

リン酸化が制御する出芽酵母のミトファジー

古川 健太郎, 神吉 智文

1. はじめに

オートファジーは、細胞質成分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、内容物をリソソーム（酵母や植物では液胞）に運び込み分解する現象であり、栄養飢餓などのさまざまなストレスによって誘導される¹⁾。近年、オートファジーには特定のタンパク質やオルガネラを選択的に分解する機構があることが明らかになってきた²⁾。ミトコンドリアを選択的に分解するオートファジーはミトコンドリアオートファジー（以下、ミトファジー）と称され、余剰に存在する、あるいは機能低下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品質管理に関わっていると考えられている³⁾。高等生物においては、ミトファジーの機能が破綻し、細胞内に不良ミトコンドリアが蓄積すると、神経変性疾患や老化現象などの要因となることが示唆されている⁴⁾。ミトファジーを人為的に制御することは、ミトコンドリア関連疾患治療につながると期待され、酵母からヒトまで多岐にわたるミトファジーの分子機構と生理的意義の全容解明は急務となっている。本稿では、ミトファジー研究の優れたモデル生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるミトファジー受容体 Atg32 の同定からそのリン酸化によるミトファジー誘導機構について述べた後、最近我々が見いだした Atg32 の脱リン酸化を介したミトファジーの抑制機構について紹介する。

2. 選択的オートファジーとしてのミトファジー

酵母におけるオートファジー研究の初期段階において、窒素源飢餓後に液胞内にミトコンドリアが多数存在するこ

とが電子顕微鏡を用いて観察されているが、これはミトコンドリアがオートファジーで分解されることを示す最初の報告である⁵⁾。当時は、オートファジーが選択的にミトコンドリアを分解しているかどうかや、その分子機構についてはまったく不明であった。その後、ミトコンドリア局在タンパク質に GFP を融合させることによってミトコンドリアを可視化し、GFP が液胞内に蓄積することを指標にミトファジーを容易に観察する手法が考案された。既知のオートファジー遺伝子がミトファジーに関与するかどうか調べたところ、そのほとんどがミトファジーに必須であった⁶⁾。このことは、ミトファジーは基本的にオートファジーと同じ分子機構を利用してミトコンドリアを分解していることを意味する。一方、選択的オートファジーとして知られていた Cvt 経路（特定のペプチダーゼの細胞質から液胞内への輸送経路）やベキソファジー（ペルオキシソームの選択的分解）に必須だが、非選択的オートファジーには不要である Atg11, Atg20, Atg24 などの因子がミトファジーにも必須であったことから、ミトファジーも選択的オートファジーの一つであると考えられた。

3. ミトファジー受容体 Atg32 の同定

Cvt 経路やベキソファジーでは、基質選択に関わる受容体タンパク質が知られており、ミトファジーにも特異的な受容体タンパク質が存在すると予想された。そこで、岡本らと我々によって、酵母遺伝子破壊株ライブラリーを用いたミトファジー不能株の網羅的スクリーニングが行われた^{7,8)}。既知のオートファジー関連遺伝子を含む多数の遺伝子が見いだされたが、この中に共通して機能未知遺伝子である *ATG32* が含まれていた。*ATG32* がコードする Atg32 は、529 アミノ酸残基からなり、1 か所の膜貫通ドメインを持つミトコンドリア外膜タンパク質である。Atg32 は、非選択的オートファジーや Cvt 経路やベキソファジーには関与せず、ミトファジー特異的な因子であった。また、Atg32 はミトファジー誘導条件下で選択的オートファジーのアダプタータンパク質 Atg11 と結合することが免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法で示され、Atg32 がミトコンドリア上の受容体として Atg11 と結合することでオートファジーの積荷としてのミトコンドリアを選択していると考えられた。

新潟大学大学院医歯学総合研究科・機能制御学分野（〒951-8510 新潟市中央区旭町通一番町757）

The budding yeast mitophagy regulated by phosphorylation

Kentaro Furukawa and Tomotake Kanki (Department of Cellular Physiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata 951-8510)
本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910224

© 2019 公益社団法人日本生化学会

4. マイトファジーの誘導スイッチとなる Atg32 のリン酸化

Atg32 特異的抗体を用いたウェスタンブロットによる Atg32 のバンドパターンの解析から、Atg32 はマイトファジー誘導時にリン酸化されること、さらにそのリン酸化部位が Ser114 と Ser119 の 2 か所であることが明らかとなった⁹⁾。特に、Ser114 を Ala に置換した変異体は、Atg11 との結合能がなく、マイトファジーをまったく誘導することができなかった。さらに、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* の PpAtg32 (Atg32 オルソログ) も Ser114 に相当する Ser159 残基を有しており、この変異体においてもマイトファジーの誘導はみられなかったことから¹⁰⁾、Atg32 のリン酸化は酵母において保存されたマイトファジーの重要な誘導スイッチであると考えられた。その後、酵母のプロテインキナーゼの遺伝子破壊株を用いたスクリーニングによって、カゼインキナーゼ 2 (CK2) が Atg32 のリン酸化に必須であることが見いだされた¹¹⁾。CK2 変異株や CK2 阻害剤を用いた解析および *in vitro* アッセイによって、CK2 はマイトファジーおよび Atg32-Atg11 の相互作用に必須であること、Atg32 は CK2 によって直接リン酸化されることが明らかとなった。Cvt 経路やペキソファジーでも類似の機構が解明されており、前者は Cvt 経路受容体 Atg19 のリン酸化が、後者はペキソファジー受容体 Atg36 のリン酸化が重要であることが知られている¹²⁾。しかしながら、そのリン酸化に関わるキナーゼは CK2 ではなく、カゼインキナーゼ 1 (Hrr25) であることから、選択的オートファジーの受容体は、目的に応じてキナーゼを使い分けていると考えられる。

