

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03671

研究課題名(和文)オートファジーによるミトコンドリア選択・分解機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of mitochondrial selection by mitophagy machinery

研究代表者

神吉 智丈(Tomotake, Kanki)

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母および哺乳類細胞を用いてオートファジーの分子機構の解明を試みた。出芽酵母では、ホスファターゼPpg1とFar複合体がオートファジーレセプターAtg32のリン酸化を抑制し、オートファジーの負の制御を行っていることを解明した。哺乳類では、抗がん剤Gemcitabineがオートファジーを誘導することを見だし、Gemcitabineによる誘導にはPINK1とMUL1が関わっていることを解明した。さらに、OptineurinはParkin依存的オートファジーのアダプター因子であるが、緑内障の原因となるOptineurin変異は、オートファジーに影響しないことを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは、細胞の活動に必要なATPの大部分を産生するオルガネラであり、その量や機能の維持は生命活動に非常に重要である。オートファジーは、細胞内の不要な、もしくは余剰なミトコンドリアを適切に分解することにより、ミトコンドリア恒常性維持を行う重要な機構であるが、その分子機構は不明な点が多い。本研究では、出芽酵母、哺乳類と複数の生物種を用いてオートファジーの研究を行い、その分子機構の一端を解明した。これらの研究成果は、将来、ミトコンドリア機能低下が関わる種々の疾患や老化現象の治療法、予防法の開発に結びつくと考えられ、学術的にも社会的にも重要である。

研究成果の概要(英文)：Mitophagy plays an important role in mitochondrial quality control. We identified that the PP2A (protein phosphatase 2A)-like protein phosphatase Ppg1 was essential for dephosphorylation of mitophagy receptor Atg32 and thus inhibited mitophagy in yeast. We identified the Far complex consisting of Far3-7-8-9-10-11 proteins as Ppg1-binding proteins and Far proteins also essential for dephosphorylation of Atg32. From these findings, we concluded that Ppg1 and the Far complex cooperatively dephosphorylate Atg32 to prevent excessive mitophagy. Using mammalian culture cells, we found that the anticancer drug gemcitabine induces mitophagy. Notably, the PINK1 and MUL1, but not Parkin have important role in mitophagy induced by gemcitabine. We also identified that Glaucoma-mutant OPTN proteins retain their normal properties as mitophagy receptors, suggesting that mutations in the OPTN gene cause glaucoma through a mechanism independent of mitophagy defects.

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 マイトファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、細胞の活動に必要な ATP の大半を産生する重要なオルガネラであるが、同時に自身が産生する活性酸素により酸化傷害を受けやすい。このため、ミトコンドリアの量と品質は適切に維持されている必要がある。オートファジーによる選択的なミトコンドリア分解機構(ミトコンドリアオートファジー:以下「マイトファジー」と略す)は、余剰あるいは異常なミトコンドリアをオートファジーにより分解することで、ミトコンドリア恒常性維持に寄与する現象であるが、その分子機構・生理的意義ともに未解明な点が多い。

最近の研究から、マイトファジーとパーキンソン病との関連も示唆されるようになり、ミトコンドリア異常で発症する疾患におけるマイトファジーの分子機構や生理的意義の正確な理解の必要性が高まっている。

出芽酵母では、マイトファジー誘導時に Casein Kinase 2 がミトコンドリア外膜タンパク質でマイトファジーレセプターとして働く Atg32 の 114 番目と 119 番目のセリン残基をリン酸化し、リン酸化された Atg32 が Atg11 と特異的に結合する。Atg11 は隔離膜形成の場である PAS に局在するため、PAS においてミトコンドリアは選択的に隔離膜に包み込まれる。このような分子機構でミトコンドリアは分解されるが、Casein Kinase 2 は、恒常的に活性のあるキナーゼであり、Atg32 のリン酸化がどのように制御されているかについては不明であった。

哺乳類のマイトファジーは、その関連分子から Parkin 依存のマイトファジーとレセプター依存のマイトファジーに大別されているが、どのような刺激に応答してどちらのマイトファジーが誘導されるかなどは不明な点も多い。また、Parkin 依存のマイトファジーのアダプター因子である Optineurin は、その変異が正常眼圧緑内障を発症することが知られているが、緑内障とマイトファジーの関係は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、酵母、哺乳類細胞を用いた種々の実験系でマイトファジーの分子機構や生理的意義の解明を目的とする。より具体的には、以下の点の解明を推進した。

- (1) 出芽酵母におけるマイトファジー抑制機構の解明
- (2) 哺乳類細胞におけるマイトファジー誘導剤の探索とその誘導機構の解明
- (3) Optineurin 変異により発症する正常眼圧緑内障とマイトファジーとの関連解明

