

氏 名 濱 崎 万 穂

学位 (専攻分野) 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第691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 membrane dynamics under starvation
in yeast

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 西村 幹夫
教授 諸橋 憲一郎
教授 大隅 良典
教授 楠見 明弘 (名古屋大学)

論文内容の要旨

Yeast cells are constantly challenged by the changes in their external environments thus they must be well-equipped to rapidly adapt their internal system for their survival. Most frequently, yeast cells face the nutritionally challenging conditions; they overcome such stress by altering several of their cellular mechanisms, including those leading to cell growth arrest, which are strongly influenced by the secretory pathway. One aspect of this cellular adaptation is achieved by the reorganization of genomic expression that has been studied by many groups; expression of genes required in protein synthesis and/or uptake of specific amino acids are reduced whereas genes that encode hydrolases are induced. Another aspect of adaptation to such stress is carried through the dynamic changes in membrane trafficking, which has not been given much attention. An example of such change is that an amino acid transporter already expressed at the plasma membrane is endocytosed and transported to the vacuole for degradation under starvation to reduce an amino acid uptake. In recent years, autophagy is discovered as one of the starvation responses in yeast and delivers cytoplasmic components to the vacuole for degradation mediated by a double membrane structure called autophagosome. Degrading proteins in the vacuole release free amino acids, which are used to rebuild the internal system to fit into a new environment, thus degradation plays an important role in adapting to starvation stress. She studied from the two points of view to understand the membrane dynamics during starvation: one is by observing the changes induced by such stress in the secretory pathway and another by investigating the involvement of factors engaged in membrane trafficking in autophagy.

First part of this study shows the involvement of an early secretory flow by the studies of COPII factors which function in the formation of COPII vesicles that bud from the ER in autophagy. The defect in autophagosome formation was found in *sec12*, *sec16*, *sec23* and *sec24* mutants but not in the *sec13* and *sec31* mutant cells. This unanticipated result puzzled me to understand how only the particular COPII components were involved in autophagy. She coped to find their relations by converging my interest on an active flow created by COPII vesicles and not on the specific role of each COPII components. The autophagic defect in *sec24* deleted mutant cells was suppressed upon the recovery of its secretory flow by the overexpression of its homologue, Sfb2p. She also found that the starvation stress suppressed the secretory defect of *sec13* and *sec31* mutant cells. These observations reveal that an active flow in the early secretory pathway plays an important role in autophagy; autophagy proceeds in the presence but not in the absence of the early secretory flow. Both autophagy and its closely related the cytoplasm to vacuole-targeting (Cvt) pathway occur through the pre-autophagosomal structure (PAS), and since the PAS and the functional Cvt pathway exist in all *sec* mutants, the early secretory pathway must be involved specifically in autophagy, subsequent to the PAS formation.

The second part of this study shows the effects of starvation on the secretory pathway by following the dynamics of several organelle markers. Three major changes were found to occur at the site of ER, Golgi and the Golgi to the plasma membrane transport pathway. First, starvation induced the degradation of ER fragments in the vacuole. Autophagosomes engulfed

both luminal and membrane ER marker proteins (HDEL fusion protein and Sec71p) with high frequencies, indicating that autophagy, a bulk degradation of cytoplasmic constituents, mediated this degradation. Second, starvation provoked the transfer of a significant amount of cis-Golgi proteins to the vacuole. The well-regulated localization of membrane proteins (Rer1p and Wbplp) was distorted in autophagy independent but the vacuolar protein sorting pathway dependent manner. Third, starvation shifted the default destination of soluble proteins of the secretory pathway (carboxypeptidase Y in *Δvps10* cells) from extracellular to the vacuole. These data demonstrate that proteins of the secretory pathway are redirected to the degradative pathway by adaptation to a stressful environment.

Last part of this study shows the possible involvement of the vacuole membrane in autophagosome formation. FM4-64, a lipophilic styryl dye that is used to stain the vacuole membrane, also stained autophagic bodies accumulated in wild-type and *Δpep4* mutant cells but not in *Δfab1* and *Δvac14* mutant cells that have defect in the backflow from the vacuole. It also stained autophagosome accumulated in *sec18 ts* mutant cells that have a defect at the fusion step of autophagosome and the vacuole, but not in *Δvam5* mutant cells that have a defect in the vacuole morphology. These results indicate that the backflow from the vacuole is involved in autophagosome formation. This is another membrane flow found to function in membrane biogenesis of autophagy.

In this study, she examined and discussed cellular responses to starvation stress from the view of membrane trafficking. It is quite a dynamic phenomenon; starvation induces not only autophagy but also many changes in the secretory pathway. The topic on the membrane biogenesis of autophagy found throughout this study is also discussed.

論文の審査結果の要旨

細胞は環境変化に応答する機構を備えており、オートファジーと呼ばれる細胞質構成成分を非選択的に分解する機構は、飢餓に対する応答の1つである。細胞はオートファジーによる分解産物を再利用することで生存維持に必須の蛋白をつくりだす。一方細胞は飢餓に反応して細胞分裂を停止し、それに伴い分泌経路による細胞表面への膜の伸張を停止する。本論文は、細胞の飢餓条件下に細胞内の膜動態が如何なる変化をするかを酵母を用いて遺伝学的な手法を駆使することにより、明らかにすることを目的とした研究である。

オートファジーが誘導されると、細胞質中にオートファゴソームと呼ばれる二重膜の構造体が細胞質を取り囲みながら形成される。この新規に形成されるオルガネラの膜の起源は未だ解明されておらず、ER、ゴルジ体、液胞と多くの仮説が乱立している状況にある。

第1に分泌経路をオートファジーの関係を明らかにするために、分泌系の初期過程の温度感受性変異株を用いた。ERからの分泌に欠損をもつ変異株はオートファジーが不能となることから、オートファゴソーム膜形成にERからの分泌が必要であることが示された。また液胞の脂質を蛍光染色すると、飢餓下にはオートファゴソームが染色されることから液胞からオートファゴソームへの膜の流れが存在することも判明した。これらは、小胞体や液胞がオートファゴソームの膜供給源になりうることを示唆している。

第2に飢餓時には分泌経路の蛋白質が、積極的に液胞へと輸送されることを明らかにした。ERの一部は飢餓ストレスによりオートファゴソームに取り囲まれ液胞へと運ばれる。通常ゴルジ体に局在する蛋白質も、液胞へと輸送されるが、その輸送機構はERの場合とは異なりオートファジーによらず、エンドソームを経由する。さらに細胞増殖時には分泌される蛋白質も飢餓条件下には液胞へと運ばれる。細胞内には飢餓時に特有の膜動態が存在することが明らかにされた。

第3にオートファゴソーム形成への液胞の関わりについて興味深い結果を得ており、今後の発展が期待される。

本研究は、細胞内膜系が環境に反応してダイナミックに機能を制御することをはじめて明らかにした点で独創性が高く、博士論文として十分な内容を持つと判断された。研究の一部は既に2報の論文として、公表されており、現在1つは投稿中であり、本論文は十分評価される。

論文の内容をめぐって、オートファジーの膜動態に関する疑問がなされ、申請者はこれらの質問に対して的確な返答をし、問題点も良く把握していることが確認された。また細胞生物学に関する質問にも明確に回答がなされ周辺領域の知識も十分持っていると判断された。この結果審査委員全員一致して濱崎万穂が博士の学位授与に足る学識と能力をもつと判定した。

博士論文は十分なレベルの英語で作成され、既に原著論文が国際誌に掲載され、一部は現在投稿中であることから英語の能力も十分であると判断した。