

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06552

研究課題名(和文) 選択的オートファジーによるオルガネラ分解の機構と意義の解明

研究課題名(英文) Mechanisms and roles of degradation of organelles by selective autophagy

研究代表者

福田 智行 (Fukuda, Tomoyuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90415282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マイトファジーは不要なミトコンドリアを隔離、分解する。分裂酵母の網羅的探索より、マイトファジーに必須のミトコンドリアタンパク質Atg43とAtg44を同定した。Atg43は外膜に局在し、隔離膜上のAtg8と結合することでミトコンドリアに隔離膜を安定化させることを見出した。一方、Atg44は膜間腔に存在し、その欠損はミトコンドリアの形態異常を引き起こすが、過剰発現はミトコンドリアの断片化をもたらした。したがって、Atg44はミトコンドリアの分裂を促進し、隔離膜に収納可能な断片を生成すると考えられる。以上より、隔離膜のリクルートとミトコンドリア分裂が、マイトファジーの主要なプロセスといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイトファジーは真核生物に普遍的に見られ、細胞の恒常性維持や機能発現に重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、酵母を用いた探索からマイトファジーに必須の因子を同定し、それぞれの作用機序を明らかにした。特に、マイトファジーには、ミトコンドリアに隔離膜をリクルートする過程と、分解対象のミトコンドリア領域を分裂させて隔離膜に収納する過程が存在することを分子レベルで明確にできた。本研究成果を足がかりに、マイトファジーの制御機構や生理機能の理解が進むと期待できる。また、マイトファジーの人為操作によるミトコンドリア機能の人工的制御につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mitophagy is a selective type of autophagy in which unnecessary mitochondria are sequestered by phagophores and degraded. A comprehensive screen in fission yeast has identified Atg43 and Atg44 to be essential for mitophagy.

Atg43 is a mitochondrial outer membrane (MOM) protein. Atg43 binds to Atg8, a phagophore membrane-associated protein. Artificial tethering of Atg8 to the MOM can compensate for the lack of Atg43. Thus, Atg43 stabilizes phagophores on mitochondria by binding to Atg8. Atg44 resides in the mitochondrial intermembrane space. Loss of Atg44 causes abnormal mitochondrial morphology, while its overexpression resulted in mitochondrial fragmentation. Thus, Atg44 likely promotes mitochondrial fission that separates a part of mitochondria for phagophore engulfment. Indeed, artificial fragmentation of mitochondria can compensate for the lack of Atg44.

Taken together, Atg43-mediated phagophore recruitment and Atg44-driven mitochondrial fission are two key processes in mitophagy.

研究分野：分子生物学

キーワード：オートファジー オルガネラ ミトコンドリア タンパク質分解 酵母 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物に普遍的に存在する TOR (Target of Rapamycin) キナーゼは、免疫抑制剤ラパマイシンの標的として同定された。多種の生物において遺伝学的・薬理学的研究がなされた結果、TOR は栄養・増殖因子・ストレスなどの刺激に応じて活性が変動し、増殖・代謝・形態・分化といった多岐にわたる細胞機能を制御するシグナル伝達分子であることが明らかになった。さらに、TOR を適度に抑制すると老化が抑えられ個体の寿命が延伸することが、酵母のような単細胞生物から、ハエ、線虫、マウスにいたる様々な生物種で見出された。したがって、TOR は細胞の生存と老化の主要な制御因子であり、その機能は真核生物間で高度に保存されているといえる。

TOR はオートファジーを負に制御する。そのため、TOR 複合体の抑制によって寿命が延伸するメカニズムには、オートファジーの活性化が重要である可能性が挙げられる。実際に、近年、オートファジーが老化抑制や寿命延伸に関与することが示唆されるようになった。そこで、オートファジー、特にオートファジーによるミトコンドリアの選択的な分解 (マイトファジー) が、細胞の恒常性維持や機能発現に深く関与し、老化や生存を促す可能性を検証することにした。

