

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06129

研究課題名(和文) 酵母におけるミトコンドリアオートファジーの制御機構と生理的意義の統合的理解

研究課題名(英文) Integrated understanding of the regulatory mechanism and physiological significance of mitochondrial autophagy in yeast

研究代表者

古川 健太郎 (Furukawa, Kentaro)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：20754493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミトファジーはミトコンドリアの恒常性維持機構であり、酵母においては、CK2によるAtg32のリン酸化がミトファジーに必須である。このリン酸化は、Ppg1とFar複合体から構成されるプロテインホスファターゼ複合体によって抑制される。本研究では、このリン酸化制御機構の解明を目的とし、Far複合体はミトコンドリアと小胞体に局在し、前者のみがミトファジーを制御すること、Ppg1はFar複合体全体の会合に必須であること、Far複合体とAtg32は直接結合し、この結合はミトファジー誘導で解除されること、Far複合体とAtg32の強制連結によってミトファジーが阻害されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトファジーを含むオルガネラの選択的分解機構は、レセプタータンパク質のリン酸化制御が重要であることが明らかになりつつあるが、関連キナーゼやホスファターゼが未同定であることが多く、詳細な制御機構は不明な点が多い。本研究では、酵母のミトファジーレセプターであるAtg32の詳細なリン酸化制御機構を解明し、この研究分野を大きく前進させる成果を得た。また、Ppg1-Far複合体は、哺乳類ではSTRIPAK複合体として知られており、その機能不全は癌や糖尿病など様々な疾患を引き起こす。本研究で得たPpg1-Far複合体に関する知見は、STRIPAK複合体の関連疾患治療の糸口となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Mitophagy plays an important role in mitochondrial homeostasis. In yeast, the phosphorylation of the mitophagy receptor Atg32 by CK2 is essential for mitophagy. This phosphorylation is counteracted by the STRIPAK complex consisting of protein phosphatase Ppg1 and Far3-7-8-9-10-11, but the underlying mechanism remains elusive. Here we show that two subpopulations of the Far complex reside in the mitochondria and ER, respectively, and play distinct roles; the former inhibits mitophagy via Atg32 dephosphorylation, and the latter regulates TORC2 signaling. Ppg1 and Far11 form a subcomplex, and Ppg1 activity is required for the assembling integrity of Ppg1-Far11-Far8. The Far complex preferentially interacts with phosphorylated Atg32, and this interaction is weakened by mitophagy induction. Furthermore, the artificial tethering of Far8 to Atg32 prevents mitophagy. Taken together, the Ppg1-mediated Far complex formation and its dissociation from Atg32 are crucial for mitophagy regulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア オートファジー ミトファジー 酵母 Atg32 Ppg1 Far複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 傷害により機能が低下したミトコンドリアの蓄積は、神経変性疾患や老化現象など様々な弊害を引き起こす。近年、オートファジーがミトコンドリアを選択的に分解する「マイトファジー」と呼ばれる現象がミトコンドリア関連疾患治療の糸口として注目されており、酵母からヒトまで多岐に渡るマイトファジーの分子機構と生理的意義の全容解明は急務である。

(2) 酵母において、飢餓ストレスや呼吸増殖後期でマイトファジーが誘導されると、マイトファジーの必須因子である Atg32 の Ser114 残基がカゼインキナーゼ 2 (CK2) によってリン酸化される。オートファジーのアダプターである Atg11 との結合依存的にリン酸化 Atg32 の集積が起こり、この集積部分が隔離膜に包まれながら分解標的として切り出され、断片化したミトコンドリアを包み込んだオートファゴソームは最終的に液胞内で分解される。

(3) CK2 は恒常的に高い活性を有するため、Atg32 のリン酸化と脱リン酸化のバランスを制御する機構の解明がマイトファジーの理解に必須である。申請者はこれまでに、Atg32 のリン酸化に対して CK2 と競合的に働くプロテインホスファターゼ Ppg1 を同定し、Ppg1 の欠損はマイトファジーの亢進を引き起こすこと、Ppg1 は様々なオートファジー経路の中でもマイトファジーを特異的に負に制御することを見出している。さらに、Ppg1 の活性調節因子と推測される Far 複合体も同定したが、その制御機構は未解明である。

