

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291039

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

研究課題名(英文)Molecular mechanism of mitochondrial autophagy

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリアオートファジー(マイトファジー)の分子機構について出芽酵母やヒト培養細胞を用いて解明することを目的とし研究を行った。その結果、ヒト培養細胞に於いて2つのMAPキナーゼErk2とp38のシグナル経路がマイトファジーに重要であること、出芽酵母では、マイトファジー必須因子であるAtg32の発現がTorの下流にあるSin3-Rpd3複合体によって制御されていることを明らかにした。また、隔離膜がミトコンドリアを包み込む過程でミトコンドリアを適切な大きさに千切りながらオートファゴソームを形成していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have studied the molecular mechanism of mitochondria autophagy or mitophagy in yeast and mammalian cells. We found that two MAP kinases, Erk2 and p38, are required for mitophagy in mammalian cells. We also found that the Sin3-Rpd3 complex suppresses the expression of mitophagy essential factor Atg32 under the regulation of Tor in yeast. In addition, we found that when isolation membrane enwraps mitochondria, it contributes to divide mitochondria to the suitable size for enwrapping during mitophagy.

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

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは、細胞にエネルギーを供給する重要なオルガネラであるが、同時に活性酸素を発生している。この活性酸素によりミトコンドリア自身が酸化傷害を受けやすい。傷害を受けたミトコンドリアが蓄積すると神経変性疾患や糖尿病の原因となり、さらに老化現象の主要因ともなる。このためミトコンドリアは、抗酸化酵素など酸化傷害を抑制する機構を多く備えているが、それにもかかわらず機能不全に陥ってしまったミトコンドリアを細胞がどう処分しているかはこれまで不明であった。

(2) オートファジーは、細胞質で隔離膜と呼ばれる脂質二重膜を形成し、細胞質成分を非選択的に包み込み、リソソーム/液胞と融合することで、取り込んだ細胞質成分を分解する機構である。最近の研究から、オートファジーが機能不全に陥ったミトコンドリアを選択的に分解することでミトコンドリアの機能維持を行っていることが明らかになりつつある。このオートファジーによる選択的ミトコンドリア分解(ミトコンドリアオートファジー：以後「マイトファジー」と略す)は、新しいミトコンドリア品質管理機構と考えられるようになってきた。

(3) 最近の研究から、家族性パーキンソン病の原因遺伝子 PARK2 と PARK6 がコードする Parkin と PINK1 がマイトファジーに重要な役割を持つことが明らかとなってきた。このことは、マイトファジーがパーキンソン病などの神経変性疾患発症を抑制する働き、即ち、マイトファジーによるミトコンドリア品質管理機構が疾患発症を抑制している可能性を強く示唆しており、疾患との関わりという観点からもマイトファジーの解明が急がれる。

(4) 申請者は、出芽酵母を用いてマイトファジーの研究を行い、新規マイトファジー関連因子 Atg32、Atg33 の発見を含む幾つかの成果を挙げており、出芽酵母、哺乳類の両面からマイトファジー分子機構の解明を進めている。

2. 研究の目的

(1) CK2 による Atg32 リン酸化機構：これまでの研究で、CK2 による Atg32 のリン酸化がミトコンドリアの選択的分解の最初のステップであることを明らかにしている。CK2 は恒常的に活性化されたキナーゼであり、マイトファジー誘導時にものみ Atg32 をリン酸化するメカニズムは、マイトファジーを理解する上で重要な疑問点である。どのような作用機序で CK2 が Atg32 をリン酸化するかを解明する。

(2) 線虫を用いたマイトファジー観察法の確立とマイトファジー関連遺伝子のスクリーニング

ーニング

(3) ヒト培養細胞におけるマイトファジーの分子機構と生理的意義：出芽酵母で得られた研究成果をヒト細胞に応用する、線虫のスクリーニングで得られた遺伝子のヒトホモログの機能を解明することにより、ヒト細胞におけるマイトファジーの分子機構を解明する。