オートファジーはタンパク質や脂質の異化経路との一つである。オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる二重膜構造が細胞質成分を包み込み、オートファゴソームと呼ばれる小胞を形成する。オートファゴソームが液泡・リソソームと融合すると、隔離した成分は分解酵素のはたらきにより低分子へと分解され、生体分子の材料として再利用される。多くの成分は非選択的に囲まれて分解されるが、ミトコンドリアのようなオルガネラは、選択的に認識されて隔離、分解されることで知られる。この選択性を司るのは、レセプターと呼ばれる分子である。レセプターはオルガネラ上に局在し、オートファゴソーム形成因子との結合によりオルガネラの一部を分解の場へ導く。マイトファジーレセプターが出芽酵母や哺乳類で発見され、マイトファジーの機構の一部が明らかになりつつあるが、詳細な分子機構や生理機能は未解明なままであった。

## 2. 研究の目的

オルガネラは細胞内で特化した機能を果たすため、それぞれの質や量は適切に管理、維持される。真核単細胞生物である分裂酵母をモデルに、マイトファジー因子の機能解析と、マイトファジー欠損株の表現型解析を行い、「オートファジーによるミトコンドリアの選択的分解のメカニズムと意義」を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

真核単細胞生物である分裂酵母をモデルに、マイトファジーを検出する実験系を確立した。この系を用いて、分裂酵母遺伝子破壊株ラブラリーからマイトファジーに欠損を示す変異体を網羅的に探索した。その結果、マイトファジー特異的に欠損を示す変異体を 3 種類取得した。各変異遺伝子がコードするタンパク質 Atg43、Atg44、Tom70 の機能解析を行うことで、マイトファジーの分子機序や制御を明らかにした。また、Atg43 の遺伝子破壊株をマイトファジー不全モデルとし、その表現型解析から、ミトコンドリアの選択的分解の意義を明らかにすることを試みた。

## 4. 研究成果

### (1) Atg43 がマイトファジーレセプターとして機能することを明らかにした

分裂酵母のマイトファジーに必須の因子として同定した Atg43 の特徴付けを行った。Atg43 欠損株は栄養飢餓で誘導されるマイトファジーが完全に消失する一方、非選択的なオートファジー (バルクオートファジー) や他のオルガネラの選択的オートファジーは正常に生じていた。したがって、Atg43 はマイトファジーに特異的な因子といえる。

Atg43 に GFP を融合して細胞内局在を観察したところ、Atg43 はミトコンドリアに存在する膜タンパク質であることが分かった。生化学的な解析より、Atg43 は C 末端領域に存在する膜貫通ドメインを介してミトコンドリア外膜に局在しており、N 末端を細胞質側に配向することを見いだした。

Atg43 の部分欠失体を作成してマイトファジーに必要な分子領域を探索した。その結果、C 末端側にある膜貫通ドメインと、N 末端側に存在する 20 アミノ酸の領域のみが、マイトファジーに必要であった。膜貫通ドメインを欠失した変異体はミトコンドリアに局在できなかったことから、C 末端領域を介したミトコンドリア外膜への局在が Atg43 の機能に必須であることが分かった。また、マイトファジーに必要な N 末端領域は、隔離膜に局在する Atg8 タンパク質と結合する配列を含んでいることを見出した。実際に、免疫沈降実験と、酵母ツーハイブリッド法から、Atg43 はこの結合配列に依存して Atg8 と結合すること、この結合配列を欠失するとマイトファジーが欠損することを確認した。以上から、Atg43 は Atg8 との結合によりミトコンドリア上に隔離膜をリクルートすることで、マイトファジーを促進していると考えられた。この推論を支持するように、Atg8 を強制的にミトコンドリア外膜と連結するように遺伝子操作を施すと、Atg43 が欠損していてもマイトファジーが生じた。以上より、Atg43 は、ミトコンドリアにオートファ