(4) 分解標的となるミトコンドリアが切り離される分子機構や標的内容物 (ミトコンドリア DNA の変異や異常タンパク質の蓄積の有無など) に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) マイトファジー誘導時における Ppg1 の制御機構の解明:

CK2 は恒常的に高い活性を有すること、Ppg1 を欠損すると CK2 依存的に Atg32 が恒常的にリン酸化されること、Ppg1 過剰発現株でも野生株と同等のマイトファジーが起こることから、マイトファジー誘導に応答して Ppg1 の機能を抑制する制御機構が存在すると推測される。本研究では、Ppg1 と相互作用する因子に着目し、マイトファジー誘導時の Ppg1 の制御機構とそれを司るシグナル経路を解明する。

(2) Atg32 集積部位でのミトコンドリア分裂機構と生理的意義の解明:

マイトファジー誘導後、CK2 によってリン酸化された Atg32 に選択的オートファジーのアダプタータンパク質である Atg11 が結合し、Atg11 依存的に Atg32 が大きなミトコンドリア上の一部に集積する。この集積部位が分解標的となり、隔離膜の伸長と共に小さな断片 (マイトファゴソーム) として切り離されることが申請者らの過去の研究で示されているが、その詳細は明らかではない。本研究では、Atg32 集積部位からミトコンドリアの一部が分裂する機構及び分解標的となるミトコンドリアの内容物の解析に基づくマイトファジーの生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) マイトファジー誘導時における Ppg1 の制御機構の解明:

Ppg1 の共免疫沈降産物の質量分析で同定された Far 複合体 (Far3-7-8-9-10-11) 構成因子のいずれかを欠損させると、Ppg1 欠損株と同様に Atg32 の恒常的なリン酸化が見られることから (Furukawa *et al.*, *Cell Rep*, 2018)、Ppg1 と Far 複合体の結合が Ppg1 の機能に重要であると推測される。FLAG-His6 タグを融合した Ppg1 および HA タグを融合した Far 複合体因子を酵母内で共発現させ、マイトファジーの誘導前後で Ppg1 と Far 複合体の結合と解離の状態について免疫沈降法を用いて調べる。また、Ppg1 と Far 複合体の細胞内局在について蛍光タンパク質融合体を用いて調べ、その共局在や局在変化について明らかにする。

(2) Atg32 集積部位でのミトコンドリア分裂機構と生理的意義の解明:

マイトファジー不能株のゲノムワイドな探索により、Atg32 の集積は可能だが、それ以降の分裂が進行しない変異株 (AtgX 欠損株) を取得している。AtgX は非常に小さなミトコンドリア局在タンパク質であるため、単独でミトコンドリアの分裂に寄与するのではなく、複数の因子と協調的に機能すると推測した。そこで、FLAG 抗体を用いた AtgX-FLAG との共免疫沈降産物の質量分析によって、AtgX のパートナー候補を探索する。候補の絞り込みは、その欠損株が Atg43 欠損株と同様の表現型であることを指標とする。野生株および AtgX 欠損株において、抗 Atg32 抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析によってマイトファジー誘導時のミトコンドリアの形態学的解析を行い、Atg32 集積部分における分裂のための必須な構造的要素を明らかにする。特に、ミトコンドリアの外膜と内膜の厚さやクリステの構造に注視する。

