

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18514

研究課題名(和文) ストレス応答キナーゼを介したミトファジー制御機構の解明と人工制御

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanism of mitophagy via stress-activated protein kinase and artificial regulation of mitophagy

研究代表者

古川 健太郎 (Furukawa, Kentaro)

新潟大学・医歯学総合研究科・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアを選択的に分解するミトファジーは、ミトコンドリアの品質管理機構である。酵母では、カゼインキナーゼ2(CK2)によるミトファジーレセプターAtg32のリン酸化がミトファジーに必須である。CK2は恒常的に活性を有するにもかかわらず、ミトファジー誘導時のみAtg32がリン酸化される制御機構は不明であった。本研究では、プロテインホスファターゼPpg1がAtg32の脱リン酸化に必須であること、Ppg1またはFar複合体(Ppg1の結合因子)の欠損がミトファジーの亢進を引き起こすこと、Atg32の151-200の細胞質領域がミトファジーの抑制に重要であることを見出した。

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 casein kinase 2 (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-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. Deletion of a cytoplasmic region (A.A. residues 151-200) of Atg32 caused the same phenotypes as ppg1⁻ cells, which suggested that dephosphorylation of Atg32 by Ppg1 required this region. 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：ミトコンドリア オートファジー ミトファジー 酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) 栄養飢餓などで誘導されるオートファジーは、細胞質成分やオルガネラをオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜で包み込み、液胞/リソソームで内容物を分解・再利用する重要な生理機能である。一方、ミトコンドリアを選択的に分解するミトコンドリアオートファジーはマイトファジーと称される。最近の研究から、マイトファジーが異常なミトコンドリアを分解・除去することによって細胞の恒常性を保つ機構であると理解されている。高等動物において、活性酸素などで傷害を受けたミトコンドリアの機能低下は、神経変性疾患や老化現象など様々な弊害を引き起こすが、その機能を回復できる治療薬は存在せず、マイトファジーを誘導することが有力な治療法として期待されている。

(2) 申請者が所属する研究室では、酵母におけるマイトファジー分子機構の多くを解明してきている。マイトファジーが誘導されると、カゼインキナーゼ 2 (CK2) がミトコンドリア外膜に存在するマイトファジー特異的なレセプターである Atg32 の Ser114 残基をリン酸化する。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 がリン酸化された Atg32 と特異的に結合し、分解標的のミトコンドリアはオートファゴソーム形成の場 (PAS) へ運び込まれ、最終的に液胞において分解される。CK2 は恒常的に活性を有するキナーゼであるにもかかわらず、マイトファジー誘導時にのみ Atg32 がリン酸化される制御機構の詳細は明らかにされていない。

(3) 酵母において、数多く存在するミトコンドリアの中からマイトファジーによる分解標的となるミトコンドリアがどのように識別されているのかは全く分かっていない。マイトファジーを人工的に誘導し、分解標的となるミトコンドリアを任意に作り出すことができれば、このような疑問を解き明かすこと及びマイトファジーを利用したミトコンドリア病治療への応用に繋がると期待される。

2. 研究の目的

(1) Atg32 リン酸化制御機構の解明:

カゼインキナーゼ 2 (CK2) による Atg32 のリン酸化がマイトファジーの最初のステップである。CK2 は恒常的に活性を有するキナーゼであるにもかかわらず、マイトファジー誘導時にのみ 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必ず解明すべき点である。本研究では、どのような作用機序で Atg32 のリン酸化が制御されているのか、具体的には、Atg32 のリン酸化を妨げる因子の同定およびその分子機構を解明する。

(2) マイトファジーの人工誘導法の確立:

本来マイトファジーは傷害を受けたミトコンドリアを除去するための生理機能であると考えられており、栄養飢餓に依存しないマイトファジーの制御機構を理解する必要がある。本研究では、遺伝子改変操作によるマイトファジーの人工誘導を試みることによって、マイトファジーに真に必須な要素を明らかにするとともに、ミトコンドリアを人工的に除去するための知見を得る。

3. 研究の方法

(1) Atg32 リン酸化阻害因子の同定:

GFP を融合した Atg32 (GFP-Atg32) の蛍光顕微鏡による局在観察を指標として、酵母の遺伝子破壊株ライブラリーからマイトファジー非誘導条件下においても GFP-Atg32 の集積を引き起こす変異株をスクリーニングする。さらに候補株において、Atg32 のリン酸化がマイトファジー誘導前でも起こるかどうかを基準に阻害因子を絞り込む。

(2) Atg32 リン酸化阻害因子の機能解析:

上記で同定される Atg32 のリン酸化阻害因子の遺伝子破壊株および過剰発現株において、マイトファジーが亢進あるいは抑制されるかウェスタンブロットを用いた手法 (Idh1-GFP プロセッシングアッセイ) によって確認する。さらに、マイトファジー以外のオートファジー (バルクオートファジー、Cvt 経路、ペキソファジー) に影響があるかどうかも確認する。

(3) マイトファジーの人工誘導法の確立:

