局在するすることが観察されており、オートファゴソーム膜形成に深く関わる分子であることが明らかにされている。申請者の研究は、出芽酵母におけるオートファジーに必須な未知蛋白 Apg3 の解析に始まっており、その解析の中で Apg8 が膜内在性様性質を得るために必要な分子であることが明らかした。免疫沈降実験によって Apg3 と Apg8 の両者には物理的相互作用が見られ、それは Apg4、Apg7 に依存的であった。すでに Apg4 は Apg8 の C 末端を Gly に変換するプロテアーゼであること、Apg7 はユビキチン様 Apg12-Apg5 結合システムの活性化酵素であることが知られていた。これらの事実から Apg8 もまた Apg7 により活性化され、Apg3 を経て、何らかの分子と結合することによって膜内在性タンパク質の性質を示すことを示唆された。免疫沈降実験により Apg8-Apg7、Apg8-Apg3、各々の結合がチオエステル結合であることが認められ、Apg8 が Apg7 によって活性化された後に Apg3 と結合することも明らかにした。その後、共同によって、Apg8 の C 末端 Gly にホスファチジルエタノールアミンが結合していることが明らかにされた。従って、Apg8 は Apg4 によるプロセッシング後、Apg7 の活性化、Apg3 の結合を経て、ホスファチジルエタノールアミンと結合する。これらはまさにユビキチン化に類似した反応様式であり、蛋白の脂質化にユビキチン様修飾システムが関わる初めての示した点で画期的である。さらに申請者はこの修飾システムは本研究で試験管内で ATP 依存的に完全に再構成された。試験管内での再構成実験から Apg8 が PE と結合するためにはターゲット膜の PE 含量が重要であることを見いだした。Apg8、Apg7、Apg3 と PE 含量の高い膜のみで、PE 化反応が起こるが、効率よく触媒的に進行するために何らかのファクターが必要とされることも示唆された。再構成系を用いた解析により、オートファゴソーム形成の分子機構の解明が期待される。このように本研究は非常に重要な発見を含むものであり、学位に相応しいものである。

論文に関連する口述試験として、新規の脂質化反応系の細胞内局在性、他の因子との複合体形成の可能性、反応の普遍性などのついて質疑がなされ、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。またオートファジーに関する一般的な質疑が交わされた。この結果審査委員全員一致して一村義信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。