

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05500

研究課題名(和文) マイトファジーの誘導から分解に至る一連の分子機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a series of the molecular mechanism and physiological significance from induction of mitophagy to mitochondrial degradation

研究代表者

古川 健太郎 (Furukawa, Kentaro)

新潟大学・医学部・医学部准教授

研究者番号：20754493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイトファジーは、ミトコンドリアの恒常性維持に重要な役割を果たす。マイトファジーにおいて、ミトコンドリアはオートファゴソーム内に取り込まれるように断片化される必要があるが、既知のミトコンドリア分裂因子はマイトファジーには不要である。本研究では、酵母のマイトファジーに必須なミトコンドリア分裂因子としてAtg44を同定した。Atg44欠損細胞では、ミトコンドリアの一部がマイトファジーによって積荷として認識されるが、分裂能が欠如しているため、オートファゴソームの前駆体である隔離膜で包み込めることができない。さらに、Atg44は脂質膜に直接結合・脆弱性をもたらして膜分裂を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、長年未解決であったマイトファジーの過程におけるミトコンドリア分裂の責任因子としてAtg44を同定しただけでなく、Atg44が直接脂質膜に作用して分裂を引き起こすという全く新しい分子機構を明らかにした点で重要な成果となる。ミトコンドリアの形態と機能は直結しており、高等生物におけるミトコンドリアの形態異常は様々な病態の要因となることが知られている。Atg44はミトコンドリア形態制御の重要因子であることから、その理解と応用により、ミトコンドリア形態異常を伴う様々な疾患の病態解明や治療法開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Mitophagy plays an important role in mitochondrial homeostasis by selective degradation of mitochondria. During mitophagy, mitochondria should be fragmented to allow engulfment within autophagosomes. However, the known mitochondrial fission factors are dispensable for mitophagy. Here, we identified Atg44 as a mitochondrial fission factor that is essential for mitophagy in yeasts. In Atg44-deficient cells, a part of the mitochondria is recognized by the mitophagy machinery as cargo but cannot be enwrapped by the autophagosome precursor, the phagophore, due to a lack of mitochondrial fission. Furthermore, we found that Atg44 directly binds to lipid membranes and brings about lipid membrane fragility to facilitate membrane fission.

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 マイトファジー 酵母 Atg44

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 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、オートファジーによるミトコンドリアの選択的分解機構である「マイトファジー」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) 酵母においてマイトファジーが誘導されると、マイトファジーレセプター Atg32 がカゼインキナーゼ 2 (CK2) によってリン酸化される。リン酸化 Atg32 はミトコンドリア上に集積し、この集積部位が隔離膜に包まれながら分解標的として切り離され、小さいミトコンドリアを包み込んだオートファゴソーム (マイトファゴソーム) は最終的に液胞内で分解される。

(3) マイトファジーにおけるミトコンドリア分裂の必須因子としてミトコンドリア膜間腔タンパク質 Atg44 を同定しているが、その詳細な分裂機構と分裂部位が含む標的内容物に関しては不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、Atg32 集積部位においてミトコンドリアの一部が局所的に分裂する分子機構およ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の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) Atg44 欠損酵母におけるミトコンドリア分裂部位の顕微鏡解析

マイトファジー誘導条件下において、Atg44 欠損酵母 (*atg44Δ*) は、ミトコンドリアの局所分裂が途中で停止している状態の突起を形成する。この突起形成が、オートファジー/マイトファジー因子依存的なのか、オートファジー/マイトファジー因子が集積するのかについて蛍光顕微鏡を用いた解析を行う。さらに、突起部分の超解像顕微鏡および電子顕微鏡を用いた詳細な構造解析を行う。

(2) Atg44 のミトコンドリア分裂活性に必要なアミノ酸残基の同定

Atg44 は 73 アミノ酸残基からなる小さいタンパク質である。Atg44 の全アミノ酸残基のアラニン置換変異体を作製し、ミトコンドリア分裂活性を指標とした Atg44 の機能に必要な配列を探索し、Atg44 の機能発揮のメカニズムを考察する。

(3) Atg44 パラログの機能解析

Atg44 の解析過程において、Atg44 と類似配列を持つ機能未知のタンパク質を見出した。遺伝子破壊株および過剰発現株を用いたミトコンドリア分裂およびマイトファジーの解析、GFP 融合体を用いた局在解析などを行う。

### 4. 研究成果

*atg44Δ* 株において、オートファジー/マイトファジー因子 (Atg1、Atg8、Atg11、Atg32) の欠損株および GFP 融合体発現株を作製し、ミトコンドリアの突起形成との関係を調べた。これらの因子のいずれかを欠損させた場合、ミトコンドリアの突起形成が完全にブロックされた。また、突起部分における GFP 融合体の強いシグナルも検出された。以上の結果から、オートファジー/マイトファジー因子の集結が引き金となり、ミトコンドリアの分裂が進行することが立証された。さらに、この突起部分にはミトコンドリア DNA も高頻度で含まれていたことから、マイトファジーの生理的意義の一つとして、ミトコンドリア DNA の分解であることが示唆された。*atg44Δ* 株で観察される突起部分の超解像顕微鏡を用いた高解像度画像を取得した。さらに、集束イオンビーム装置と走査型電子顕微鏡を組み合わせた FIB-SEM によって、突起部分の詳細な解析を行ったところ、クリステなどの内部構造は維持されていることが分かった。

