

氏 名 桐 浴 隆 嘉

学位 (専攻分野) 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第537号

学位授与の日付 平成13年3月23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 New Insight in the Membrane Dynamics of Autophagy
by Studies on Apg8p

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 諸橋 憲一郎
教授 大隅 良典
教授 西村 幹夫
主任研究 中野 明彦 (理化学研究所)
員

Autophagy is the nonselective bulk protein degradation system in the lytic organelle, the lysosome/vacuole, and an example of non-classical vesicular transport from the cytoplasm to the compartment via double-membrane vesicles, autophagosomes. So far, 15 *APG* genes essential for autophagy have been cloned in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and some *APG* gene products have been characterised. However, the molecular mechanism of membrane dynamics of autophagy, in particular the formation of autophagosomes, is still unclear. The *APG8* gene encodes a small hydrophilic protein with about 15 kD in mass. The gene product, Apg8p, drastically increases in abundance by induction of autophagy. The elevation of amount of Apg8p is regulated transcriptionally. In spite of the hydrophilic nature, Apg8p is mainly bound to membrane both growth and starvation conditions.

Many homologs of Apg8p exist in various eukaryotic organisms. One of the homologs, LC3, binds to microtubule *in vitro*. Thus, he examined requirement of microtubule for autophagy morphologically and biochemically using a microtubule depolymerising drug, and clarified that microtubule is not necessary for autophagy.

After confirming that Apg8p functions in the formation of autophagosome, intracellular localization of Apg8p was assessed by immunofluorescence and immunoelectron microscopic analyses. The analyses revealed that Apg8p resides on the membrane structures at the various stage in autophagosome formation, autophagosomes and autophagic bodies. Apg8p is the first identified molecule that traces the whole process of membrane dynamics in autophagy. Immunoelectron microscopy also revealed that Apg8p is more enriched on the membranes of the intermediate structures of autophagosome than on those of mature autophagosomes. The result indicated that Apg8p should directly function at the step of autophagosome formation and suggested that it may be detached from the membranes before autophagosome is formed up completely. Furthermore, the observation of the formation process of autophagosomes traced with Apg8p provided a new proposal that autophagosomal membrane may be generated *de novo* from some source membrane structures, that include Apg8p-localized membrane structures, but not from preexisting membrane cisterna.

As described above, Apg8p seemed to be a key molecule for elucidating the molecular mechanism of autophagosome formation. Thus, he performed further characterization of Apg8p and discovered that Apg8p undergoes a novel reversible modification. Apg8p is produced as the precursor form in cells. The newly synthesized Apg8p is cleaved by a novel cysteine protease, Apg4p, to remove the original carboxy-terminal arginine residue, and thereby a Gly residue becomes the carboxy-terminal residue of the protein. Subsequently, Apg8p forms a covalent conjugate with a general glycerophospholipid, phosphatidylethanolamine (PE), which is a major component of biological membrane. Apg8p binds to PE via amide bond between carboxyl group of the carboxy-terminal glycine of Apg8p and amino group of PE. The formation of the adduct, designated Apg8p-PE, requires Apg7p and Apg3p. Finally, Apg8p-PE is deconjugated to Apg8p and PE by cleavage action of Apg4p. Apg7p and Apg3p were already identified as the

modification enzymes for Apg8p, which are equivalent to E1 and E2 enzymes for ubiquitination, respectively. Furthermore, the mode of action of Apg4p, which cleaves both newly synthesized Apg8p and Apg8p-PE, well resembles that of some deubiquitinating enzymes which cleave both the precursor of ubiquitin and the adducts of ubiquitin with substrate. The overall similarity demonstrates that ubiquitination-like system involves in the formation of Apg8p-PE. So far, there had been no report that ubiquitination and the related systems are utilized to protein-lipidation. This is the first evidence that ubiquitination-like modification mediates protein-lipidation. At the point of protein-lipidation, this study showed the first example that protein is covalently conjugated to phosphatidylethanolamine.

The formation and deconjugation of Apg8p-PE is essential for formation of autophagosomes. Free Apg8p is originally loosely membrane bound or soluble. The reversible modification changes the membrane-binding state of Apg8p. Apg8p turns to be bound to membrane tightly by the conjugation with PE, and it is returned to loosely-membrane bound or soluble by the deconjugation. These features are consistent with morphological evidence that Apg8p is well localized along the membrane of autophagosome intermediates but little detected on mature autophagosome. The regulation of the membrane-binding state of Apg8p by the reversible modification is essential for autophagosome formation.