4. 研究成果

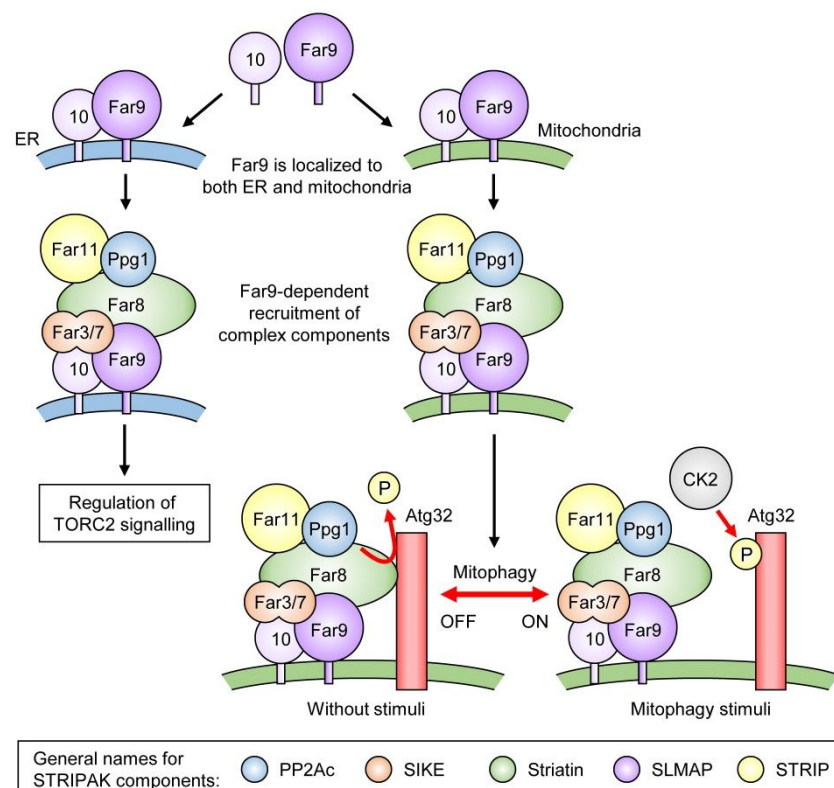
(1) マイトファジー誘導時における Ppg1 の制御機構の解明:

過去の報告では、Far 複合体は小胞体に局在すると考えられていたため、ミトコンドリアに局在する Atg32 の脱リン酸化が Far 複合体によってどのように制御されるのかという疑問が残っていた。Far 複合体因子に GFP を融合させ、蛍光顕微鏡を用いた詳細な局在解析を行ったところ、Far 複合体は小胞体だけではなくミトコンドリアにも局在していること、その局在に Far9 と Far10 のテイルアンカードメインが重要であることが分かった。次に、小胞体あるいはミトコンドリアの一方にのみ局在するように Far9 のテイルアンカードメインを遺伝子改変し、局在パターンと機能の違いを調べた。その結果、ミトコンドリア型 Far 複合体はマイトファジーの制御に関与し、小胞体型 Far 複合体は TORC2 栄養シグナル伝達経路の制御に関与するという局在による機能の使い分けをしていることが明らかとなった。

Far 複合体構成因子をすべて欠損させた酵母に、各 Far 因子を一つずつ戻し、免疫沈降法を用いて Ppg1 と優先的に結合する Far 因子を調べた。その結果、Ppg1 と Far11 は他の Far 因子非依存的にサブ複合体を形成し、Far8 を中心とする Far 複合体本体 (Far3-7-8-9-10) へと結合することが分かった。また、サブ複合体と本体の結合には Ppg1 の活性自体が必須であり、Ppg1 は Atg32 の脱リン酸化だけではなく、Far 複合体全体の会合にも重要な役割を果たすことが明らかとなった。

本研究の開始当初は、マイトファジーの誘導条件下では Ppg1 と Far 複合体の結合状態が崩れることによって Atg32 の脱リン酸化ができなくなり、その結果として CK2 による Atg32 のリン酸化が促進されると予想していた。しかしながら、予想に反し、Ppg1 と Far 複合体の結合状態、Far 因子間の結合状態、Far 複合体の局在などはマイトファジー誘導時にも変化しなかったことから、他の要因が考えられた。さらなる解析を進めた結果、Far 複合体の中でも Far8 が Atg32 と直接結合すること、マイトファジーの誘導条件下では Far8 と Atg32 の解離が起こることを見出した。さらに、Far8 と Atg32 を強制的に繋いだ変異体では、Atg32 のリン酸化やマイトファジーが強く抑制されたことから、Far 複合体が Atg32 から解離することがマイトファジー制御の鍵であるという結論に至った。

以下に、本研究結果に基づく Atg32 のリン酸化制御機構のモデル図を示す。マイトファジーの誘導条件下において、Far 複合体と Atg32 の結合は未解明のシグナルによって阻害されると推測される。今後は、このシグナルの正体と詳細な分子機構を明らかにすることでマイトファジーの制御機構の全容解明を目指す。



