

## 酵母のミトファジー，～観察からの始まり～

## Mechanism of Mitophagy in Yeast

岡本 徳子<sup>a</sup>，岡本 浩二<sup>a</sup>，大隅 良典<sup>b</sup>

Noriko Okamoto, Koji Okamoto and Yoshinori Ohsumi

<sup>a</sup>大阪大学大学院生命機能研究科ミトコンドリア動態学研究室<sup>b</sup>東京工業大学フロンティア研究機構

**要旨** ミトコンドリアは、構造と機能の恒常性を維持するための様々な品質管理システムを備えている。その中の一つとして、ミトコンドリアを丸ごと除去する経路の存在が提唱され、それがオートファジーの仕組みを利用したものであることが最近示唆されてきた。著者らは、栄養飢餓によって誘導され、細胞質構成成分をバルク分解するオートファジーとは別の観点から、ミトコンドリアを選択的に除去する現象、「ミトファジー」を、酵母をモデルとした電子顕微鏡解析により明らかにした。また、蛍光顕微鏡を用いたアッセイ系を確立し網羅的可視化スクリーニングを行うことで、ミトファジーの鍵となるタンパク質 Atg32 を発見した。

キーワード：オートファジー，ミトコンドリア，酵母，品質管理，酸化ストレス

## 1. はじめに

ミトコンドリアは、細胞内のほとんどの ATP を産生し、生命維持に必須な役割を担うオルガネラである。一方、そのエネルギー変換の場、電子伝達系では、活性酸素種が発生し、ミトコンドリア自身に酸化障害を与えることが知られている。ミトコンドリアは酸化ストレスに対抗するために、抗酸化酵素をはじめ、損傷を受けたミトコンドリア DNA (mtDNA) の修復・除去システムや独自のタンパク質分解の経路を持っている。ダメージのレベルがこれらの経路の処理能力を超え、このオルガネラの恒常性が維持されなくなった際、ミトコンドリア丸ごとの分解が細胞にとって極めて重要になると考えられてきた<sup>1)</sup>。これまでに、ほ乳類ではミトコンドリア機能の破綻が種々の病態と関連していることが報告され<sup>2)</sup>、選択的ミトコンドリア分解機構の重要性が提唱されてきたものの、その分子機序は最近まで不明であった。

オートファジーは、ダイナミックな膜動態を伴って、細胞質内のタンパク質やオルガネラを丸ごと分解する、酵母からヒトまで保存された普遍的な機構である<sup>3)</sup>。出芽酵母では、その遺伝学的特性を活かし、オートファジー関連 (*ATG*, *AuTophagy-related*) 遺伝子が現時点で 33 個同定されている。オートファジーの誘導がかかると、まず細胞内に隔離膜と呼ばれる膜 (野球のミット様) が出現し、分解される細胞質成分が膜の進展と共に徐々に包まれて、その膜が閉じられ、カ

プセル様のオートファゴソーム (autophagosome; AP) が完成する。その後、AP 外膜はリソソーム (酵母では液胞) と融合し、AP 内膜で包まれたオートファジックボディ (autophagic body; AB) が液胞へ取り込まれ、分解酵素によって分解される。これまでの研究で、Atg タンパク質は 5 つの機能グループに分けられ、分子メカニズムが明らかにされてきた<sup>3)</sup>。オートファジーは主に、栄養飢餓時の大規模かつ非選択的な分解システム (細胞内のリサイクル) として知られてきたが、その他にも、ペルオキシソーム<sup>4)</sup> や小胞体<sup>5)</sup> といったオルガネラ、リボソーム<sup>6)</sup>、異常なタンパク質などの特定のターゲットに対して働く、選択的なオートファジーの存在も近年明らかとなってきている<sup>7)</sup> (図 1 参照)。

本稿では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルとして、現象の観察から始まったミトファジー研究からその分子基盤の一端が明らかにされるまでの経緯と、今後の取り組むべき課題について解説する。