ゴソーム形成の場をリクルートするレセプターとして機能することが示唆された。

## (2) Atg43 の発現制御の解明

Atg43 の発現解析を行ったところ、Atg43 は窒素源飢餓に応じて発現が誘導されることを見出した。また、TOR を不活化すると、Atg43 の発現が上昇し、マイトファジーが誘導されたことから、TOR は Atg43 の発現を介してマイトファジーを負に制御していることが明らかになった。

タンパク質の泳動度の解析から、Atg43 がリン酸化による修飾を受けることを発見した。Atg43 のリン酸化は栄養増殖時にみられ、栄養飢餓によりさらに増加した。リン酸化箇所を同定するため、セリン・スレオニン残基に変異を導入した変異体を作製し、それぞれの泳動度を評価した。その結果、栄養増殖時に起きるリン酸化と、飢餓時に起きるリン酸化は異なる箇所で行われていることを見出した。また、栄養増殖時のリン酸化は特定のセリン残基で生じるのに対し、飢餓時のリン酸化は複数のセリン残基でリダンダントに生じる可能性が示された。また、リン酸化の減少に比例してマイトファジーが低下していた。以上から、Atg43 は栄養条件に依存してリン酸化による制御を受けること、このリン酸化はマイトファジーを促進すること、が明らかになった。

Atg43 と相互作用する因子を探索するため、Atg43 の免疫沈降を行い、共沈降するタンパク質を質量分析により同定した。その結果、Mim1 と Mim2 からなる MIM 複合体が Atg43 と結合することを見出した。MIM 複合体はミトコンドリアタンパク質をミトコンドリアへ輸送するのに重要な役割を果たすことが知られている。実際に、MIM 複合体の欠損株では、Atg43 がミトコンドリア上に見られず、マイトファジーも生じていなかった。一方、Atg43 を MIM 複合体とは独立した経路でミトコンドリア外膜に局在化するように遺伝子操作を施すと、MIM 複合体の欠損株でマイトファジーが回復することを確認した。マイトファジーに必須の因子として同定した Tom70 タンパク質も、ミトコンドリアタンパク質の輸送に関わることが知られているため、同様の遺伝子操作を施したところ、マイトファジーが回復した。以上から、MIM 複合体と Tom70 は、Atg43 をミトコンドリア外膜へ正常に局在化させることで、マイトファジーに寄与することが示唆された。

## (3) Atg44 がミトコンドリア分裂因子として機能することを明らかにした

分裂酵母のマイトファジーに必須の因子として同定した Atg44 の特徴付けを行った。Atg44 欠損株は栄養飢餓で誘導されるマイトファジーが完全に消失する一方、非選択的なオートファジー（バルクオートファジー）や他のオルガネラの選択的オートファジーは生じていた。

Atg44 は栄養の有無に関わらず発現しており、GFP 融合タンパク質の観察から、ミトコンドリアタンパク質であることが分かった。また、生化学的な解析より、Atg44 は主にミトコンドリア膜間腔領域に存在することを見出した。

Atg44 欠損株の観察から、この株ではマイトファジーの誘導に関わらずミトコンドリアの形態が異常であることを見出した。また、その形態から、ミトコンドリア分裂に欠損があることが示唆された。そこで、Atg44 を過剰発現したところ、過度のミトコンドリア分裂が生じ、ミトコンドリアが断片化していた。以上から、Atg44 はミトコンドリア分裂因子であることが明らかになった。興味深いことに、Atg44 は既知のミトコンドリア分裂因子 Dnm1 とは独立にミトコンドリア分裂を促進することができた。

Atg44 がミトコンドリア分裂因子であったため、分裂の促進を介してマイトファジーに関与する可能性を検証した。Atg44 欠損株において、人為的にミトコンドリアの断片化を誘導したところ、マイトファジーが回復した。したがって、Atg44 はミトコンドリア分裂を促進し、オートファゴソームに収納可能なミトコンドリア断片を生成していることが示唆された。一方で、Dnm1 はマイトファジーに不要であることも確認した。