5. Ppg1 はマイトファジーの抑制因子である

CK2 は常に活性を持った状態で細胞内に大量に存在するにもかかわらず、Atg32 のリン酸化はマイトファジー誘導時のみ起こる現象であることから、Atg32 のリン酸化を抑制する機構の存在が示唆された。我々は、Atg32 のリン酸化を抑制する因子をハイスループットかつ高感度に探索する方法として、マイトファジー誘導の初期段階において 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 (GFP 融合 Atg32 を用いて検出) する現象に着目した。マイトファジー非誘導条件下においても GFP-Atg32 の集積を示す変異株を網羅的に探索したところ、プロテインホスファターゼ Ppg1 が同定された¹³⁾。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、その結果としてマイトファジーの亢進がみられた。興味深いことに、Ppg1 欠損による Atg32 のリン酸化だけではマイトファジーは進行せず、オートファジーの誘導起点となる

Atg1 複合体の活性化が同時に起こる必要があることが明らかとなった。また、Ppg1 は Cvt 経路やペキソファジーの Atg19 および Atg36 のリン酸化制御には関与せず、マイトファジーに特異的に関与していた。

6. Ppg1 は Far 複合体と協調してマイトファジーを抑制する

Ppg1 が属する PP2A (protein phosphatase 2A) ファミリーホスファターゼは、特定の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¹⁴⁾。具体的には、Pph21 および Pph22 は Tpd3, Cdc55, Rts1 と結合し、Sit4 は Sap4, Sap155, Sap185, Sap190 と結合する。しかしながら、Atg32 のリン酸化抑制にはこうした活性調節因子および Ppg1 と相互作用すると報告されている因子は不要であったことから、未知の因子が Ppg1 の活性調節に関与すると推測された。そこで、Ppg1 の免疫沈降による共沈産物を質量分析により解析したところ、Far 複合体 (Far3, 7, 8, 9, 10, 11 の 6 タンパク質からなる) が同定された¹³⁾。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、Atg32 のミトコンドリア上での集積、マイトファジーの亢進がみられた。この結果から、Ppg1 と Far 複合体は協調して Atg32 を脱リン酸化することによってマイトファジーを抑制していることが示唆された。

7. Atg32 のマイトファジー抑制に関与する領域の同定

一般的に、ホスファターゼと基質の一過性の相互作用を検出することは困難であると考えられており、Ppg1 と Atg32 の相互作用も通常の免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法では検出することはできなかった。そこで、マイトファジーの抑制に Atg32 のどの領域が重要なのかについて、Atg32 の細胞質領域を N 末端側から 50 アミノ酸ごとに欠失させた変異体を用いて解析した。Atg32 のアミノ酸配列 151~200 番目の領域を欠失させると、Ppg1 欠損とほぼ同様の結果 (マイトファジー誘導条件非依存的な Atg32-Atg11 の相互作用と Atg32 の集積およびマイトファジーレベルの亢進) 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¹³⁾。

8. まとめと今後の展望

こうした報告をもとに、我々は CK2 と Ppg1-Far 複合体の競合による Atg32 のリン酸化制御を介したマイトファジーの制御機構を提唱する (図 1)¹³⁾。マイトファジー誘導条件下において、Ppg1 と Far 複合体は未解明のシグナルによって不活性化され、Atg32 を脱リン酸化することができ