## 2. ミトコンドリア分解の誘導と Atg タンパク質群

ミトファジーの存在は長い間示唆されながらも、ミトコンドリアが実際に選択的に分解される現場、ミトコンドリアに特化された動態メカニズムの有無すらも謎のままであった。まず著者らは、液胞内分解酵素欠損株 *pep4* (液胞内の構造体が分解されずに蓄積するので、分解中間体の形態観察が可能) にミトコンドリアのマーカー mito-GFP を発現させて、様々な条件で培養し、その局在パターンを調べた。その結果、ミトコンドリアの活性を必要とする呼吸増殖条件である、グリセロール培地で細胞を培養すると、2 日後あたりから液胞パターンの GFP 蛍光が見られることを見いだした。

<sup>1)</sup> 〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3 D808  
TEL: 06-6879-7970; FAX: 06-6879-7970  
E-mail: nokamoto@fbs.osaka-u.ac.jp  
2010 年 2 月 22 日受付

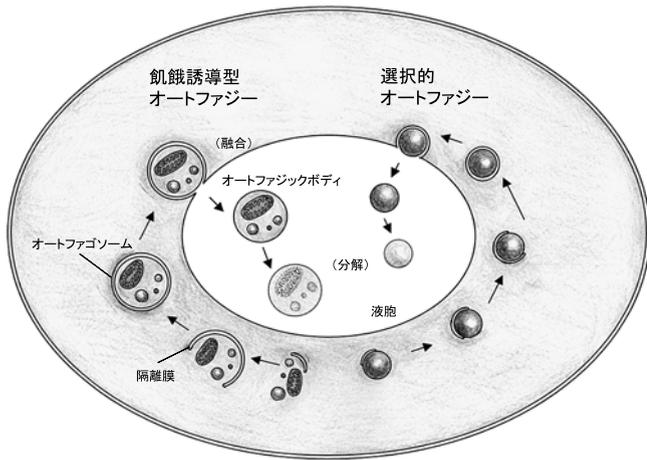


図1 酵母のオートファジー

この局在パターンは、ミトコンドリアが液胞へ移行したことを示している。とりわけ、細胞が増殖を停止した状態において（静止期）、mito-GFPの液胞パターンが顕著となる。図2に示すように、オートファジーのコア因子であるAtg7の欠失で、mito-GFPの液胞パターンが見られなくなることから、オートファジー依存的な現象であることが明らかとなった<sup>8)</sup>。このマイトファジーの誘導条件の確立と可視化が、分子機構解明への糸口となった。

次に上記の酵母株 *pep4* を用いて、グリセロール培地で培養し、電子顕微鏡による解析を行った。図3に示すように、電子密度の高い構造体が多数、液胞内へ取り込まれていることがわかった。この現象は前述のAtg7の欠失により見られなくなる<sup>8)</sup>。また、ミトコンドリアの内膜タンパク質であるAtp2 (F1β)の免疫染色の結果から、電子密度の高い構造体はミトコンドリアであることが明らかとなった。この構造体を含むマイトファジックボディ (mitophagic body; MB) には、細胞質成分が見られない。以上のことから、ミトコンドリアの分解がオートファジーの分子装置を介して、選択的に起こっていることが初めて明確に示された。

そこで、上記のアッセイ系を用いて、*atg* 遺伝子破壊株を解析したところ、マイトファジーはAP様膜構造の形成に必要なコア因子を必要とする一方、飢餓誘導型オートファジーに特異的なAtgタンパク質 (Atg17<sup>9,10)</sup>, Atg29<sup>11)</sup>, Atg31<sup>12)</sup>を必要としないことが明らかとなった。また興味深いことに、マイトファジーにはAtg11が必須であることがわかった<sup>8,13)</sup>。Atg11はサイトゾルにある液胞内酵素を液胞へと運ぶオートファジー様の経路<sup>14)</sup> (Cvt経路) や、ペキソファジー<sup>4)</sup> (ペルオキシソームのオートファジー) など、選択的なオートファジーに重要であり、飢餓誘導型のオートファジーには必要でない<sup>15)</sup>。これまでの知見から、Atg11はAP様膜構造の形成にかかわる因子群が分子集合する際の「足場」として機能すると考えられ、積み荷 (タンパク質やオルガネラ) をつなぎとめる「アダプター」として働いていると考えられている<sup>4,8,16)</sup>。液胞内分解酵素の欠損株 *pep4 prb1* を用いて、グリ

