

令和 元年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0253

研究課題名（和文）ミトコンドリアオートファジーの分子機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Molecular mechanism of mitochondria autophagy(Fostering Joint International Research)

研究代表者

神吉 智丈（KANKI, TOMOTAKE）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50398088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間：7ヶ月

研究成果の概要（和文）：マイトファジーは、オートファジーによりミトコンドリアが選択的に分解される現象である。酵母では、マイトファジー誘導により、ミトコンドリアレセプターであるAtg32がCK2によりリン酸化され、次いで、Atg32がAtg11と結合し、ミトコンドリアが隔離膜に取り込まれる。CK2は恒常的に活性のあるキナーゼであるため、Atg32のリン酸化には、他にも制御機構があると考えられた。我々は、PP2A-like phosphataseであるPpg1がAtg32を脱リン酸化していること、それがFar複合体と結合して働いていることを見いだした。Ppg1とFar複合体は、マイトファジーに抑制的に働くと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイトファジーは、オートファジーが選択的にミトコンドリアを分解する現象であり、ミトコンドリアの恒常性維持にも重要な役割を持っていると考えられている。このため、ミトコンドリアが関与する種々の疾患や老化現象を理解するためにも、マイトファジーの理解は重要である。本研究では、酵母におけるマイトファジーを負に制御する機構を世界に先駆けて解明した。こうした研究を哺乳類にまで発展させることができれば、ミトコンドリア関連疾患や老化に対する予防・治療法の開発などに結びついていくと期待される。

研究成果の概要（英文）：Mitophagy plays an important role in mitochondrial quality control. In yeast, phosphorylation of the mitophagy receptor Atg32 by CK2 upon induction of mitophagy is a prerequisite for interaction of Atg32 with Atg11 and following delivery of mitochondria to the vacuole for degradation. Because CK2 is constitutively active, Atg32 phosphorylation must be precisely regulated to prevent unrequired mitophagy. We found that the PP2A (protein phosphatase 2A)-like protein phosphatase Ppg1 was essential for dephosphorylation of Atg32 and thus inhibited mitophagy. We identified the Far complex consisting of Far3-7-8-9-10-11 proteins as Ppg1-binding proteins. Deletion of Ppg1 or Far proteins accelerated mitophagy. Therefore, Ppg1 and the Far complex cooperatively dephosphorylate Atg32 to prevent excessive mitophagy.

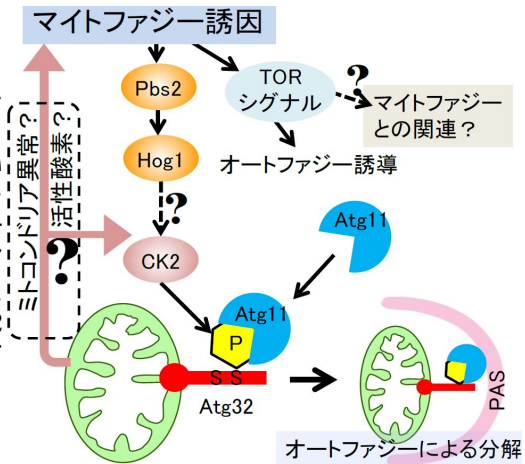
研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー ミトコンドリア 酵母 Atg32

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアオートファジー（以下、ミトファジーと略す）は、オートファジーが選択的にミトコンドリアを分解する現象であり、細胞内の余剰なミトコンドリアや機能低下に陥ったミトコンドリアを分解除去することでミトコンドリア品質管理を行っていると考えられている。我々は、出芽酵母において、ミトファジー必須因子である Atg32 の発見を含む、ミトファジー分子機構を解明してきた。その結果、ミトファジー誘導には、ミトコンドリア外膜タンパク質 Atg32 のリン酸化が必須であることさらにリン酸化は、細胞質の Casein Kinase 2 (CK2) によるものであることなどを明らかにしていた。しかしながら、CK2 はコピキタスに存在し、恒常的に活性のあるキナーゼであることから、ミトファジー誘導時にもみ Atg32 がリン酸化を受けるメカニズムについては全く解明されていなかった。また、活性酸素やミトコンドリア障害など、ミトファジーを誘導すると考えられている状況下で、どのようなシグナルが働いて Atg32 のリン酸化を起こしているのか、そのシグナル経路についても不明であった(左図参照)。このように、出芽酵母のミトファジーの分子機構には、未だに不明な点が多く残されている。



2. 研究の目的

前述のような背景から、本研究課題では、Atg32 のリン酸化制御機構を含め、出芽酵母におけるミトコンドリアオートファジーの分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

これまでに、我々を含む 2 つの研究グループから、ミトファジー関連因子のスクリーニング研究が報告されているが、これらのスクリーニングで同定された因子だけでは、ミトファジーの分子機構は説明できない。このため、新たな視点から、ミトファジー関連因子の同定が必要である。具体的には、以下の研究を行う。

