

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-Atg8-Atg11 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-Atg11 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。

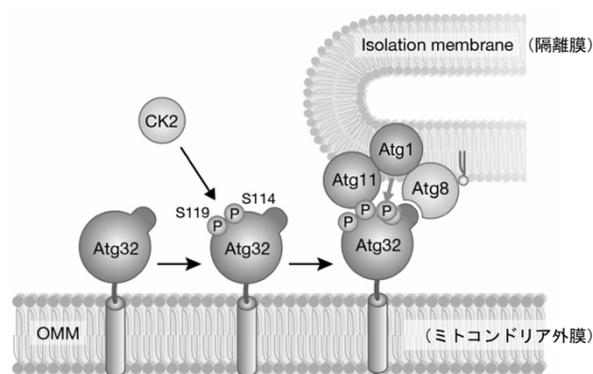


図1. Atg32のリン酸化を介したマイトファジー始動複合体の形成

私たちの研究グループはこれまでに、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

合体ヘリクルートされ、Atg32 のリン酸化に働くことで、Atg32-Atg8 相互作用をより安定化していることを明らかにしている。また最近、精製組換えタンパク質を用いた *in vitro* 反応系において、human CK2 (hCK2)が Atg32 をリン酸化することを見出した。そこで本研究では、hCK2 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、hCK2 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）。次に、Atg32(1-340)^{S114A/S119A} 変異体を用いて同様の実験を行ったところ、野生型で見られるバンドシフトは起こらない一方、シフトの小さい「リン酸化中間体」のようなバンドが生じることがわかった（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。

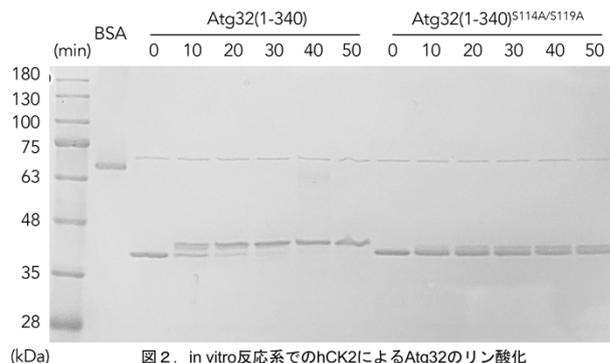


図2. *in vitro*反応系でのhCK2によるAtg32のリン酸化

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

質量分析の結果、Atg32のN末端近傍にあり、異種酵母ホモログ間で保存された機能未知のモチーフに存在するセリン残基 N-Ser が、hCK2によってリン酸化されていることがわかった。そこで、この N-Ser 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、誘導初期のミトファジーが 2-3 倍ほど亢進することがわかった。

[2-2]本共同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、ミ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、その基本原理には共通点が数多く存在することが明らかになっている。ミトファジーの破綻は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、ミトファジーについての分子レベルの理解が不可欠である。

これまで、CK2によるAtg32のS114やS119のリン酸化はミトファジーを促進することが示唆されていたが、N-Serのリン酸化では逆に誘導初期のミトファジーが抑制されることが示唆された。これは、同一のキナーゼがある時には負に、別の時には正に標的タンパク質の機能を制御する可能性を提起している。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

- 1) 中山 結稀、結城 詩央里、丸山 達朗、小迫 英尊、野田 展生、○岡本 浩二. Atg1 はミトファジー始動複合体をリン酸化し選択的ミトコンドリア分解を制御する. 酵母遺伝学フォーラム第 56 回研究報告会. 新潟. 8月31日. 2023年.
- 2) Koji Okamoto. Locking and unlocking mechanisms for mitophagy initiation in budding yeast. Cold Spring Harbor Asia Conference on Mitochondria and Metabolism in Health and Disease. Suzhou, China. November 2, 2023.
- 3) ○結城 詩央里、丸山 達朗、小迫 英尊、野田 展生、岡本 浩二. Atg1 キナーゼはミトファジー駆動因子 Atg32 をリン酸化し出

芽酵母の初期ミトファジーを促進する.
第 46 回日本分子生物学会年会. 新潟. 12月7日. 2023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

今後、どのような作用機序で、CK2によるN-Serのリン酸化がミトファジーを負に制御するのかを明らかにしてゆく。具体的には、N-Serをアラニン置換したAtg32変異体の発現量、リン酸化プロファイリング、Atg32-Atg8/11相互作用などを調べる予定である。