

研究題目 リン酸化を介した選択的ミトコンドリア分解の制御機構の解明

研究組織

研究代表者：岡本 浩二（大阪大学大学院生命機能研究科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：結城 詩央里（大阪大学大学院生命機能研究科）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

余剰または不良ミトコンドリアの丸ごと分別・除去は、生物種を超えて保存された基本的な機構であり、オートファジーの仕組みを利用していることから「マイトファジー」と呼ばれる。出芽酵母のマイトファジーにおいては、「分別標識」タンパク質 Atg32 がミトコンドリア表面に局在し、ユビキチン様タンパク質 Atg8 および「足場」タンパク質 Atg11 に直接結合する。Atg8 は隔離膜およびオートファゴソーム形成の実働因子であり、Atg11 はこれら膜形成に必要なコア Atg タンパク質群の集積に働く。すなわち、Atg32-8-11 複合体は、ミトコンドリアを分解基質とするオートファゴソーム形成の始動点として機能する（図1）。これまでの研究から、CK2 キナーゼが Atg32 をリン酸化し、Atg32-11 相互作用を安定化することで、マイトファジーが促進されると考えられる。また、Atg32 の S114, S119 が CK2 によりリン酸化される可能性が提起されている。

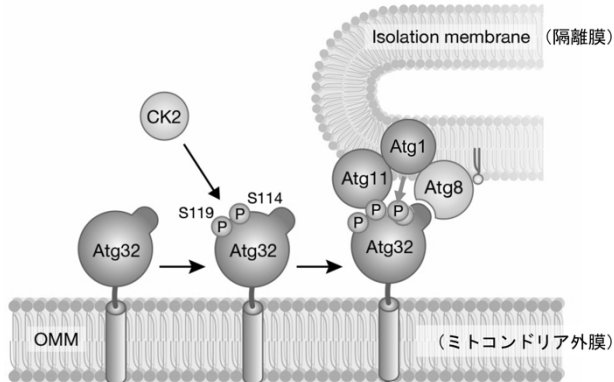


図1. Atg32のリン酸化を介したマイトファジー始動複合体の形成

私たちの研究グループは最近、コア Atg タンパク質 Atg1 キナーゼが、Atg8 および Atg11 と

の結合を介してマイトファジー始動複合体へリクルートされ、Atg32 のリン酸化に働くことで、Atg32-8-11 複合体をより安定化していることを明らかにした（図1）。そこで本研究では、精製タンパク質を用いた *in vitro* 反応系において、Atg1 によってリン酸化される Atg32 のアミノ酸残基を質量分析により同定する。

[1-2] 研究の方法・経過

精製タンパク質を用いた *in vitro* 反応系において、Atg1 による Atg32(1-340)のリン酸化を試みた。Atg32(1-340)は、ミトコンドリア表面に露出したドメインで、マイトファジー活性を持つ。反応サンプルを SDS-PAGE で分離し、CBB 染色した。その結果、Atg32(1-340)のリン酸化バンドシフトが起こることがわかった（図2）。この反応サンプルをプロテアーゼ処理し、得られたペプチドを質量分析計にて解析した。

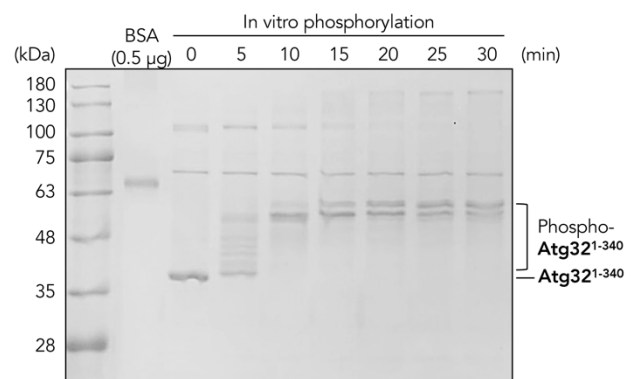


図2. Atg1によるAtg32のリン酸化反応（SDS-PAGE & CBB染色で解析）

【2】研究成果

[2-1] 本研究で明らかになった研究成果

質量分析の結果、Atg8 との結合に重要な Atg32 のモチーフ近傍の3つのセリンが、Atg1 によってリン酸化されていることが示唆され

た。そこで、これらセリンをアラニン置換した Atg32 変異体を酵母細胞で発現させ、機能解析を行った。興味深いことに、Atg1 依存的な Atg32 のリン酸化・Atg32-Atg8 相互作用・マイトファジーが部分的に抑制されることがわかった。これら *in vitro* および *in vivo* での知見から、Atg1 は Atg32 を直接リン酸化し、Atg32-Atg8 相互作用をより安定化することで、マイトファジーの進行に寄与していると考えられる。

[2-2] 本研究による波及効果及び今後の発展性

過去十数年の研究により、マイトファジーは酵母のような単細胞生物からヒトを含む多細胞生物にまで保存された、普遍的な仕組みであり、その分子機構には共通点が少なくないことがわかってきた。マイトファジーの破綻はミトコンドリアおよび細胞の恒常性を損ない、様々な異常を引き起こす。これら病態の解明や治療には、分子レベルの理解が不可欠である。

重要なことに、様々な生物種のマイトファジー駆動タンパク質は Atg8 との相互作用に必要な保存されたモチーフを有しており、Atg1 や Atg8 も生物種を超えてホモログが存在する。ゆえに、本共同研究で得られた Atg32 のリン酸化とその意義に関する知見は、他の生物種のマイトファジー制御を理解するための手がかりとなることが期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

- 1) Liu Y, Maruyama T, Yuki S, Kosako H, Noda NN, Okamoto K. Atg1 regulates mitophagy via Atg32 phosphorylation. 論文投稿準備中

[3-2] 学会発表

- 1) 岡本浩二. Atg1 キナーゼは出芽酵母の選択的ミトコンドリア分解の起点形成に働く. 酵母遺伝学フォーラム第 55 回研究報告会. 沖縄. 9 月 8 日. 2022 年

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究における質量分析で明らかとなった、Atg32 の Atg1 依存的リン酸化部位については、他にも 8 つのセリン残基が候補として同定されている。それらのうち、Atg32-Atg11 相互作用に関与する可能性のあるアミノ酸残基候補に

重点を置き、酵母細胞を用いた Atg32 変異体解析を進める予定である。

また、本研究を行う過程において、CK2 依存的な Atg32 のリン酸化が、S114, S119 以外のアミノ酸残基で起こる可能性を偶然見出した。そこで、来年度以降において、CK2 による Atg32 の新規リン酸化部位の同定を進めるとともに、酵母細胞を用いてそれらの分子機能を解析したいと考えている。