(2) Atg32 集積部位でのミトコンドリア分裂機構と生理的意義の解明:

AtgX 欠損株は、オートファジーの中でもマイトファジーにのみ欠陥を示し、バルクオートファジー、ペキソファジー、ERphagy、Cvt 経路に欠陥は見られなかったことから、AtgX はマイトファジー特異的な因子であると考えられた。

抗 AtgX 抗体を作製し、ウェスタンブロット解析によってミトコンドリア画分に対して特異的に AtgX のバンドが検出されたことから、AtgX はミトコンドリアタンパク質であることを確認した。AtgX-GFP の局在観察からも同様の結果を得た。

透過型電子顕微鏡を用いた解析の結果、AtgX 欠損株は肥大化したミトコンドリアを有する、即ちミトコンドリアの分裂に異常があることが分かった。逆に、AtgX を過剰発現させると、ミトコンドリアの分裂が生じたことから、AtgX はミトコンドリアの分裂因子であることが示唆された。

出芽酵母 *S. cerevisiae* の近縁種である分裂酵母 (*S. pombe*) やメタノール資化性酵母 (*P. pastoris*) も AtgX オルソログを有し、AtgX 欠損株のマイトファジー不能を相補可能であったことから、AtgX は生物種を超えて保存されていることが明らかとなった。

AtgX-FLAG との共免疫沈降産物の質量分析を行ったが、コントロールと比べて特異的なタンパク質は同定されなかった。この結果から、AtgX は特定のパートナー因子を持たず、単独でミトコンドリア分裂に関与する可能性が示唆されたが、更なる検証が必要である。

AtgX 欠損株においてマイトファジーを誘導すると、ミトコンドリア上の Atg32 が集積する部位に突起が生じること、この突起形成はオートファゴソーム形成因子に依存することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Furukawa K, Innokentev A, Kanki T.	4. 巻 17(4)
2. 論文標題 Mitophagy regulation mediated by the Far complex in yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1042-1043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2021.1885184	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 Innokentev A (equal contribution), Furukawa K (equal contribution), Fukuda T, Saigusa T, Inoue K, Yamashita SI, Kanki T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Association and dissociation between the mitochondrial Far complex and Atg32 regulate mitophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e63694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.63694	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 Fukuda T, Ebi Y, Saigusa T, Furukawa K, Yamashita SI, Inoue K, Kobayashi D, Yoshida Y, Kanki T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Atg43 tethers isolation membranes to mitochondria to promote starvation-induced mitophagy in fission yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.61245	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 K, Innokentev A, Kanki T.	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 1479
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 Furukawa K, Kanki T.	4. 巻 14(12)
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 K, Fukuda T, Yamashita SI, Saigusa T, Kurihara Y, Yoshida Y, Kirisako H, Nakatogawa H, Kanki T.	4. 巻 23(12)
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 -

1. 著者名 Furukawa K, Kanki T.	4. 巻 1759
2. 論文標題 Mitophagy in yeast: A screen of mitophagy-deficient mutants.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 95-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2017_13	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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古川健太郎、Alekssei Innokentev、福田智行、神吉智文
2. 発表標題 ミトコンドリア型Far複合体とAtg32の結合と解離によるマイトファジー制御
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム・第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古川健太郎、Aleksi Innokentev、福田智行、神吉智丈
2. 発表標題 マイトファジーの抑制に関するプロテインホスファターゼPpg1とFar複合体の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム・第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川健太郎、Aleksi Innokentev、神吉智丈
2. 発表標題 マイトファジーの抑制に関するPpg1-Far複合体の解析
3. 学会等名 第3回オルガネラゾーン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川健太郎、神吉智丈
2. 発表標題 酵母におけるミトコンドリアオートファジーの抑制機構
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川健太郎、神吉智丈
2. 発表標題 酵母におけるミトコンドリアオートファジーの負の制御機構
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学大学院医歯学総合研究科・機能制御学分野
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

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
連携 研究者	神吉 智丈 (Kanki Tomotake) (50398088)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------