

ミトコンドリアオートファジーによる分解標的のオミックス解析

古川 健太郎
新潟大学大学院 医歯学総合研究科

研究成果

酵母遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングによって、ミトコンドリアオートファジー（マイトファジー）に必須な新規因子 Atg44 を同定した。詳細な機能解析の結果、Atg44 はマイトファジー以外のオートファジーには関与せず、ミトコンドリア分裂因子としてマイトファジーに寄与することを明らかにした。

研究の目的

エネルギー産生過程で機能が低下したミトコンドリアの蓄積は、酵母では発酵生産能やストレス耐性能の低下、ヒトで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。オートファジーによるミトコンドリアの分解（マイトファジー）は、高度に保存されたミトコンドリアの品質管理機構である。酵母においては、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、カゼインキナーゼ 2 によってミトコンドリア外膜タンパク質 Atg32 がリン酸化され、選択的オートファジーのアダプターである Atg11 依存的に Atg32 が集積する^{1,2)}。この集積部位がマイトファジーによる分解標的として切り出され、最終的に液胞で分解される（図 1）。しかしながら、分解標的の切り出しを担う因子及び標的内容物（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）に関してはこれまで全く解析されていない³⁾。本研究では、分解標的部位の切り出しに関与する因子及び標的内容物のオミックス解析を通してマイトファジーの分子機構と真の分解対象を解明することを目的とした。

方法

ミトコンドリア局在タンパク質である Idh1 (isocitrate dehydrogenase 1) に GFP を融合させた酵母を呼吸増殖培地において定常期まで培養すると、マイトファジーの誘導とともに Idh1-GFP が液胞内で分解されるが、GFP そのものは液胞内においても安定であり、ウェスタンブロット解析によって GFP 単体のバンドが検出されるようになる。この手法を酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の遺伝子破壊株ライブラリーにおいて活用し、過去のマイトファジー因子のスクリーニングに含まれていなかった因子に着目して解析を進めた。同定されたマイトファジー不能株（後述する Atg44）について、*atg44D*株がマイトファジー以外のオートファジーにも影響を及ぼすかどうかの検討、抗 Atg44 抗体を用いた Atg44 の局在解析、*atg44D*株におけるミトコンドリアの形態学的解析、Atg44 の生物種間における保存性について解析を

行った。

結果

マイトファジー不能株のスクリーニングの結果、これまで機能が全く報告されていない因子を同定し、これを Atg44 と命名した。 *atg44D* 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、Cvt 経路に欠陥は見られなかった (図 2)。 抗 Atg44 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 Atg44 のバンドが検出されたことから、Atg44 はミトコンドリアタンパク質であることを確認した。 透過型電子顕微鏡を用いた解析の結果、*atg44D* 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 (図 3)。 *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 Atg44 オルソログを有し、*atg44D* 株のマイトファジー不能を相補可能であったことから、Atg44 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。

結論

本研究でマイトファジーの必須因子として同定した Atg44 は、ミトコンドリア本体から分解標的の切り出しに関与する分裂因子として機能すると考えられる。 今後は、Atg44-GFP 融合体を用いた蛍光顕微鏡解析によって、Atg44 が実際に分裂部位に集積することを証明する必要がある。 また、今後は、本研究のもう一つの目的であるミトコンドリア分解標的内容物の解析も進める予定である。

文献

- 1) Kanki, T., Furukawa, K., and Yamashita, SI. (2015) Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta.* **1853**: 2756-2765.
- 2) Furukawa, K. *et al.* (2018) The PP2A-like protein phosphatase Ppg1 and the Far complex cooperatively counteract CK2-mediated phosphorylation of Atg32 to inhibit mitophagy. *Cell Rep.* **23**: 3579-3590.
- 3) Yamashita, SI. *et al.* (2016) Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J. Cell Biol.* **215**: 649-665.

