OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Study of the mechanisms of autophagy against bacteria : parallel recruitment of LC3 lipidation system and other Atg proteins
Author(s)	蔭山, 俊
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58515
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏名	蔭山（かげやま）　俊（しゅん）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　２４６８４　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	Study of the mechanisms of autophagy against bacteria: parallel recruitment of LC3 lipidation system and other Atg proteins （バクテリアに対するオートファジーのメカニズムの解析: 他のAtgタンパク質とは独立したLC3の局在化）
論文審査委員	（主査） 教　授　吉森　保 （副査） 教　授　平岡　泰　　教　授　目加田英輔

論文内容の要旨

オートファジーは細胞内成分をリソソームへと運び分解する機構として知られており、その細胞内成分の隔離はオートファゴソームと呼ばれる二重膜の構造体により行われる。これまでの解析によりオートファゴソームの形成に必須な18個のオートファジー関連 (Autophagy-related; Atg) 遺伝子が同定されており、これらのAtgタンパク質がオートファゴソーム形成の場へ連続的にリクルートされることがオートファゴソーム形成に重要であると考えられている。その中でもLC3はオートファゴソームのマーカータンパク質として広く用いられている。オートファジーは栄養飢餓時に細胞質成分を分解しアミノ酸やエネルギーを確保する機構として知られてきたが、近年傷ついたオルガネラの除去や細胞死、個体発生や癌抑制など様々な生理学的・病理学的な現象に関連していることが報告されてきた。細胞内に侵入した病原性微生物の増殖の抑制も、オートファジーの機能の重要な一つである。オートファジーにより細胞内での増殖を抑制されているバクテリアの一つとしてサルモネラが知られている。サルモネラは腸内細菌の一種で、感染すると食中毒などを引き起こす。これまでに、エンドサイトーシス経路にて細胞内に侵入したサルモネラの一部がLC3により包まれている事、またオートファジー不全細胞では細胞内のサルモネラの増殖が促進する事が報告されているが、そのメカニズムははっきりしていない。そこで私はバクテリアに対するオートファジーのより詳細な分子メカニズムを解明することを目的として、サルモネラ感染時におけるAtgタンパク質群の動態をイメージングにより解析した。

飢餓誘導性オートファジーに欠損が見られるAtg3、Atg5、Atg7、Atg9L1およびFIP200のノックアウト（KO）のマウス胎児繊維芽細胞でのバクテリアの増殖を調べた結果、これら全てのKOの細胞で野生型の細胞よりもサルモネラの増殖の促進が観察された。この結果はこれら全てのAtgタンパク質がバクテリアオートファジーにも必須である事を示している。飢餓誘導性オートファジーにおいてこれらのKOの細胞ではLC3のオートファゴソームへの局在が消失していることが知られていることより、次にこれらの細胞でのLC3の局在を調べた。Atg3、Atg5およびAtg7のKOの細胞においては飢餓誘導性オートファジーと同様LC3のサルモネラへの局在は観察されなかった。しかしながらAtg9L1およびFIP200のKOの細胞ではLC3がサルモネラを包み込んでいる像が観察された。この結果は、LC3局在化はAtg9L1およびFIP200とは独立していることを示唆している。加えて、バクテリアオートファジーにおけるLC3の局在化は、飢餓誘導性オートファジーに必須なフォスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K)のインヒビターであるワルトマニンで処理しても消失しなかったことより、PI3Kにも非依存的

であることを見いだした。これらの結果より、バクテリアオートファジーにおいてこれまで知られていないLC3の膜へのターゲティングのメカニズムが存在する事が示唆される。また、Atg9L1とFIP200の KOの細胞においてサルモネラはLC3に包まれているにも関わらず細胞内での増殖が促進していることより、次に電子顕微鏡を用いてサルモネラを包み込んでいるLC3の膜の形態を観察した。その結果、野生型の細胞ではサルモネラの周りには一重のエンドソーム膜とオートファゴソーム様の二重膜構造体が確認できたのに対し、Atg9L1およびFIP200のKOの細胞ではサルモネラはLC3に包まれているにもかかわらずエンドソームの一重膜しか確認されなかった。よって、Atg9L1とFIP200のKOの細胞では、LC3はオートファゴソームではなくエンドソームへとリクルートされていると考えられる。この結果はオートファゴソームの形成にはAtg9L1とFIP200が必須であること、またLC3がエンドソームへもリクルートされうることを示唆している。これまでオートファゴソームは一連の連続的なAtgタンパク質の局在化により形成されていると考えられていたが、本研究により、バクテリアに対する場合、その形成は複数の独立したAtgタンパク質の局在化により成り立っている事が新たに示唆された。この結果は、未だ不明な部分が多いオートファゴソーム形成の解明に貢献するものと期待される。

論文審査の結果の要旨

細胞内分解系オートファジーは、飢餓時の栄養源確保や侵入病原体の隔離・除去などの生体防御機能を持つ。オートファジーを担う膜構造であるオートファゴソーム（AP）は、Atg（Autophagy-related）と呼ばれる一群のタンパク質により構成される6つの機能的ユニットがオートファゴソームの形成の場に集積する事により形成される。本研究において申請者は、バクテリアを捕獲するオートファゴソーム形成時のこれらのユニットの動態については未だ報告がないことに着目し、バクテリアに対するオートファジーではこれまで知られていたオートファゴソーム形成の知見とは異なり、ユニットが３つのグループに分かれ、各々独立に標的バクテリアにリクルートされ、そのうち２つがオートファゴソーム膜形成に必要であることを明らかにした。実験は注意深く行われ、論理的な推論に基づき、新たなオートファゴソーム形成メカニズムのモデルを提出するに至った。これにより、不明な部分の多いオートファジーの分子機構の理解を進め、細胞生物学に重要かつ独自の貢献を為した。よって本論文は、学位の授与に値するものと認める。