

氏 名 木村 俊介

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 956 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 LC3 interacts with dynein motor and has an important
role in microtubule-dependent autophagosome movement

論文審査委員	主 査 教授	山尾 文明
	教授	徳永 万喜洋
	助教授	平田 たつみ
	教授	大隅 良典
	教授	荒木 弘之

論文内容の要旨

Autophagy is an intracellular bulk degradation system in which cytoplasmic components, such as proteins or organelles, are directed to the lytic compartment, lysosome or vacuole, by a membrane-mediated process. In the autophagic process, part of the cytosol or organelles is first enclosed by double- or multiple-membrane structures called 'autophagosome'. Eventually, the autophagosomes fuse with lysosomes and the sequestered contents and the inner membranes are degraded by lysosomal hydrolases. Recent studies revealed that autophagy is crucial for various physiological processes. However, the mechanism of autophagy is still left to be solved. For example, molecular mechanisms underlying the targeting process of autophagosome to lysosome have been unclear.

In the present study, I showed that a movement of autophagosome along microtubules is required for its targeting to lysosomes, and that LC3, an autophagosome binding protein, is a key molecule in assembly of autophagosome, dynein motor, and microtubules.

To study the dynamics of the autophagic process, I have developed a microscopic system for real-time observation of autophagosomes. Time-lapse observation using this system indicated that autophagosomes labeled with GFP-LC3 moved in the cytosol, whereas pre-autophagosomal isolation membranes labeled with GFP-Atg5 scarcely moved. Autophagosome showed both a rapid long-range motion and random short-range motion. The average speed of autophagosome is $5.3 \pm 2.6 \mu\text{m}/\text{sec}$. Nocodazole inhibited the long-range motion almost completely, whereas other cytoskeletal inhibitors did not inhibit this movement. Immunofluorescent microscopic study showed that endogenous LC3 arranged along the tracks of microtubules. These findings indicate that autophagosome moves along microtubules.

Cytoplasmic dynein and kinesin are microtubule-dependent motor proteins responsible for transport of a variety of organelles and vesicles. Dynein drives the cargo to minus-end of microtubules, while kinesin drives to plus-end of microtubules. Considering that autophagosomes were often directed to the perinuclear region, the minus end of microtubules, it seemed likely that dynein are involved in the autophagosome movement. Overexpression of dynamitin, which is known to disrupt dynein- and dynactin-dependent organelle movement, inhibited autophagosome movements. In addition, endogenous LC3 colocalized with dynein-dynactin complex. Coimmunoprecipitation and GST pull-down assay showed that LC3 directly interacts with the intermediate chain of cytoplasmic dynein, which is a subunit of dynein motor complex. These results indicate that autophagosomes are linked with the dynein-dynactin complex through the interaction between LC3 and dynein intermediate chain.

To clarify the involvement of LC3 in autophagosome movement, microinjection experiments of anti-LC3 antibodies were performed. While injection of neither anti-GFP nor control IgG had effect on autophagosome movement, injection of anti-LC3 antibodies inhibited the movement. Moreover the anti-LC3 peptide antibodies raised against the N-terminal 1-15 residues, which is known as a microtubule binding region, also inhibited the movement. These results suggest that LC3 is involved in the autophagosome movement, and interaction of microtubule with LC3 is

important for this movement.

To assess whether microtubule-dependent movement is necessary for the autophagic delivery of cytoplasmic components to lysosome, I established a novel transport assay using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). Using this FRAP assay, the transport and fusion of autophagosomes to lysosomes were measured. The transport and fusion were significantly inhibited by the injection of anti-LC3 antibody, whereas control IgG had no effects on the transport and fusion. This FRAP assay showed that microtubule-dependent movement is necessary for targeting of peripherally-formed autophagosomes to lysosomes localizing to perinuclear region.

From these results, I concluded that 1) autophagosome movement is dependent on microtubule and dynein/dynactin motor complex, 2) this movement is necessary for targeting of autophagosomes to lysosomes in mammalian cells, and 3) LC3 plays an important role in assembly of the transport machinery. LC3 may link dynein motor, microtubule and autophagosome. The present study is the first report elucidating the function of LC3 in autophagy in mammalian cells.

論文の審査結果の要旨

オートファジーは細胞質に生じる隔離膜により発展、形成されるオートファゴソームによって細胞質成分がリソソームへと輸送され分解される系で、細胞内における主要な蛋白質分解システムである。近年オートファジーの役割に関して多くの研究結果が発表されているが、その分子メカニズムには未だ不明な点が多い。

木村君は、オートファジーの一連のプロセスの中で、オートファゴソームが細胞質からリソソームへ移動するしくみに着目した。まず最初に彼は、オートファゴソーム膜上のタンパク質 LC3 と GFP との融合蛋白質を用い、オートファゴソームの生細胞内観察を行い、その細胞内移動を詳細に観察した。その結果、オートファゴソームのランダムな微小な動きと方向性を持った移動性の動きの二つを観察した。さらにこれらがノコダゾールで阻害される事などから、オートファゴソームの微小な動きと方向性を持った移動の両者が微小管とダイニンモーターに依存していることを明らかにした。

次に彼は、以前からオートファゴソームのマーカータンパク質として利用されてはいたが、その機能についてほとんど明らかになっていなかった LC3 タンパク質が実は dynein IC と結合することを見だし、LC3 がオートファゴソームの動きと移動に関与していることを示唆した。実際その後の彼の実験で、抗 LC3 抗体のマイクロインジェクションによりオートファゴソームの微小な動きと、オートファゴソームのリソソームへの輸送が阻害されることを観察した。これらのことからオートファゴソームの微小な動きがリソソームへの輸送過程に重要であり、それら動きの過程に LC3 が深く関わる事を示した。以上の事から木村君は、LC3 分子は微小管、ダイニンモーターとオートファゴソームをリンクさせるキータンパク質である可能性を結論づけた。

本研究は、近年急速に解明が進むオートファジーのプロセスの中で、これまでほとんど解析されていなかったオートファゴソームのリソソームへのターゲティングの分子メカニズムに関して、初めてその解明の糸口を見だし、これを大きく展開した事で高く評価される。同時に、マーカータンパク質としてのみ有用視されてきた LC3 タンパク質の機能の一端が明らかになって点でも大変興味深い研究である。これらの事から、審査員全員の一致した結論として、本申請論文が学位論文として十分な質を備えたものであると判断した。

博士論文審査会で、論文内容及びその周辺の基礎となる分野について種々の質問を行ったが、これらに対する木村君の回答はいずれも適切なものであり、問題意識が明確で、研究内容についてよく考えていることがわかった。これに加えて、公開發表とそこでの質疑応答、博士論文の内容から判断して、木村君はその専門分野とその基礎的分野において、博士号を得るのに十分な知識、見識と理解力を有すると結論した。博士論文はすぐれた英語で書かれており、その英語能力も問題ないものと判断した。