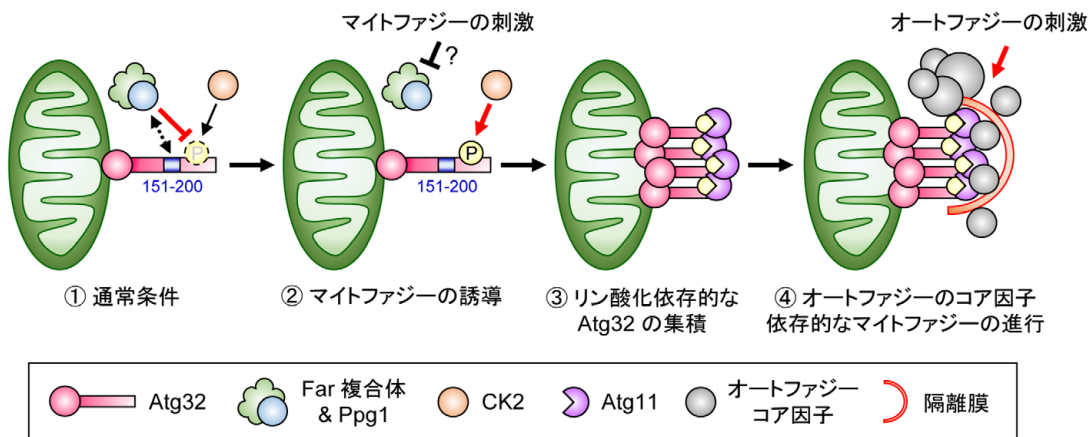


図 1: 酵母におけるマイトファジーの制御機構モデル (Furukawa *et al.*, *Cell Rep*, 2018)

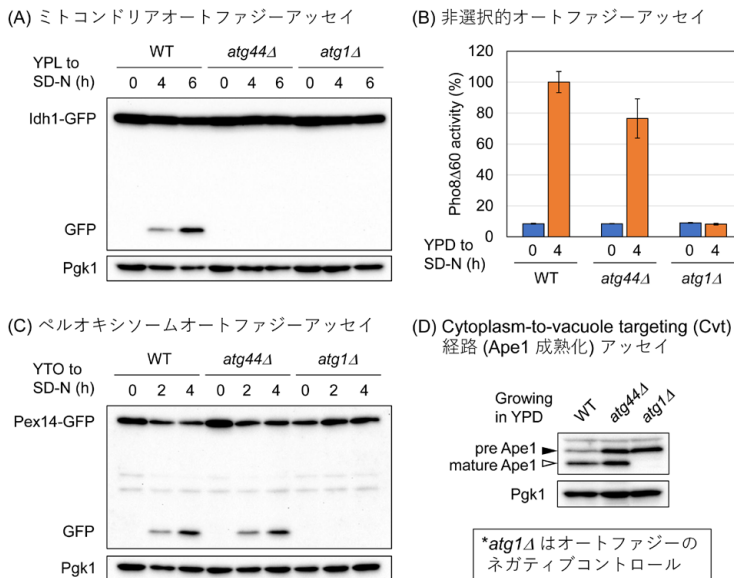


図 2: Atg44 はマイトファジー特異的な必須因子である

(A) ミトコンドリアタンパク質 Idh1-GFP のプロセッシング (マイトファジーの指標) をモニタリング。(B) アルカリホスファターゼ Pho80 活性 (非選択的オートファジーの指標) をモニタリング。(C) ペルオキシソームタンパク質 Pex14-GFP のプロセッシング (ペキシソームの指標) をモニタリング。(D) Ape1 の成熟化 (Cvt 経路の指標) をモニタリング。

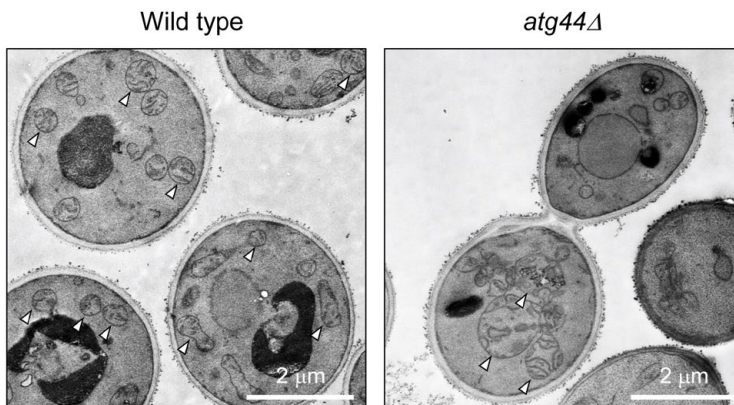


図 3: *atg44Δ* 株のミトコンドリアは野生株に比べて肥大化している
透過型電子顕微鏡によるミトコンドリア形態観察。*atg44Δ* 株は、ミトコンドリア分裂変異株特有のミトコンドリアの肥大化を示す。既知の分裂因子 *dnm1Δ* 株も同様の肥大化を示すが、マイトファジーには不要である。白い矢印がミトコンドリア。