

# 審査の結果の要旨

氏名 小島 和華

小島和華(以降は論文提出者と記載)の作成した本論文は主に3つのパートより構成されており、まず新規オートファジー関連因子 WIPIAP1、WIPIAP2 の同定について、次に WIPIAP1 と WIPIAP2 の関連性について、最後にオートファジーカスケードにおける WIPIAP 複合体の動態解析について、報告されている。

**WIPIAP1、WIPIAP2 の同定:**論文提出者は、新規オートファジー関連因子をスクリーニングするという目的のもと、オートファジー関連因子である DFCEP1 と WIPI1 に FLAG タグを融合し、FLAG-DFCEP1 または FLAG-WIPI1 を安定発現する HeLa 細胞株を作製した。これらの形質転換 HeLa 細胞に、マイトファジー誘導処理としてバリノマイシンを添加し、3 時間後に細胞をパラフォルムアルデヒド固定し、FLAG タグで免疫沈降したサンプルを質量分析にかけ、結合タンパク質を解析している。通常時とマイトファジー誘導時の結合量比を算出して結合因子を順位付けて、上位の因子群の中から機能未知なものを中心に 48 因子が一次候補としてピックアップされた。論文提出者はそれら一次候補因子を全てクローニングして、マイトファジー誘導時に損傷ミトコンドリア周辺へ蓄積するかどうかを顕微鏡観察により確認し(二次スクリーニング)、最終的にオートファジーとの関連が未報告の2つの因子を同定している。FLAG-WIPI1 の免疫沈降により同定されたため、同定された2因子は WIPIAP1/2 (WIPIAP: WIPI1-associated protein)と命名された。論文提出者は、通常条件下における WIPIAP1 及び WIPIAP2 の細胞内局在を確認し、これらは細胞質に局在するが、マイトファジー誘導時には損傷ミトコンドリア周辺に集積し、ドットやカップ状の形をした輝点として観察されることを示した。

**WIPIAP1 と WIPIAP2 の関連性:** WIPIAP1 と WIPIAP2 は FLAG-WIPI1 の免疫沈降により独立に同定された因子であり、アミノ酸配列レベルの相同性は観察されない。しかし、第一章の免疫染色データにあるように、両者を細胞内に共発現させると、非常に高い割合で共局在した。そこで、論文提出者は両者の相互作用を調べる目的で、Fluoppi (Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions) アッセイを行なった。この評価系は、オリゴマー形成能のあるタグを利用することで、タンパク質間相互作用を生細胞内で蛍光観察する手法である。その結果、マイトファジー誘導の有無に関わらず WIPIAP1 と WIPIAP2 が相互作用していることが明らかになった。両者の結合は免疫沈降実験によっても確認された。さらに両者の結合を裏付けるデータとして、論文提出者は CRISPR/Cas9 法により内在性 WIPIAP1 または WIPIAP2 の欠損細胞株を作製し、それぞれの細胞内にタグ付きの WIPIAP2 または WIPIAP1 を発現させて挙動を観察した。重要なことに、内在性 WIPIAP1 の欠損下ではタグ付き WIPIAP2 の輝点が消失し、逆に WIPIAP2 の欠損下ではタグ付き WIPIAP1 の輝点が消失した。これらの

実験結果から、WIPIAP1 と WIPIAP2 が恒常的に結合しており、損傷ミトコンドリア周辺への蓄積は互いに依存的であることが示された。

オートファジーにおける WIPIAP 複合体の機能・動態解析: WIPIAP 複合体の解析を行なうべく、論文提出者はマイトファジー誘導条件下における WIPIAP1 の局在を既知のオートファジー因子と比較した。WIPIAP1 は LC3B や ATG16 など隔離膜に局在する因子と共局在することが示された。WIPIAP1 と LC3B や ATG16 の共局在は、マイトファジー誘導時だけでなくアミノ酸飢餓の条件においても観察されることから、論文提出者は「WIPIAP1/2 複合体は、選択的・非選択的に関わらずオートファジーカスケードにおいて生成される脂質膜に局在する」と考えた。それを裏付けるデータとして、アミノ酸飢餓に応答した WIPIAP1 の輝点は、オートファジー開始初期に働く ATG13 の欠損細胞においてほぼ消失し、逆に隔離膜伸長とオートファゴソームの完成に関与する ATG5 の欠損細胞では蓄積した。また、WIPIAP1 の生化学的な性質に迫るべく *in silico* 解析を行なったところ、ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) との結合が示唆された。そこで論文提出者が PI3 キナーゼの阻害剤であるウォルトマニンで細胞を処理したところ、WIPIAP1 の輝点形成は完全に阻害された。これらの結果から、論文提出者は「WIPIAP 複合体は隔離膜上で PIP が生成された後からオートファゴソーム完成前までのステップにおいて、PIP と結合することによって隔離膜へリクルートされる」と考えた。

なお、第1部は徳島大学の小迫英尊博士との共同研究であり、第3部は産業技術総合研究所の今井賢一郎博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断される。実際、小迫英尊博士と今井賢一郎博士からも博士論文提出の承認をいただいている。

よって本論文は博士(科学)の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1830 字