3. 研究の方法

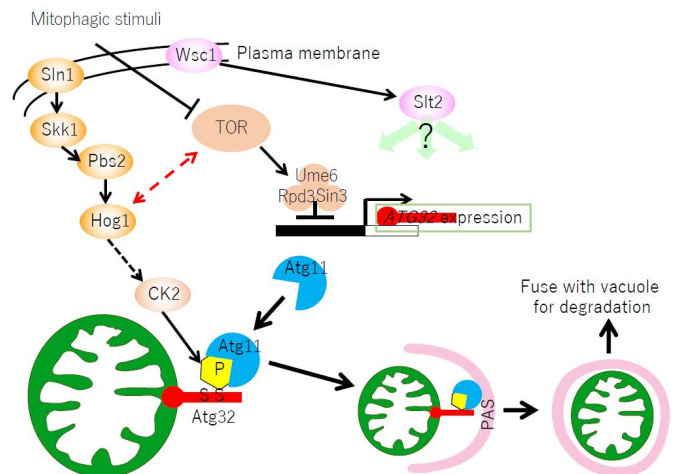
(1) Yeast Two-Hybrid(Y2H)法やプロテオミクス的手法を用いて CK2 や Atg32 と結合し Atg32 リン酸化制御に関わる因子を同定する。同定した因子の破壊株や過剰発現株において Atg32 のリン酸化状態やマイトファジーを観察し、マイトファジーの制御機構を明らかにする。

(2) 既にヒト培養細胞で成果が出ている pH 依存的蛍光タンパク質 Keima を線虫に発現させ、線虫の筋肉においてマイトファジーを観察できる実験系を確立する。その上でマイトファジー関連遺伝子のスクリーニングを行う。

(3) ヒト培養細胞では、Keima を発現させることにより、効率よくマイトファジーを観察出来る実験系が既に確立されている。酵母や線虫で同定できたマイトファジー関連因子のヒトホモログが、ヒト培養細胞でマイトファジーにどのように関わるかを観察し、哺乳類細胞におけるマイトファジーの分子機構を解明する。

4. 研究成果

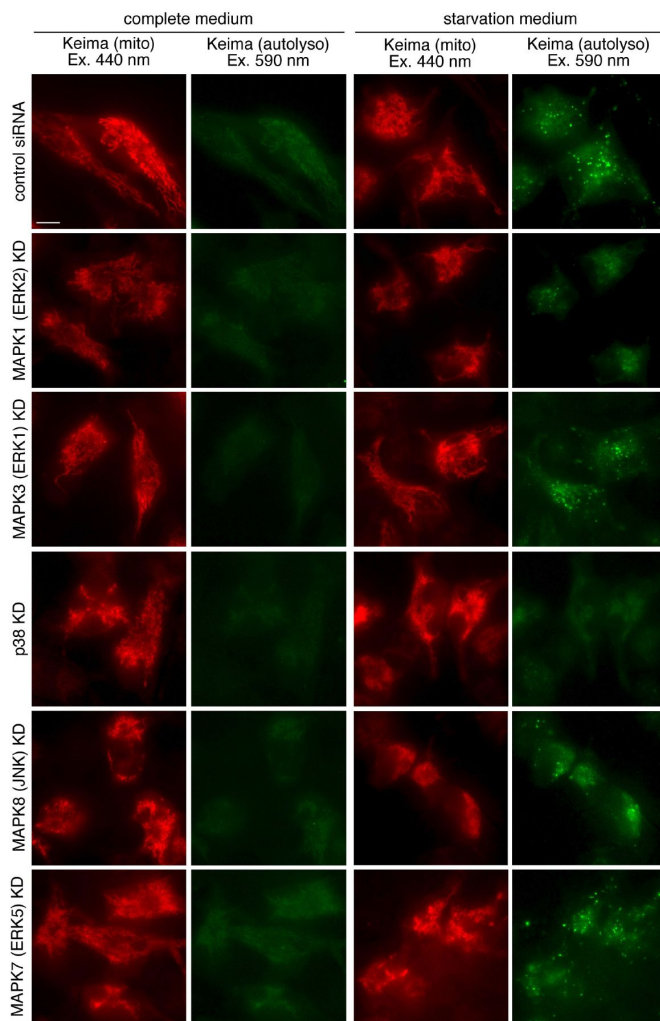
(1) これまで、マイトファジーに必須なミトコンドリア外膜の膜タンパク質 Atg32 の発現制御に関しては不明な点が多かった。本研究では、Atg32 の発現に関する詳細な解析により、Tor の下流にある Ume6-Sin3-Rpd3 複合体による Atg32 発現抑制系が存在し、Atg32 の発現を適切に制御している事が明らかにした(下図参照)。