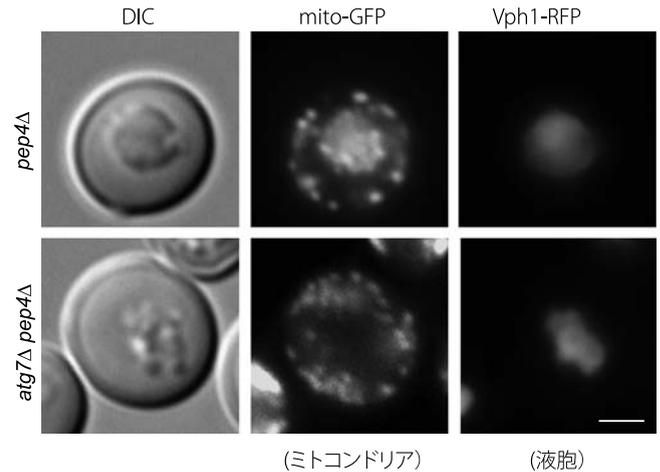


図2 液胞内酵素Pep4を欠損させた株のグリセロール培養5日目。ミトコンドリアマーカー (mito-GFP) と液胞マーカー (Vph1-RFP) を発現した細胞の蛍光顕微鏡イメージ。スケール: 2 μm。

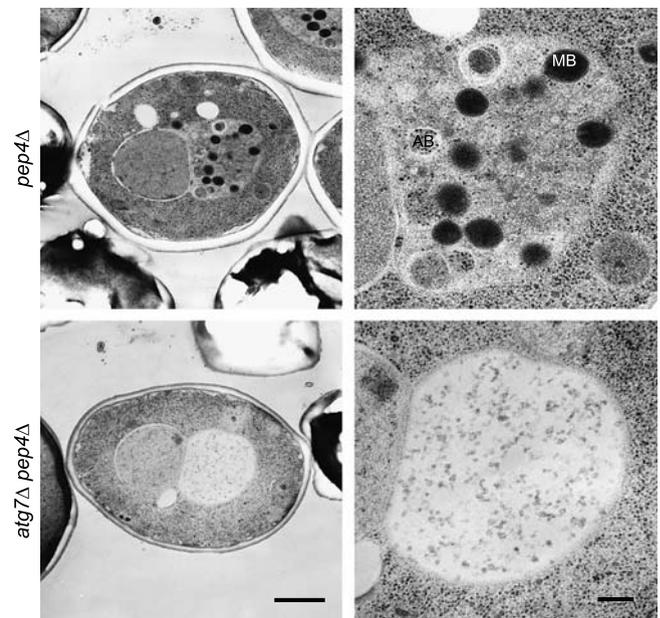


図3 グリセロール長期培養下の酵母細胞 (液胞内酵素Pep4欠損株) の電子顕微鏡イメージ。オートファジーのコア因子Atg7欠失により、液胞内に構造体の蓄積が見られなくなる (下段)。AB: オートファジックボディ。MB: マイトファジックボディ。スケール: 左1 μm, 右200 nm。

セロール培養条件下、静止期 (細胞が増殖期を経た後、生育が止まった状態) に入った細胞を電子顕微鏡で観察すると、Atg11を欠失した株でABは見られるものの、MBは見られない (図4)。一方で、Atg17を欠失した株ではMBは見られるものの、ABは見られない。Atg17は、飢餓誘導型オートファジーに必要な因子で、Atg11と同様にコアAtgタンパク質が集合する際の足場として機能すると考えられている<sup>9,10)</sup>。Atg11, Atg17を共に失欠させると、AB・MBの両者とも見られない。細胞はミトコンドリア分解にオートファ