論文の審査結果の要旨

自食作用は、真核細胞に普遍的な生理現象であり、その解明は細胞を理解する上で必須である。自食作用の機構をめぐる最大の課題の1つは、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体がいかに細胞内に区画を形成し分解コンパートメントに細胞質成分を送り込むかと言う点にある。これは分泌経路における出芽と融合過程とは明らかに異なる新しい原理を含むものである。従来このオートファジーの研究は電子顕微鏡による形態学的な研究に依拠しており、これまでにこの過程に関わる分子レベルの研究はほとんど進展が見られなかった。

桐浴は自食作用に必要なタンパク質 Apg8p の解析を開始し、Apg8p が飢餓条件下にその発現が誘導され、細胞内局在を大きく変動させること、さらにこの蛋白質がオートファゴソームに係わる膜構造体に局在することを発見した。従来オートファゴソーム形成過程の研究が困難であった理由はこの膜構造に特異的標識タンパク質がなかったことに起因している。彼の発見はオートファゴソーム形成を追跡する上で重要な意味を持っている。日本女子大馬場美鈴氏との共同研究を進め、Apg8 がオートファゴソーム形成中間体に局在することを明らかにし、オートファゴソームの形成に関する既存の膜による囲い込みとする従来の説を覆すモデルを提唱した。この成果は細胞生物学分野で最も権威ある国際誌 *J. Cell Biol.* に1昨年10月号に掲載された。

続いてこの一年間で Apg8p のさらなる解析を進め、上記モデルを実証する目覚ましい成果を挙げている。Apg8p は翻訳後 C-末端のアルギニンが切断を受ける。このプロセシングがオートファジーの進行に必須である。さらにこの切断には自食作用遺伝子として分離されていた APG4 が関与していることを突き止めた。さらに彼は実際 *invitro* 系により Apg4p が新規のシステインプロテアーゼとしてこのプロセシングに働いていることを見いだした。このプロセシングによって Apg8p の C-末端にグリシンが露出する。Apg8p は見かけの分子量が変化することはないが、アルギニン切断後 C-末端グリシンを介してさらに翻訳後修飾を受け、膜に強固に結合する型 Apg8-X に変換される。さらに重要なことは Apg4 が単にプロセシング酵素として機能しているのではなく、一旦膜に結合して Apg8-X 分子が膜から離脱することがオートファジーの進行に必須であることを見出した。Apg8p はオートファゴソーム形成に際して修飾反応によって一過的に膜に結合することが重要である。これらの結果は昨年10月16日号の *J. Cell Biol.* に掲載された。この論文は大きなインパクトを与えるものとして、*J. Cell Biol.* の特記すべきニュースとして紹介されている。

さらにこの修飾反応がユビキチンに類似した結合反応系によっていることを、総研大生一村義信と共同で明らかにし現在 *Nature* に発表した。即ち Apg8 はプロセスを受けた後、Apg12 を活性化する E1 酵素 Apg7 によって活性化され、新規の E2 酵素である Apg3 に受け渡される。驚くべきことに最終的に Apg8 の末端グリシンは生体膜の主要構成脂質の一つであるホスファチジルエタノールアミンのアミノ基とアミド結合を形成する。哺乳動物におけるホモログの解析も桐浴を共著者として *EMBO J.* に報告されている。このように彼は既に博士論文に十分な成果を修めていると審査員全員一致で判断した。

学位論文として提出された研究成果について口頭発表させた後、審査委員が論文内容に

付いて試問した。また、関連分野の一般知識、及びその背景となる基礎知識に付いても口頭試問により審査を行った。発表された研究は、論理的に構成されており、得られた結果は結論を導くに十分なものであった。また審査員の質問に対する申請者の応答はいずれも的確なものであった。提出された学位論文は英語で書かれていること、また申請者は既に国際誌に数遍の論文を発表しており、英語に関する能力に付いても十分であると思われた。これらの結果をもとに、審査委員会は申請者の持つ研究能力及び、学力は学位取得に値するものと判断した。