【図の説明】

出芽酵母では、マイトファジー誘導に関わる刺激（例えば栄養飢餓など）により、2つのMAPキナーゼ経路が活性化され、マイトファジーが誘導されると考えられている。未だに不明な点が多いが、その下流はCK2であり、CK2がAtg32をリン酸化することでAtg32がAtg11と結合出来るようになる。このAtg32-Atg11結合が、マイトファジーの最初のステップと考えられる。このマイトファジーに必須のAtg32の発現は、Ume6-Sin3-Rpd3複合体により抑制されており、その抑制はTorの下流にある。従って、飢餓などによりTorが抑制されると、Ume6-Sin3-Rpd3によるAtg32発現抑制が解除され、Atg32の発現が誘導されるようになる。

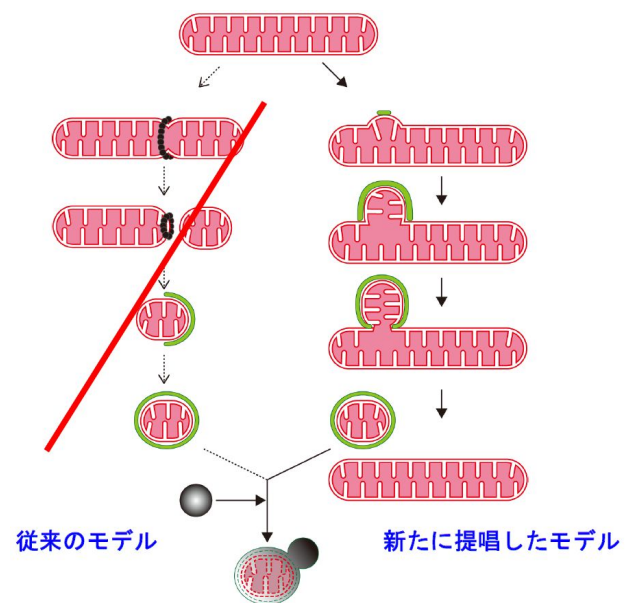
(2) 出芽酵母では、Hog1、Slit2という2つのMAPキナーゼがマイトファジーに重要であることが明らかになっていた。ヒト細胞のマイトファジーにおけるMAPKの役割を調べたところ、Erk2とp38の2つのMAPKシグナル経路が飢餓に反応して誘導されるマイトファジーに重要であることを明らかにできた(下図参照)。



【図の説明】

マイトファジーを観察するためにミトコンドリア移行シグナルを付けた蛍光タンパク質 Keima (mito-Keima) が発現した HeLa 細胞を用いた。Erk2 及び p38 ノックダウン株では、飢餓で誘導されるマイトファジー (590nm で認められるドット状の蛍光像) が大きく減少していることが確認できる。

(3) 隔離膜がミトコンドリアを選択し、包み込む過程の詳細な解析を行った。ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返し、その大きさを変化させるオルガネラである。このため、分裂が進むとミトコンドリアは直径が 500nm 程度の小球状になるが、融合が進むと数千 nm の棒状形態を取るようになる。後者のミトコンドリアは、一般的なオートファゴソムの大きさを超えているため、これまでマイトファジーの前にミトコンドリア分裂が起こり、小さくなったミトコンドリアが分解されていると考えられてきた。本研究では、出芽酵母、哺乳類細胞を問わず、ミトコンドリア分裂因子破壊株でもマイトファジーが起こることしめし、さらに、哺乳類細胞の詳細な蛍光顕微鏡解析により、隔離膜がミトコンドリアを包み込む過程で、ミトコンドリアを適切な大きさに干切り取っていることを明らかにした(下図参照)。この研究成果は、従来の概念と大きく異なるもので、マイトファジーに限定すること無く、オートファジーが分解できる対象の大きさに制限がない可能性を示唆する初めての成果となった。



