

氏 名 松永 耕一

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1100 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 28 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 Beclin-1-hVps34 phosphatidylinositol 3-kinase  
complexes function in autophagic and endocytic  
pathways

論文審査委員	主 査 教授	徳永 万喜洋
	教授	山尾 文明
	准教授	平田 たつみ
	助教	椎名 伸之
	教授	大隅 良典

## 論文内容の要旨

Protein degradation, as well as synthesis, is essential to homeostasis of the cell and most long-lived proteins are degraded in lysosomes. The lysosome of mammalian cells is the major site of macromolecular turnover, which is carried out by various kind of hydrolases. The mechanism to deliver cytoplasmic components and hydrolases to the lysosome respectively is required for completion of macromolecular turnover in the cells.

The mechanism to deliver cytoplasmic components to the lysosomes is called autophagy in general. Autophagy is an intracellular bulk degradation system that is found ubiquitously in eukaryotes. In autophagy, cytoplasmic constituents including organelles are sequestered into double-membraned autophagosomes, which subsequently fuse with lysosomes where their contents are degraded. This system is involved in various physiological process including protein and organelle turnover, the survival under starvation condition, cellular differentiation, programmed cell death, and defense against pathogenesis.

The mechanism to deliver lysosomal hydrolase to the lysosomes is called Vps pathway. The transport pathways of hydrolases to the vacuole/lysosome are similar in both yeast and mammals. Genetic and biochemical analysis of hydrolase sorting in *Saccharomyces cerevisiae* were instrumental to the discovery of key components of the vacuolar protein sorting (Vps pathway) machinery. Screening for mutant *S. cerevisiae* strains that secrete pro-carboxypeptidase Y (pro-CPY) instead of delivering it to the vacuole resulted in the identification of over 60 distinct Vps proteins that participate in pro-CPY sorting.

Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) control essential cellular functions such as cytoskeletal dynamics, signal transduction and membrane trafficking. Class III PI3Ks are homologues of yeast, *Saccharomyces cerevisiae* Vps34p and phosphorylate exclusively PtdIns. class III PI 3-kinase plays multiple roles in endocytic pathway and a role in autophagic membrane trafficking in yeast and mammals. Two distinct Vps30p/Atg6p-Vps34p Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) complexes in yeast, namely Atg14p containing complex (complex I:

Vps30p/Atg6p-Atg14p-Vps34p-Vps15p) and Vps38 containing complex (complex II: Vps30p/Atg6p-Vps38p-Vps34p-Vps15p), function in autophagy, and sorting of carboxypeptidase Y (CPY), respectively. On the other hand, although Beclin-1, a mammalian Vps30p/Atg6p homolog, is known to bind to class III PI3-kinase and the hVps15, mammalian homologs of Atg14p and Vps38p have not yet been identified.

In this study, we aimed to identify components of mammalian Beclin-1 complex using a tandem affinity purification approach coupled with proteomic techniques. I identified five proteins as a Beclin-1 binding protein, p70, UVRAG, hVps34, p130 and p150 (hVps15) ; p70 and p130 are novel. I noticed that UVRAG and p70 were similar to yeast Vps38p and Atg14p, respectively, with respect to protein sequence. UVRAG and p70 were present in the distinct complexes.

UVRAG was localized to late endosome, whereas p70 localized to isolation membrane and autophagosome. Starvation induced autophagosome formation (GFP-LC3 punctate) was found to be reduced by p70 or Beclin-1 targeted shRNA compared to the control, while transport of lysosomal hydrolase, cathepsin D was impaired by UVRAG, p130 or Beclin-1 targeted shRNA compared to the control.

Data base searches predicted that p130 is a novel protein exhibiting no significant similarity to protein sequences in yeast. p130 was associated with UVRAG containing complex and was colocalized with late endosome/lysosome marker. Overexpression of p130 lead to the abnormal exaggeration of the compartments and inhibited transport of internalized EGF to lysosome.

These results suggest that there are two distinct Beclin-hVps34 complexes in mammals, Beclin-p70-hVps34-p150 and Beclin-UVRAG-p130-hVps34-p150 that play a role in autophagic and endocytic pathways, respectively. Although the complexes are similar to those in yeast, the new additional component, p130 is included.

## 論文の審査結果の要旨

細胞内の分解の場であるリソソームに接続する真核細胞のメンブレントラフィックとして、オートファジー経路と、エンドサイトーシス経路とが存在する。松永君は、両経路制御に関わる哺乳動物の3つのタンパク質を同定し、メンブレントラフィック制御機構に関する重要な知見を得た。

両経路に働く酵母タンパク質 Vps30/Atg6 が近年注目されている。Atg14, Vps34, Vps15 と4者複合体を作りオートファゴソーム形成に働く。一方、Atg14 の代わりに Vps38 を用い、Vps38, Vps34, Vps15 と4者複合体を形成すれば、エンドサイトーシス・液胞輸送経路で機能することが見つかったからである。

ところが、哺乳動物では Vps30/Atg6 のホモログである Beclin-1 が、III型 PI3 キナーゼ (Vps34 ホモログ) と p150 (Vps15 ホモログ) と複合体を作りオートファジーに働くことは判明しているが、Atg14 や Vps38 のホモログは見つかっておらず、Beclin-1 は酵母と異なりオートファジー機能しかもたないとされてきた。

松永君は Beclin-1 の役割をもっと詳細に明らかにするために、多段階免疫沈降法と LC-MS/MS のシステムによる網羅的結合タンパク質群の探索を行い、5つの結合タンパク質(p70, UVRAG, p130, hVps34, p150(hVps15))同定に成功した。後者2つは上記既知の Vps34 と Vps15 のホモログであったが、前者3つは機能未解明の新規タンパク質分子であった。

そのうち p70 と UVRAG はそれぞれ Atg14 と Vps38 の哺乳動物ホモログである可能性が配列解析から推測された。結合実験から p70 と UVRAG は Beclin-1 とそれぞれ異なる複合体を形成している事がわかった。さらに UVRAG は後期エンドソーム/リソソームに局在し、一方 p70 は飢餓依存的に隔離膜やオートファゴソームに局在した。

それぞれのタンパク質に対して、RNAi によるノックダウンを利用した機能解析によると、p70 のノックダウンにより飢餓依存的なオートファゴソーム形成が阻害され、一方 UVRAG のノックダウンではリソソームへのカテプシン D の輸送が阻害された。Beclin-1 のノックダウンでは両方の効果が確認できた。

さらに p130 は酵母には無い新規タンパク質と考えられ、Beclin-1-UVRAG 側の複合体にのみ存在していた。p130 の過剰発現はエンドソームの形態とエンドサイトーシス経路における輸送の異常を引き起こした。

以上の結果により、哺乳動物細胞における Beclin-1-hVps34 複合体は二つの異なる複合体を形成しており(哺乳動物複合体 I: Beclin-1-p70-hVps34-p150, 哺乳動物複合体 II: Beclin-1-UVRAG-p130-hVps34-p150)、それぞれオートファジー経路とエンドサイトーシス経路に機能している事が明らかになった。哺乳動物と酵母との対応を見事に解決した素晴らしい結果である。

さらに、酵母には無い新規タンパク質 p130 の発見は、これらタンパク質複合体が酵母が持つ仕組みを基本としつつ、さらに進化したメンブレントラフィックの制御機構が哺乳動物に存在することを示唆する重要な知見である。以上の理由で松永耕一君の論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。