### 3. 研究の方法

- (1) マイトファジー誘導時に見られる Atg32 のリン酸化は、immunoblotting における分子量の増加で検出することができる。出芽酵母遺伝子破壊ライブラリーから、ホスファターゼとその関連因子の破壊株を抽出し、それらの Atg32 のリン酸化を観察し、Atg32 のリン酸化状態に変化がある破壊株を選択する。選択された株で破壊されているホスファターゼを詳細に調べることによって Atg32 のリン酸化を負に制御する機構を解明する。
- (2) 生理活性物質ライブラリー LOPAC1280 を用いて HeLa 細胞でマイトファジーを誘導することができる薬物を選抜する。選抜された薬物がマイトファジーを誘導する分子機構を明らかにする。
- (3) マイトファジーアダプターである Optineurin の変異体を Optineurin 破壊株に発現させ、マイトファジーが回復するかどうかを、正常眼圧緑内障との関係が報告されている全ての Optineurin 変異体で実験し、マイトファジー不能が緑内障の原因となりうるかどうかについて検討する。

### 4. 研究成果

- (1) 出芽酵母におけるマイトファジーの負の制御機構の解明  
Atg32 のリン酸化に影響を及ぼすホスファターゼおよび関連因子破壊株のスクリーニングを行ったところ、PP2A (protein phosphatase 2A)-like protein phosphatase Ppg1 破壊株で、マイトファジー非誘導条件でも Atg32 がリン酸化されていることが明らかとなった。また、Ppg1 破壊株でマイトファジーが亢進することから、Ppg1 は Atg32 を脱リン酸化することによりマイトファジーを負に制御していると考えられた。  
Ppg1 と結合する因子をプロテオミクスの手法で解析したところ、Far8 タンパク質が同定された。Far8 は Far3-7-8-9-10-11 で構成される Far 複合体の因子である。いずれの Far タンパク質の破壊株でも Atg32 のリン酸化がみられ、マイトファジーも亢進していることから、Ppg1 と Far 複合体が協調してマイトファジーを負に制御していると考えられた。  
今回解明した Ppg1-Far 複合体も含めたマイトファジー制御機構を図 1 に示す。

- (2) Gemcitabine により誘導されるマイトファジーの研究

Mito-Keima を発現させた HeLa 細胞を用いることで、簡便にマイトファジーを検出することが出来る。この HeLa 細胞に LOPAC1280 を作用させマイトファジー誘導を観察したところ、幾つかの抗がん剤が効率よくマイトファジーを誘導することを見いだした。同定した薬物によるマイトファジー誘導にマイトファジー因子 Parkin や PINK1 が関わっているかどうかを調べたところ、面白いことに Gemcitabine によるマイトファジー誘導には、PINK1 は必要であるが Parkin は不要であることが明らかとなった。

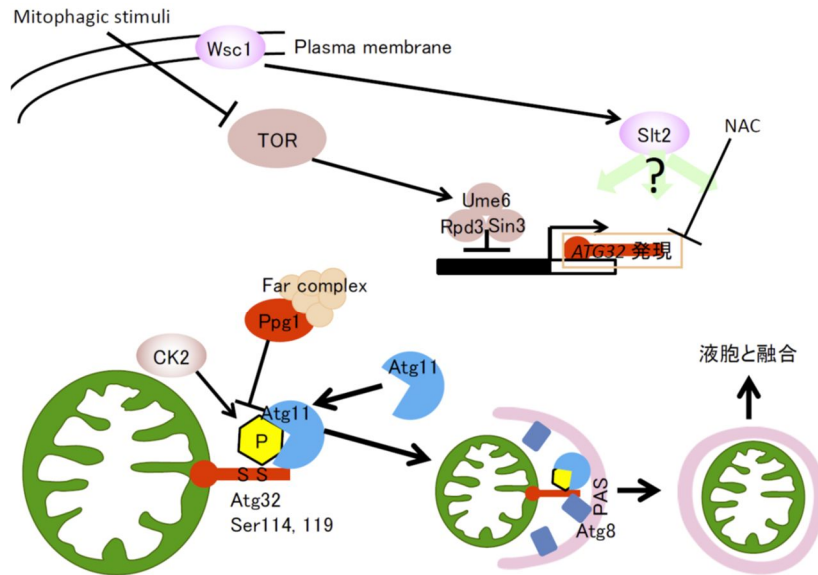


図1: 出芽酵母におけるmitophagyの分子機構

Parkin はユビキチンリガーゼであるため、ミトコンドリアに局在するユビキチンリガーゼ MUL1 が関与する可能性を考え、MUL1 破壊株で Gemcitabine により誘導されるマイトファジーを観察したところ、マイトファジーが抑制されていることが明らかとなった。しかしながら、MUL1 は Parkin のようにミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化には関わっておらず、PINK1 の安定性に必要であった。