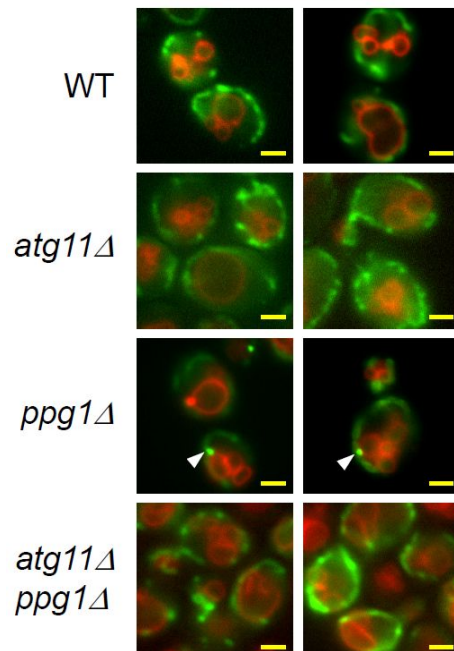
1. 生育に必須なため破壊株が作製不可能な致死遺伝子のミトファジーにおける役割は、ほとんど理解されていない。ミトファジー分子機構の未解明な点は、非致死遺伝子のスクリーニングで得られたミトファジー因子では説明できないため、致死遺伝子に重要なミトファジー因子が含まれる可能性があると考えられる。致死遺伝子の温度感受性株を用いてミトファジーに必要な因子をスクリーニングする。
2. ミトファジー誘導時に Atg32 がミトコンドリアで一カ所に集積する。この表現型を指標に、ミトファジー関連遺伝子をスクリーニングする。
3. 1, 2 の方法で得られたミトファジー関連因子の機能解析を行い、ミトファジーの分子機構を解明する。

4. 研究成果

ミトファジー制御因子のスクリーニング

温度感受性株を用いたスクリーニングは、それぞれの温度感受性株の発育速度に差があるなどの理由から、実験を進めるのが難しく、想定した成果を得ることができなかった。一方、Atg32 が一カ所に集積する現象は、GFP-Atg32 を発現させた細胞を用いることで容易に検出できたため、スクリーニングも可能であった。この方法で特に Protein Phosphatase を中心にスクリーニングを実施したところ、PP2A ファミリーの Protein Phosphatase である *PPG1* の破壊株では、GFP-Atg32 の集積が、ミトファジー誘導刺激の無い状況でも起こっていることが明らかとなった(左図)。また、*ppg1* 破壊株では、ミトファジー非誘導時でも Atg32 が絶えずリン酸化されて状態で保たれていた。このことから、Ppg1 は Atg32 を脱リン酸化することによりミトファジー誘導制御に関わっている可能性が示唆された。Atg32 のリン酸化は、Atg32-Atg11 結合にも必要であることから、免疫沈降法を用いてこの結合を確認したところ、*ppg1* 破壊株では、ミトファジー非誘導時でも Atg32-Atg11 結合が見られることが明らかとなった。

GFP-Atg32 / FM4-64
(Growing)



さらに、*ppg1* 破壊株では Atg32 が恒常的にリン酸化されているため、マイトファジーが亢進していた。こうしたことから、Ppg1 は Atg32 を脱リン酸化することでマイトファジーを負に制御していることが明らかとなった。

マイトファジー誘導には、Atg32 のリン酸化と Atg1 複合体の活性化が必要十分条件である

Ppg1 破壊株では、Atg32 が絶えずリン酸化されているにもかかわらず、マイトファジーは起こらない。これは、Atg32 のリン酸化だけでは Atg1 複合体の活性化を引き金とした隔離膜形成が起こらないことが原因であると考えられた。Atg1 複合体を活性化するために、活性型 Atg13 (8 カ所のリン酸化を受けるセリン残基をアラニンに置換した変異体) を発現させたところ、マイトファジーを誘導する刺激を与えなくても *ppg1* 破壊株ではマイトファジーが誘導された。このことは、Atg32 のリン酸化と Atg1 複合体の活性化の 2 条件がマイトファジー誘導の必要十分条件であることを意味する。

