

別記様式第 11 号(第 16 条関係)

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	黒川 夕奈
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 浅野 淳
	副査 山口 大学 教授 日下部 健
	副査 鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副査 鹿児島大学 准教授 宇野 泰広
	副査 鹿児島大学 准教授 藤本 佳万
審査協力者	鹿児島大学 教授 藤田 秋一
題 目	急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法を用いた生体膜におけるホスファチジルイノシトール4リン酸 (PI4P) の局在解析に関する研究
<p>審査の要旨:</p> <p>申請者の黒川夕奈氏は、免疫電子顕微鏡法の一つである急速凍結・凍結割断レプリカ標識法 (QF-FRL法) を用いて、哺乳類培養細胞および出芽酵母のオートファジー (自食作用) および細胞膜におけるイノシトールリン脂質の一つであるイノシトール4リン酸 (PI4P) の役割について、以下の第1章、第2章、第3章および第4章の研究を行った。</p> <p>第1章: 哺乳類培養細胞のオートファジーにおけるPI4Pの役割解明 マクロオートファジーでは、二重膜構造であるオートファゴソームが形成され、細胞質の一部を取り囲みリソソームと融合することにより細胞質内の種々の物質が分解される。哺乳類培養細胞のHuh7細胞ではPI4Pがオートファゴソーム膜に局在し、さらに細胞質側のリーフレット (内葉) には局在するが、管腔側のリーフレット (外葉) には局在しないことを世界に先駆けて発見した。さらにPI4Pは後期のオートファゴソーム膜に選択的に局在することも明らかにした。</p> <p>第2章: 出芽酵母のオートファジーにおけるPI4Pの役割解明 酵母細胞のオートファゴソームにおいてPI4P局在を解析したところ、哺乳類細胞とは異なり外葉に局在した。つまり、真核生物間で保存されていると考えられてきたオートファジー経路に、何らかの差異があることが示された。さらに、PI4Pの再生に関与するPik1p、Stt4pの温度感受性株を用いた実験によって、Pik1pはオートファゴソームの形成に、Stt4pはオートファゴソームとリソソーム (液胞) との融合に働くことが示唆された。</p> <p>第3章: ミクロオートファジーにおけるPI4Pの役割解明 ミクロオートファジーは、リソソーム/液胞膜が陥入し、直接基質を取り込み消化する経路である。酵母細胞のミクロオートファジーにおいて、PI4Pは液胞内ミクロオートファジー小胞の内葉に局在し、マクロオートファジーとは真逆の局在であった。さらに、Pik1p、Stt4pそれぞれの不活性化条件ではミクロオートファジーが抑制され、Pik1p、Stt4pは両方ミクロオートファジーに重要な役</p>	

割を担うことを明らかにした。

第4章：出芽酵母の細胞膜におけるPI4Pの役割解明

QF-FRL法を用いたPI4P、PI(4,5)P₂微細局在解析を行い、以下の結果が得られた。(1)PI4PおよびPI(4,5)P₂は細胞膜の内膜に局在した。しかし、PI(4,5)P₂分布はPI4P分布とは異なり、潜状構造に集中した。(2)Pik1p、Stt4pそれぞれの不活化条件において、PI4P局在は失われた。つまり、細胞膜PI4Pの生成には、Stt4pだけでなくPik1pも寄与することが分かった。(3)PI(4,5)P₂局在は野生型酵母と同等であり、Pik1p、Stt4p両方の不活化条件でのみPI(4,5)P₂局在が失われた。したがって、PI(4,5)P₂レベルの維持のため、Pik1p、Stt4p両方によるPI4P生成が必要であることを解明した。