こうしたことから、図2に示すように、MUL1 は PINK1 の上流にあり、Gemcitabine によるマイトファジー誘導時の PINK1 の安定化に関わっていること、さらに PINK1 の安定化の結果、Parkin が関与しない未解明の機構によりマイトファジーが誘導される事を解明した。

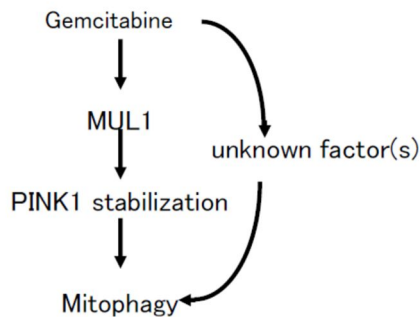


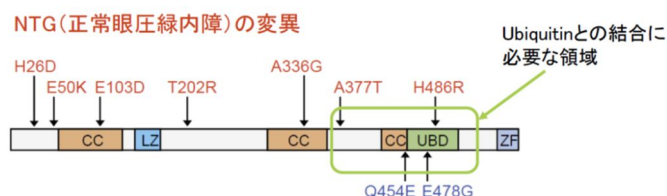
図2: Gemcitabineによる誘導機構

(3) 緑内障の原因となる Optineurin 変異はマイトファジーにはほとんど影響しない

Optineurin はマイトファジーアダプターであるが、その変異は正常眼圧緑内障や ALS の源となることが知られている。こうした変異がマイトファジーに影響を与えることが緑内障や ALS の原意となっているかどうかを調べた。まず、マイトファジーアダプターの Optineurin と NDP52 の二重破壊株を作成し、Parkin 依存的マイトファジーがほとんど起こらない株を作製した。この細胞に、図3に示すような緑内障関連 Optineurin 変異体を発現させ、マイトファジーを観察したところ、緑内障に関連する変異では、ほぼ正常にマイトファジーが誘導された。

一方で、ALS に関連する変異のうち、ユビキチン結合領域にある変異体を発現させても、マイトファジーは野生型のように回復しなかった。

こうしたことから、ALS はマイトファジー不全が病因となる可能性が否定できないが、正常眼圧緑内障は、Optineurin 変異によるマイトファジー不全が原因ではないと考えられた。



ALS(筋萎縮性側索硬化症)の変異

図3: オプチニューリン(OPTN) 遺伝子変異

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fukuda T, Kanki T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Mechanisms and Physiological Roles of Mitophagy in Yeast.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cells.	6. 最初と最後の頁 35-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14348/molcells.2018.2214.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake	4. 巻 13
2. 論文標題 How autophagy eats large mitochondria: Autophagosome formation coupled with mitochondrial fragmentation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 980 ~ 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2017.1291113	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igarashi Ryoko, Yamashita Shun-ichi, Yamashita Tomohiro, Inoue Keiichi, Fukuda Tomoyuki, Fukuchi Takeo, Kanki Tomotake	4. 巻 10
2. 論文標題 Gemcitabine induces Parkin-independent mitophagy through mitochondrial-resident E3 ligase MUL1-mediated stabilization of PINK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58315-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Kentaro, Innokentev Aleksei, Kanki Tomotake	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulatory Mechanisms of Mitochondrial Autophagy: Lessons From Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chernyshova Kseniia, Inoue Keiichi, Yamashita Shun-Ichi, Fukuchi Takeo, Kanki Tomotake	4. 巻 60
2. 論文標題 Glaucoma-Associated Mutations in the Optineurin Gene Have Limited Impact on Parkin-Dependent Mitophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3625 ~ 3625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.19-27184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Kentaro, Kanki Tomotake	4. 巻 14
2. 論文標題 PP2A-like protein phosphatase Ppg1: an emerging negative regulator of mitophagy in yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 2171 ~ 2172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2018.1511505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Yamashita Shun-ichi, Saigusa Tetsu, Kurihara Yusuke, Yoshida Yutaka, Kirisako Hiromi, Nakatogawa Hitoshi, Kanki Tomotake	4. 巻 23
2. 論文標題 The PP2A-like Protein Phosphatase Ppg1 and the Far Complex Cooperatively Counteract CK2-Mediated Phosphorylation of Atg32 to Inhibit Mitophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3579 ~ 3590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.05.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神吉智丈
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神吉智丈
2. 発表標題 ミトコンドリア分解を制御するリン酸化
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

機能制御学分野 <a href="https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/">https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考