

氏 名 藤田尚信

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1165 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 19 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 Molecular Mechanism of LC3 Lipidation and the Role of
LC3 in Autophagosome Biogenesis.

論文審査委員 主 査 教授 徳永 万喜洋
教授 荒木 弘之
教授 山尾 文明
准教授 平田 たつみ
チーフ 大野 博司（理化学研究所）
リーダー

論文内容の要旨

Autophagy is a process in which cytosol and organelles are sequestered within double-membraned vesicles, so-called autophagosome, that deliver the contents to the lysosome/vacuole for degradation. To date, over 17 ATG genes are shown to be necessary for autophagy, but there is still limited knowledge as to how these ATG gene products are involved in the process. Formation of autophagosome involves two ubiquitin-like conjugation systems. The first is the LC3 system. LC3 (mammalian Atg8) is conjugated to phosphatidylethanolamine (PE), and associated with the autophagosomal membrane. The second is the Atg12 system. Atg12 is conjugated to Atg5, which in turn forms ~800-kDa protein complex together with Atg16L (referred to as the Atg16L complex). The Atg16L complex localizes to the precursor membrane of autophagosome. Precise role of LC3 and the Atg16L complex in autophagosome formation is not fully understood so far.

In part I of my thesis, I focused on the molecular mechanism of LC3 lipidation. It has been known that in the absence of the Atg12-Atg5 conjugate, PE-conjugated LC3 is severely reduced and cytosolic LC3 does not target to the membrane. However, the mechanism how the two conjugation systems act collaboratively is still largely unknown. Here we show that overexpression of Atg12 or Atg16L inhibits autophagosome formation. Through a mechanistic analysis, I found that the site of LC3 lipidation is determined by the membrane localization of the Atg16L complex and the interaction of Atg12 with Atg3, the E2 enzyme for the LC3 lipidation process. Furthermore, forced localization of Atg16L to the plasma membrane enabled ectopic LC3 lipidation at that site. Thus, I propose that the Atg16L complex is a novel type of E3-like enzyme functioning as a scaffold for LC3 lipidation by dynamically localizing on the putative source membranes for autophagosome formation.

In part II, I focused on the role of LC3 in autophagosome biogenesis. Atg8 is considered as a factor to allow expansion of the autophagosomal membrane in yeast, however, functional analysis of LC3 has been retarded by the presence of multiple Atg8 homologues in mammals. Here I show that overexpression of inactive Atg4B, a processing protease for proform of LC3, has a strong inhibitory effect on PE conjugation of LC3 and other Atg8 homologues. Through a mechanistic analysis, it was revealed that the cause of the inhibitory effect is titrating out of free form of LC3. Taking advantage of this inhibitory effect, I examined the role of LC3 for autophagosome biogenesis in mammalian cells. In the inactive Atg4B mutant overexpressing cells, autophagic degradation was hampered and Atg5-positive immature autophagic structures were significantly accumulated. Although the size of the Atg5-positive membrane structure was comparable to the autophagosome in control cells, a large portion of the structure is not closed. These results establish for the first time that LC3 is essential for the completion of autophagosome formation in

mammalian cells.

This study revealed the molecular mechanism of LC3 lipidation and the role of the resulting PE conjugated LC3 in autophagy. Through the study I could provide novel insights into the process of autophagosome biogenesis in mammalian cells.

論文の審査結果の要旨

オートファジーは、真核生物に備わる大規模かつ非選択的な細胞内分解経路である。多くの生命現象に関与していることが判明し、注目されている。リン脂質とタンパク質が集まり、オートファゴソーム（オートファジー小胞）が形成され、その後リソソームと融合し、オートファゴソームに取り込まれたタンパク質が分解される。藤田君は、オートファジー特異的マーカータンパク質である LC3 の脂質修飾の分子機構と、オートファゴソーム形成における役割を明らかにした。

オートファゴソーム形成には少なくとも 17 の遺伝子が必要であり、それらの半数以上は、2つのユビキチン様分子 (Atg12, LC3) の結合反応系に関与している。LC3 は酵母 Atg8 の哺乳動物ホモログである。Atg12 は Atg5 と共有結合した後 Atg16L と会合し、約 800kDa のタンパク質複合体として機能している。一方、LC3 は脂質であるフォスファチジルエタノールアミンと共有結合して、オートファゴソーム膜上に局在している。これまでに、これらの結合系がオートファゴソーム形成に必要であることは示されているが、その具体的な機能は明らかにされていなかった。藤田君は、過剰発現させた Atg12, Atg16L, また Atg4B (LC3 に対するプロセッシングプロテアーゼ) がオートファゴソーム形成の異なる段階をそれぞれ特異的に阻害する現象を見いだした。

Atg12 と Atg16L の過剰発現による阻害効果の分子機構を検討した。その結果、Atg12 と Atg3 (LC3 結合系の E2) の結合、また Atg12-5-16L 複合体の膜局在が、LC3 の脂質修飾に必要であることを明らかにした。さらに、本来は LC3 の脂質修飾がおこらない細胞膜に、強制的に Atg12-5-16L 複合体を局在させると、細胞膜上で LC3 の脂質修飾が起こった。これらの結果より、Atg12-5-16L 複合体が、ユビキチンリガーゼ (E3) 様因子として、LC3 脂質化の場を決める働きをしていることを初めて明らかにした。

一方、Atg4B を過剰発現させると、Atg4B のプロテアーゼ活性に依存せずに LC3 システムを阻害していた。不活性型の Atg4B 変異体は、遊離型の LC3 に強固に結合して、LC3 と E1 酵素の結合を阻害していた。Atg4B 変異体を発現させた細胞では、脂質修飾された LC3 は検出されず、オートファジーによるタンパク質分解は強く阻害されていた。さらに、これらの細胞を電子顕微鏡で観察したところ、内容物が分解されたオートライソソームは観察されず、一部分閉じていないオートファゴソーム様の構造体が有意に蓄積されていた。これらの結果から、LC3 system が哺乳動物細胞においてオートファゴソームが最終的に閉じる段階に関与していることを明らかにした。

以上のように、オートファゴソーム形成の分子機構に関し、複数の重要な発見を行っており、関連分野への寄与は大きい。以上の理由から、藤田尚信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。