【図の説明】
従来のモデルでは、マイトファジーが誘導されると、まずミトコンドリアが分裂し、オートファゴソムよりも小さな球状になり、その少球状のミトコンドリアをオートファゴソムが取り囲むと考えられていた。今回の研究により、ミトコンドリアの分裂はオート

ファゴソーム形成の前に起こるのではなく、オートファゴソーム形成とほぼ同時に、即ち、あたかもオートファゴソームがミトコンドリアの一部を引きちぎるかのようにして起こっていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Yamashita S, Kanki T.

Detection of Hypoxia-Induced and Iron Depletion-Induced Mitophagy in Mammalian Cells.

Methods Mol Biol. 2017 印刷中 査読有
doi: 10.1007/7651_2017_19.

Furukawa K, Kanki T.

Mitophagy in Yeast: A Screen of Mitophagy-Deficient Mutants.

Methods Mol Biol. 2017 印刷中 査読有
doi: 10.1007/7651_2017_13.

Yamashita S, Jin X, Furukawa K, Hamasaki M, Nezu A, Otera H, Saigusa T, Yoshimori T, Sakai Y, Mihara K, Kanki T. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy.

J Cell Biol. 2016;215(5):649-665. 査読有
doi: 10.1083/jcb.201605093

Akabane S, Matsuzaki K, Yamashita S, Arai K, Okatsu K, Kanki T, Matsuda N, Oka T.

Constitutive Activation of PINK1 Protein Leads to Proteasome-mediated and Non-apoptotic Cell Death Independently of Mitochondrial Autophagy.

J Biol Chem. 2016;291(31):16162-16174. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M116.714923.

Hirota Y, Yamashita S, Kurihara Y, Jin X, Aihara M, Saigusa T, Kang D, Kanki T. Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways.

Autophagy. 2015;11(2):332-43. 査読有
doi: 10.1080/15548627.2015.1023047.

Kanki T, Furukawa K, Yamashita S.

Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role.

Biochim Biophys Acta. 2015;1853(10 Pt B):2756-65. 査読有
doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.005.

Aihara M, Jin X, Kurihara Y, Yoshida Y, Matsushima Y, Oku M, Hirota Y, Saigusa T, Aoki Y, Uchiumi T, Yamamoto T, Sakai Y, Kang D, Kanki T.

Tor and the Sin3-Rpd3 complex regulate expression of the mitophagy receptor protein Atg32 in yeast.

J Cell Sci. 2014;127(Pt 14):3184-96. 査読有
doi: 10.1242/jcs.153254.

Kanki T, Okamoto K.

Assays for autophagy II: Mitochondrial autophagy.

Methods Mol Biol. 2014;1163:165-73. 査読有
doi: 10.1007/978-1-4939-0799-1_11.

〔学会発表〕(計 4 件)

Tomotake Kanki

Drp1-independent mitochondrial division for mitophagy occurs concurrently with autophagosome formation

The 4th Sino-Japan Symposium on Autophagy 2016.4.23 北京(中国)

Tomotake Kanki

Mitochondria autophagy in yeast and mammalian cells

A3 Autophagy conference 2015.10.28-30 ソウル(韓国)

Tomotake Kanki

The signaling pathway regulating mitochondria autophagy

2nd International Symposium on Protein Modification in Pathogenic Dysregulation of Signaling

2015.1.23-24 東京大学医科学研究所(東京都港区)

Tomotake Kanki

Signaling pathways regulating mitophagy in yeast

2014Northeastern Asian Symposium on Autophagy

2014.12.18-21 釜山(韓国)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

神吉 智文 (KANKI, Tomotake)

新潟大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 50398088

(3)連携研究者

山下 俊一 (YAMASHITA, Shun-ichi)
新潟大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：30529095

三枝 徹 (SAIGUSA, Tetsu)
新潟大学・医歯学総合研究科・研究員
研究者番号：50421954