## (4) マイトファジーが飢餓時の増殖能維持に必要であることを明らかにした

マイトファジーの生理機能を明らかにするため、Atg43 欠損株をマイトファジー欠損モデルとして解析に用いた。マイトファジー欠損は栄養増殖に影響しなかったことから、マイトファジーは富栄養条件での増殖に必要なことが分かった。一方で、マイトファジー欠損細胞を長期間の窒素源飢餓におくと、再び富栄養条件に戻しても増殖を再開できなくなっていることが分かった。したがって、マイトファジーは飢餓時に増殖能を維持するのに必須であることが分かった。

窒素源飢餓時のミトコンドリア機能を解析するため、ミトコンドリアの酸化ストレスを調べた。その結果、長期間の窒素源飢餓はミトコンドリアに酸化ストレスを生じさせるものの、マイトファジーが欠損すると酸化ストレスが軽減されることを見出した。これは、飢餓時にマイトファジーが起きないと、ミトコンドリアの呼吸活性が著しく低下する可能性を示唆する。一方で、ミトコンドリアの膜電位は、マイトファジーが欠損していても正常に保たれていた。以上から、呼吸機能に対するマイトファジーの作用点を明らかにすることは、今後の重要な研究課題であるといえる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukuda Tomoyuki、Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Multiplexed suppression of TOR complex 1 induces autophagy during starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1794 ~ 1795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2021.1938915	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 Maruyama Tatsuhiro, Alam Jahangir Md., Fukuda Tomoyuki, Kageyama Shun, Kirisako Hiromi, Ishii Yuki, Shimada Ichio, Ohsumi Yoshinori, Komatsu Masaaki, Kanki Tomotake, Nakatogawa Hitoshi, Noda Nobuo N.	4. 巻 28
2. 論文標題 Membrane perturbation by lipidated Atg8 underlies autophagosome biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 583 ~ 593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-021-00614-5	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 Fukuda Tomoyuki, Ebi Yuki, Saigusa Tetsu, Furukawa Kentaro, Yamashita Shun-ichi, Inoue Keiichi, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Kanki Tomotake	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 Fukuda Tomoyuki、Kanki Tomotake	4. 巻 17
2. 論文標題 Atg43, a novel autophagy-related protein, serves as a mitophagy receptor to bridge mitochondria with phagophores in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 826 ~ 827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2021.1874662	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 Fukuda Tomoyuki, Sofyantoro Fajar, Tai Yen Teng, Chia Kim Hou, Matsuda Takato, Murase Takaaki, Morozumi Yuichi, Tatebe Hisashi, Kanki Tomotake, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Tripartite suppression of fission yeast TORC1 signaling by the GATOR1-Sea3 complex, the TSC complex, and Gcn2 kinase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e60969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.60969	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 福田智行	4. 巻 60
2. 論文標題 栄養飢餓に応じてTORC1の活性を制御する仕組み	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 550-552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tomoyuki Fukuda
2. 発表標題 Atg43 serves as a selective autophagy receptor to promote mitophagy
3. 学会等名 pombe Talks (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田智行
2. 発表標題 分裂酵母TORC1制御の普遍性と多様性
3. 学会等名 第11回TOR研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田智行、塩崎一裕、神吉智丈
2. 発表標題 Gcn2経路はアミノ酸飢餓に応答してTORC1を制御し、オートファジーを促進する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田智行、海老優樹、三枝徹、古川健太郎、神吉智丈
2. 発表標題 分裂酵母Atg43はミトファジーレセプターとして機能する
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 福田智行、古川健太郎、山下俊一、神吉智丈
2. 発表標題 選択的オートファジーを誘導するレセプター分子の作用機序
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田智行
2. 発表標題 分裂酵母におけるミトファジーの機構解明
3. 学会等名 第12回TOR研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田智行、神吉智丈
2. 発表標題 Mechanisms and roles of receptor-mediated mitophagy in fission yeast
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------