

審査の結果の要旨

氏名 中野 沙緒里

本研究は哺乳類細胞におけるオートファゴソームの形成後期すなわち成熟期における膜動態の変化を解明するため、成熟期特異的にオートファゴソームに局在する SNARE タンパク質である STX17 の局在解析を通じて、オートファゴソーム膜の性質の変化の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. STX17 のオートファゴソーム膜への局在に必要な分子内領域を探索した結果、これまで機能が未知だった C 末端領域が STX17 のオートファゴソーム膜への局在に必要なことが明らかとなった。さらに、STX17 の C 末端領域の特異的なアミノ酸配列ではなく正電荷アミノ酸がオートファゴソーム局在に必要であり、オートファゴソーム膜への特異性は正電荷アミノ酸の数に依存することが示唆された。
2. 無細胞タンパク質合成系で合成した STX17 と人工脂質膜（リポソーム）を用いた STX17 の膜挿入再構成実験から、STX17 は負電荷リン脂質膜嗜好性を有することが示された。また、この負電荷膜嗜好性はリン脂質親水部選択性が低いことが示された。
3. 正電荷領域および脂質結合領域を持つ膜表面電荷検出プローブの細胞内局在観察から、オートファゴソームは形成後期に形成初期よりも強い負電荷膜へと変化することが明らかとなった。さらに、この負電荷量はホスファチジルイノシトール 4-リン酸（PI4P）の濃縮により増加することが示された。
4. 細胞内から精製したオートファゴソームと無細胞タンパク質合成系で合成した STX17 の膜挿入再構成実験から、PI4P の脱リン酸化酵素である SAC1 を処理したオートファゴソームに STX17 が局在しないことが示された。従って、STX17 のオートファゴソームへの局在に PI4P が必要であることが示唆された。
5. 哺乳類で保存されている 4 種類の PI4 キナーゼを RNAi によりノックダウンした細胞の解析から、PI4 キナーゼはオートファゴソームの PI4P 産生に必要であり、特に PI4KB がオートファゴソームの PI4P 産生に最も寄与していることが示された。さらに、PI4KB ノックダウン細胞においてオートファゴソーム膜の負電荷量および STX17 のオートファゴソームへの局在が減少した。従って、オートファゴソームの負電荷量の増加は

STX17 のオートファゴソームへの局在に必要であることが示唆された。

6. PI4KB ノックダウン細胞における STX17 のオートファゴソームへの局在障害がオートファジーに影響を与えるかどうか検証した。本研究室で開発されたオートファジー活性評価プローブを用いて評価すると、PI4KB ノックダウン細胞はオートファジー不全であることが示された。

以上、本論文は哺乳類細胞において、STX17 の局在解析およびオートファゴソーム膜の性質の解析から、STX17 の C 末端領域の正電荷アミノ酸とオートファゴソーム膜が経時的に膜の負電荷量を増加による静電的な相互作用によりタンパク質の局在が制御されうることを明らかにした。本研究はこれまで未知であったオートファゴソームの成熟過程における膜動態の変化を明らかにした。さらに膜の電荷的性質がタンパク質の時空間的な局在制御を担うことが示唆された。本研究は、オルガネラの経時的な膜性質及び機能の変化の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。