酵母におけるマイトファジーは栄養飢餓によって強く誘導されるが、本来マイトファジーは機能低下または老化したミトコンドリアを除去するための生理機能であると考えられており、栄養飢餓に依存しないマイトファジーの制御機構を理解する必要がある。本研究では、Atg32 のリン酸化阻害因子破壊株におけるマイトファジーの人工誘導を試み、マイトファジーに真に必須な要素を明らかにする。

(4) Atg32 におけるリン酸化抑制に必要な領域の同定:

Atg32 タンパク質のデリーション解析を行い、リン酸化阻害因子との結合の有無やマイトファジーの亢進の有無を調べ、Atg32 のリン酸化の抑制に必要な領域を同定する。

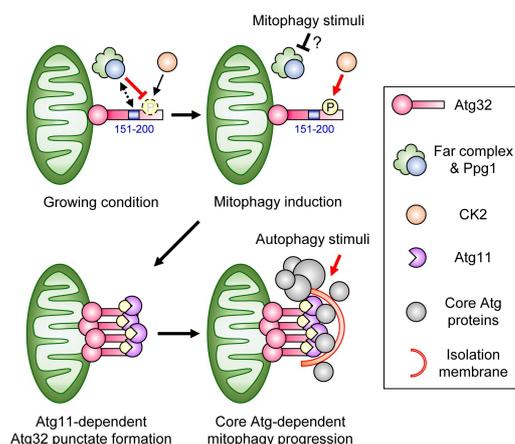
4. 研究成果

Atg32 のリン酸化を抑制する因子を探索する方法として、マイトファジーが誘導されると、Atg32 がリン酸化依存的にミトコンドリア上にドット状に集積する現象に着目した。マイトファジーを誘導せずにこのような特徴を示す変異株を探索したところ、PP2A 様プロテインホスファターゼ Ppg1 が同定さ

れた。Ppg1 を欠損させると、CK2 依存的に Atg32 の恒常的なリン酸化が起こり、その結果としてミトファジーの亢進が見られた。興味深いことに、Atg32 のリン酸化だけではミトファジーは進行せず、オートファジーのコアとなる部分も同時に活性化されることが重要であることが分かった。また、ミトファジー以外のオートファジー、例えばペルオキシソームという細胞内小器官を分解するペキソファジーやそのレセプターである Atg36 の制御には Ppg1 は関与しないことも分かった。

Ppg1 が属する PP2A ファミリーは、活性調節因子と結合して機能を発揮することが知られている。しかしながら、Atg32 の脱リン酸化には Ppg1 は既知の活性調節因子を必要としなかったことから、未知の因子が関与すると推測した。そこで、Ppg1 と結合する因子をプロテオーム解析によって探索したところ、Far 複合体 (Far3、7、8、9、10、11 の 6 タンパク質から成る) が同定された。Far 複合体を欠損させると、Ppg1 欠損と同様に Atg32 の恒常的なリン酸化とミトファジーの亢進が見られた。

最後に、ミトファジーの抑制に Atg32 タンパク質のどの領域が重要なのかを調べた。Atg32 のアミノ酸配列 151-200 番目の領域を欠損させると、Ppg1 欠損とほぼ同様の結果となったことから、Ppg1 はこの領域を介して Atg32 を脱リン酸化していると推測された。以上の結果をもとに、下図に示したミトファジーの制御機構を提唱した。



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 2 件)

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 SI, 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

[学会発表](計 6 件)

古川健太郎, 神吉智丈, ミトコンドリアオートファジーレセプター Atg32 の負の制御機構、酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会、2017 年 9 月 11 日、東京大学・弥生講堂、文京区・東京都

Kentaro Furukawa, Yusuke Kurihara, Tomotake Kanki, Negative regulatory mechanisms of the yeast mitophagy receptor Atg32, The 8th International Symposium on Autophagy, 2017 年 5 月 29-30 日、奈良春日野国際フォーラム、奈良市・奈良県

Kentaro Furukawa, Yusuke Kurihara, Tomotake Kanki, Negative regulatory mechanisms of the yeast mitophagy receptor Atg32, A3 日本オートファジー合同セミナー、2017 年 3 月 10 日、ザ・セレクトン福島、福島市・福島県

Kentaro Furukawa, Yusuke Kurihara, Tomotake Kanki, Negative regulatory mechanisms of the yeast mitophagy receptor Atg32, Joint Japan-Korea-China Young Investigator Conference (A3), 2017 年 2 月 20 日、ソウル大学校、ソウル市・韓国

古川健太郎, 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制御機構、酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会、2016 年 9 月 11 日、シーサイドホテル舞子ピラ神戸、神戸市・兵庫県

Kentaro Furukawa, Yusuke Kurihara, Tomotake Kanki, Negative regulatory mechanisms of the yeast mitophagy receptor Atg32, ミトコンドリアサイエンスワークショップ 2016、2016 年 7 月 15 日、福岡リーセントホテル、福岡市・福岡県

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

古川 健太郎 (FURUKAWA, Kentaro)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・特任
助教
研究者番号：20754493

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

神吉 智丈 (KANKI, Tomotake)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50398088

(4) 研究協力者

()