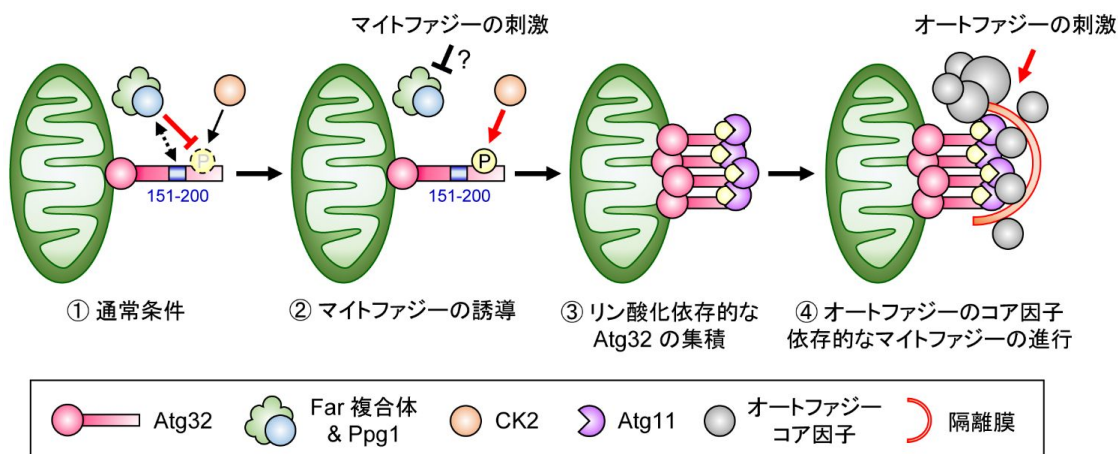
Far 複合体が Ppg1 に結合して Atg32 の脱リン酸化に働いている

Ppg1 に結合する因子をプロテオミクスの手法を用いて解析したところ、Far8 が同定された。Far8 は Far タンパク質複合体を形成している因子であり、Far8 以外に Far3、Far7、Far9、Far10、Far11 から成り立っている。これらの因子の Far10 以外のどの因子を破壊しても *Ppg1* による Atg32 の脱リン酸化は大きく抑制されることから、*Ppg1* は Far 複合体と結合することで、Atg32 の脱リン酸化に働いていると考えられた。

Atg32 の 151-200 番目のアミノ酸残基が Atg32 の脱リン酸化に必要である

Atg32 の 151-200 番目のアミノ酸残基が欠損した Atg32 変異体は、マイトファジー誘導刺激が無くても Atg32 の集積を認め、この変異体はマイトファジー活性の亢進を認めた。これらのことから、Atg32 の 151-200 番目のアミノ酸残基を介意して *Ppg1*-Far 複合体が Atg32 を脱リン酸化していると推測された。

～ の研究成果から、下図に示すようなマイトファジー制御機構を提唱した。



5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Furukawa K, Kanki T. PP2A-like protein phosphatase Ppg1: an emerging negative regulator of mitophagy in yeast. *Autophagy*. 2018;14(12):2171-2172.
doi: 10.1080/15548627.2018.1511505.

Furukawa K, Fukuda T, Yamashita SI, Saigusa T, Kurihara Y, Yoshida Y, Kirisako H, Nakatogawa H, Kanki T. The PP2A-like Protein Phosphatase Ppg1 and the Far Complex Cooperatively Counteract CK2-Mediated Phosphorylation of Atg32 to Inhibit Mitophagy. *Cell Rep*. 2018;23(12):3579-3590.
doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.064.

Yamashita SI, Kanki T. Detection of Iron Depletion- and Hypoxia-Induced Mitophagy in Mammalian Cells. *Methods Mol Biol*. 2018;1782:315-324.
doi: 10.1007/978-1-4939-7831-1_18.

Kondo A, Mostofa MG, Miyake K, Terasawa M, Nafisa I, Yeasmin AMST, Waliullah TM, Kanki T, Ushimaru T. Cdc14 Phosphatase Promotes TORC1-Regulated Autophagy in Yeast. *J Mol Biol*. 2018;430(11):1671-1684.
doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.007.

Fukuda T, Kanki T. Mechanisms and Physiological Roles of Mitophagy in Yeast. *Mol Cells*. 2018;41(1):35-44.
doi: 10.14348/molcells.2018.2214.

Yamashita SI, Kanki T. How autophagy eats large mitochondria: Autophagosome formation

coupled with mitochondrial fragmentation. Autophagy. 2017;13(5):980-981.
doi: 10.1080/15548627.2017.1291113.

Yamashita SI, Kanki T. Detection of Hypoxia-Induced and Iron Depletion-Induced Mitophagy in Mammalian Cells. Methods Mol Biol. 2018;1759:141-149.
doi: 10.1007/7651_2017_19.

〔学会発表〕(計 4 件)

山下俊一、神吉智丈、環境温度変化に応答した脂肪組織におけるミトコンドリア分解、BIOTHERMOLOGY WORKSHOP、2017

古川健太郎、神吉智丈、ミトコンドリアオートファジーの制御機構、第 51 回酵母遺伝学フォーラム、2017

神吉智丈、出芽酵母におけるミトコンドリア オートファジーの分子機構、日本植物学会第 81 回大会、2017

神吉智丈、ミトコンドリア分解を制御するリン酸化、ConBio2017(2017 年度 生命科学系学会合同年次大会)、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：Daniel Klionsky

ローマ字氏名：Daniel Klionsky

所属研究機関名：University of Michigan

部局名：Life Sciences Institute

職名：教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。