

氏 名 久 万 亜紀子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第690号

学位授与の日付 平成15年3月24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 Studies on the Apg12-Apg5・Apg16 complex essential
for autophagy

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 上野 直人
教授 大隅 良典
教授 高田 慎治
助教授 上野 隆（順天堂大学）

論文内容の要旨

In eukaryotic cells, the majority of intracellular bulk degradation occurs in the vacuole/lysosome, an acidic compartment that contains various hydrolytic enzymes. Autophagy is the main pathway to deliver cytoplasmic components to the vacuole in yeast, or to the lysosome in mammalian cells, for degradation. In this process, portion of cytoplasm are sequestered within the double-membrane structure termed autophagosome, which subsequently fuses with the vacuole/lysosome. The sequestered components are, then, degraded by the vacuolar or lysosomal hydrolases for reuse. The best-known role of autophagy is a cellular survival response to starvation, but it also plays important roles in developmental process and cell differentiation.

Taking advantage of yeast genetics, autophagy defective mutants (*apg*) were isolated and so far 15 *APG* genes have been cloned. All of them seem to be involved in the step of autophagosome formation. During the characterization of Apg proteins, a ubiquitin-like conjugation system, the Apg12 system, was found to be essential for autophagy. In this system, Apg12 is covalently bound to Apg5, which is catalyzed by Apg7 and Apg10. Mammalian homologues of Apg12 and Apg5 have been identified and undergo a similar covalent linkage, indicating that this conjugation system is conserved in mammalian cells. Studies using mammalian cells further revealed that the Apg12-Apg5 conjugate localized to pre-autophagosomal membrane and is required for elongation of the membrane to form a complete spherical autophagosome. But the exact molecular role of the Apg12-Apg5 conjugate is still unknown.

Recently, Apg16 was found to interact with the Apg12-Apg5 conjugate in yeast. Apg16 is a 150-amino acid protein that contains a carboxyl-terminal coiled-coil motif. Since Apg16 is the only molecule identified to interact with the Apg12-Apg5 conjugate and required for function of the conjugate, further characterization of Apg16 would provide valuable insights into the molecular role of the Apg12-Apg5 conjugate. In this study, she found that Apg12-Apg5 conjugate formed a ~350-kDa complex with Apg16 in the cytosol of yeast cells, irrespective of autophagy induction. As Apg16 formed homo-oligomer through the coiled-coil region and cross-linked Apg12-Apg5, she generated an *in vivo* system that allows us to control the oligomerization state of Apg16. With this system, she demonstrated concretely that formation of the ~350-kDa complex depends on oligomerization of Apg16 and formation of this complex is required for autophagy in yeast.

Although the Apg12-Apg5 conjugation system is highly conserved among eukaryotes, there is no significant homologue of Apg16. In mammalian cells, the Apg12-Apg5 conjugate forms a ~800-kDa complex, much larger than the yeast Apg12-Apg5 · Apg16 complex. Purification of this ~800-kDa complex identified a novel Apg5-interacting protein containing seven WD repeats. She demonstrated that this newly WD repeat protein, named Apg16L, is a functional counterpart of yeast Apg16. Mouse Apg16L interacts with Apg5 at its amino-terminal region and forms a homo-oligomer through its coiled-coil region to form the ~800-kDa complex as yeast Apg16. Apg16L associates with pre-autophagosomal membrane with the Apg12-Apg5 conjugate, suggesting that the ~800-kDa complex functions in autophagosome formations in mammalian cells.

Since multiple homologues of Apg16L exist in higher eukaryotes, the autophagic machinery is well conserved through evolution. On the other hand, WD domain, which is thought to be a platform for protein-protein interaction, is not found in yeast Apg16. As the WD domain of Apg16L is not required for interaction with Apg5 and homo-oligomerization, the ~800-kDa complex is expected to interact with other proteins. Identification of such proteins would be helpful to understand the molecular mechanism of the Apg12-Apg5 conjugate in autophagosome formation.

論文の審査結果の要旨

オートファジーは、真核生物に普遍的かつ主要な細胞内タンパク質分解機構である。この過程では、オートファゴソームと呼ばれる特殊な膜構造体が形成され、この膜構造体によって細胞質成分やオルガネラが分解コンパートメントであるリソソームや液胞に運ばれる。オートファゴソームの形成メカニズムについては未だ不明な点が多い。オートファジー遺伝子 (*APG*) 産物の解析から、Apg12 と Apg5 がユビキチン様の反応によって共有結合することがオートファゴソームの形成に必須であることが分かっている。この反応系は酵母から高等動植物までよく保存されており、Apg12-Apg5 結合体はオートファゴソームの形成において重要な機能を果たすと考えられる。酵母ではさらに Apg16 が Apg5 と結合し、Apg12-Apg5-Apg16 複合体を形成することが予想されていた。本研究では、酵母および動物細胞を用いて Apg12-Apg5-Apg16 複合体の詳細な解析を行った。

酵母を用いた解析によって、Apg12-Apg5 および Apg16 は主に細胞質に存在し、約 350kD の複合体を形成することが明らかになった。この複合体には化学量論的にみて他の因子を含んでいないことから Apg12-Apg5-Apg16 の 4 量体であると考えられる。また、Apg16 のオリゴマー形成を制御するシステムを構築し、Apg12-Apg5-Apg16 複合体が Apg16 のオリゴマー化を介して形成されることを明らかにした。さらに、Apg12-Apg5-Apg16 複合体の形成がオートファジーに必須であることを示した。

また、動物細胞を用いた解析によって、マウス ES 細胞から発見された新規の WD リピードタンパク質 Apg16L が酵母 Apg16 とよく似た性質を持ち、動物細胞では Apg12-Apg5、Apg16L が細胞質において約 800kDa の複合体を形成することを明らかにした。これらは 3 者の 8 量体であると推定される。

以上の結果から、Apg12-Apg5-Apg16 は恒常的に大きな複合体として細胞質に存在し、その一部がオートファジー誘導時に膜上へリクルートされ機能することが示唆された。膜へリクルートされる機構や膜形成における機能については今後の課題であるが、高等生物に見いだされた C-末端領域の解析が待たれる。

以上の結果に関しては、主要な内容が既に国際誌に公表されており、学位論文として十分な内容を持つものである。

論文に関する事項、タンパク質複合体、実験手法などについて質疑がなされ、本研究に対して十分な考察がなされており、周辺領域に関しても良く理解していることが確認された。論文が英文で書かれており、また本論文の内容の一部は既に国際誌に受理されており、申請者の英語の能力は博士に相応しいものと判断された。以上、審査委員は、全員一致で、申請者久万亜紀子が学位授与に足る学識と能力を持つと判断した。