ここまでの結果は、Atg44 の投稿論文のリバイス過程で行ったものであり、2023 年 5 月に *Molecular Cell* 誌に発表することができた。Atg44 の研究結果から得られたマイトファジーの過程における Atg44 依存的なミトコンドリア分裂のモデルを図 1 に示す。

Atg44 の網羅的な変異体解析を行ったところ、マイトファジー活性およびミトコンドリア分裂活性が消失した変異体を複数見出した。その大半は Atg44 タンパク質の安定性に寄与するものであり、一部は Atg44 と脂質の結合に寄与するものと考えられた。今後、詳細な解析を進める予定である。

Atg44 と類似構造を持つ機能未知のタンパク質（ここでは分裂因子 Y と呼ぶ）の解析を行い、以下のことを明らかにした。分裂因子 Y の欠損株はマイトファジーの低下を示した。分裂因子 Y の過剰発現によって、*atg44Δ* 株においてもミトコンドリアの分裂が起こり、マイトファジーも部分的に回復した。GFP 融合体の解析の結果、分裂因子 Y はミトコンドリアに局在することが分かった。分裂因子 Y のポリクローナル抗体を作製し、ProK プロテクションアッセイによるミトコンドリアにおける分裂因子 Y の局在画分を調べたところ、細胞質側の外膜に局在することが分かった。これらの結果から、分裂因子 Y は Atg44 のパラログであると結論付け、今後さらなる解析を進める予定である。

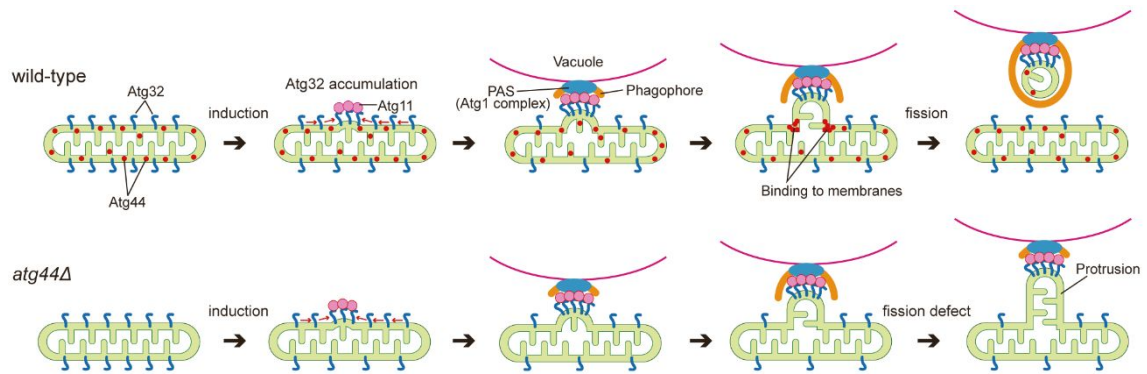


図 1: マイトファジーの過程における Atg44 依存的なミトコンドリア分裂

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukuda T, Furukawa K (co-first), Maruyama T (co-first), Yamashita SI, Noshiro D, Song C, Ogasawara Y, Okuyama K, Alam JM, Hayatsu M, Saigusa T, Inoue K, Ikeda K, Takai A, Chen L, Lahiri V, Okada Y, Shibata S, Murata K, Klionsky DJ, Noda NN*, Kanki T*.	4. 巻 83
2. 論文標題 The mitochondrial intermembrane space protein mitofissin drives mitochondrial fission required for mitophagy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 2045-2058.e9
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 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 該当する

1. 著者名 Yamashita SI, Kyuuma M, Inoue K, Hata Y, Kawada R, Yamabi M, Fujii Y, Sakagami J, Fukuda T, Furukawa K, Tsukamoto S, Kanki T.	4. 巻 236
2. 論文標題 Mitophagy reporter mouse analysis reveals increased mitophagy activity in disuse induced muscle atrophy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 7612-7624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30404	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 T, Furukawa K, Kanki T.	4. 巻 83
2. 論文標題 Meet the authors: Tomoyuki Fukuda, Kentaro Furukawa, and Tomotake Kanki.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1953-1955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2023.05.016	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 T, Saigusa T, Furukawa K, Inoue K, Yamashita SI, Kanki T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Hva22, a REEP family protein in fission yeast, promotes reticulophagy in collaboration with a receptor protein.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 2657-2667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2023.2214029	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 T, Furukawa K, Maruyama T, Noda NN, Kanki T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Mitofissin: a novel mitochondrial fission protein that facilitates mitophagy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 3019-3021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2023.2237343	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 SI, Sugiura Y, Matsuoka Y, Maeda R, Inoue K, Furukawa K, Fukuda T, Chan DC, Kanki T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Mitophagy mediated by BNIP3 and NIX protects against ferroptosis by downregulating mitochondrial reactive oxygen species	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 651-661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-024-01280-y	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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 <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

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