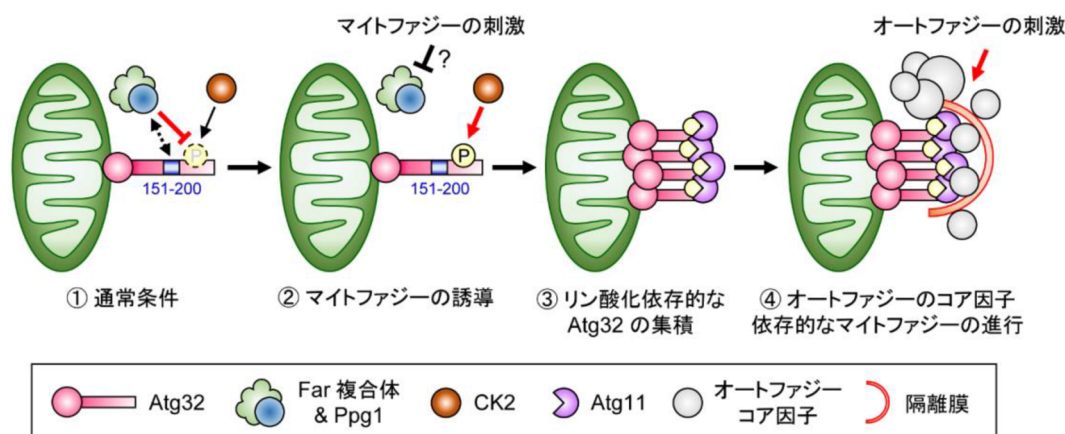


図1 酵母におけるマイトファジーの制御機構モデル

①通常条件下ではPpg1-Far複合体の作用によってAtg32のリン酸化は抑制されている。②マイトファジーの誘導条件下では、Ppg1-Far複合体よりもCK2が優位に働き、Atg32のリン酸化が起こる。③Atg32のリン酸化およびアダプタータンパク質Atg11依存的にAtg32はミトコンドリア上に集積する。④オートファジーのコア因子依存的にマイトファジーが進行する。

なくなり、結果的にAtg32はCK2によるリン酸化を受けることがマイトファジーの最初のステップとなる。次に解明すべき課題は、Ppg1とFar複合体を制御するシグナルの正体は何なのか、そのシグナルは傷害を受けたミトコンドリアから発信されるものなのか、そのシグナルはマイトファジーとオートファジーのコアな制御機構を同時あるいはまったく独立して活性化するものなのか、などである。今後は、これらの課題を明らかにすることでマイトファジーの制御機構の全容解明を目指したい。

また、哺乳類細胞においては、プロテインキナーゼPINK1とE3ユビキチンキナーゼParkinが仲介するマイトファジーと、Nix, BNIP3, FKBP8, FUNDC1, Bcl2-L-13などの受容体が仲介するマイトファジーが知られている³⁾。マイトファジーは真核生物において保存された現象であるものの、高等生物においては明確なAtg32やPpg1のホモログは認められないが、Far複合体はホモログとしてSTRIPAK (striatin-interacting phosphatase and kinase) 複合体が存在する¹⁵⁾。したがって、これら複合体のマイトファジーにおける役割と分子機構を解析することによって、酵母からヒトまで保存されたマイトファジーの制御機構が明らかとなるかもしれない。

謝辞

本稿は新潟大学大学院医歯学総合研究科・機能制御学分野、九州大学病院検査部、米国ミシガン大学Daniel J Klionskyラボで行った研究をもとに執筆しました。本稿で紹介した論文の共著者の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 458–467.
- 2) Farré, J.C. & Subramani, S. (2016) Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 537–552.
- 3) Youle, R.J. & Narendra, D.P. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 9–14.
- 4) Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, **147**, 728–741.
- 5) Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.*, **119**, 301–311.
- 6) Kanki, T. & Klionsky, D.J. (2008) Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J. Biol. Chem.*, **283**, 32386–32393.
- 7) Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell*, **17**, 87–97.
- 8) Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., & Klionsky, D.J. (2009) Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell*, **17**, 98–109.
- 9) Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., Uchiyumi, T., & Kang, D. (2011) Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 3206–3217.
- 10) Aihara, M., Jin, X., Kurihara, Y., Yoshida, Y., Matsushima, Y., Oku, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiyumi, T., et al. (2014) Tor and the Sin3-Rpd3 complex regulate expression of the mitophagy receptor protein Atg32 in yeast. *J. Cell Sci.*, **127**, 3184–3196.
- 11) Kanki, T., Kurihara, Y., Jin, X., Goda, T., Ono, Y., Aihara, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiyumi, T., et al. (2013) Casein

- kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Rep.*, **14**, 788–794.
- 12) Tanaka, C., Tan, L.J., Mochida, K., Kirisako, H., Koizumi, M., Asai, E., Sakoh-Nakatogawa, M., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2014) Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *J. Cell Biol.*, **207**, 91–105.
 - 13) Furukawa, K., Fukuda, T., Yamashita, S.I., Saigusa, T., Kurihara, Y., Yoshida, Y., Kirisako, H., Nakatogawa, H., & Kanki, T. (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.
 - 14) Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y., & Guan, K.L. (2005) Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 79–100.
 - 15) Kück, U., Beier, A.M., & Teichert, I. (2016) The composition and function of the striatin-interacting phosphatases and kinases (STRIPAK) complex in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, **90**, 31–38.

著者寸描

●古川 健太郎 (ふるかわ けんたろう)

新潟大学大学院医歯学総合研究科機能制御学分野特任助教。博士 (農学)。

■略歴 1977年福島県に生る。2000年東北大学農学部応用生物化学科卒業。05年同大学院農学研究科応用生命科学専攻博士課程修了。日本学術振興会特別研究員、スウェーデンヨーテボリ大学研究員などを経て、15年より現職。

■研究テーマと抱負 酵母におけるマイトファジーの制御機構に関する研究。今後は、システム生物学や合成生物学的手法を用いたマイトファジー (オートファジー) 研究を進めたい。

■ウェブサイト <https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

■趣味 旅行。