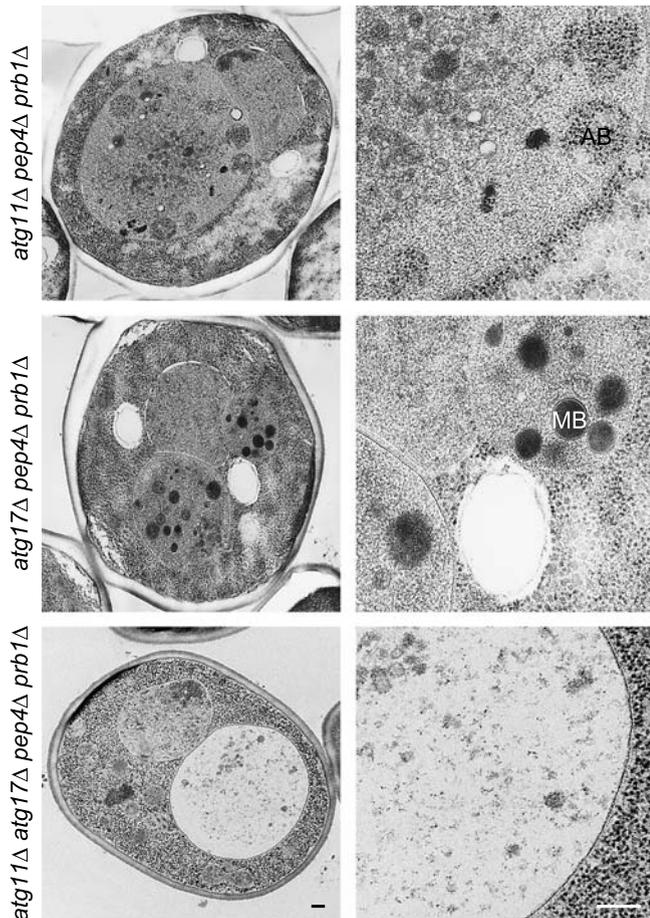


図4 グリセロール長期培養下の酵母細胞 (Pep4, Prb1 欠損株) の電子顕微鏡イメージ。Atg17 欠損株にはオートファジックボディ (AB) は観察されないが、マイトファジックボディ (MB) が観察される。Atg11 欠損株はその逆である。スケール: 200 nm。

ジューのコア因子を利用しながらも、一部の Atg タンパク質を使い分けているようである。

### 3. Atg32

マイトファジーに関わる因子を同定するため、著者らのグループでは酵母非必須遺伝子欠損株ライブラリー (約 5150 株) に前述の mito-GFP を形質転換し、それらをグリセロール培養して、一つ一つ観察した (網羅的可視化スクリーニング)。その際、mito-GFP の液胞への移行が阻害されている変異株を選別した。その表現型を 5 段階のレベルに分け、顕著にミトコンドリアの液胞への取り込みが阻害されていた欠損株グループとして、計 53 株を選び出した (オートファジーのプロセスで機能する主要 ATG 遺伝子欠損株を含む)<sup>8)</sup>。その変異株の欠損因子として、未知のタンパク質を含め、膜輸送、タンパク質修飾、ミトコンドリア代謝等に関与するなど、細胞内の多様なプロセスで機能するものが含まれていた。中でも、最も顕著にミトコンドリアの液胞への取り込みが阻害されている変異株の欠損遺伝子を ATG32 として同定した<sup>8)</sup>。

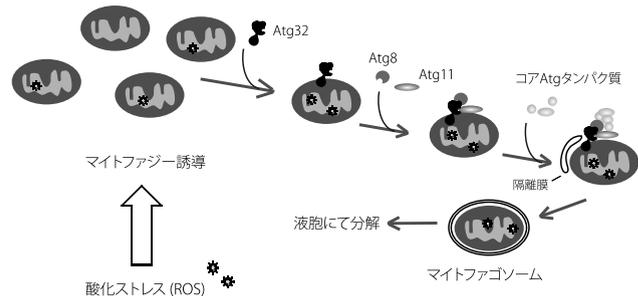


図5 Atg32 が制御する選択的ミトコンドリア分解のモデル

時をほぼ同じくしてミシガン大学 Klionsky 研究室の神吉らも非発酵性炭素源の乳酸培地を用いてマイトファジー欠損株のスクリーニングをおこない、同じ遺伝子 ATG32 を報告している<sup>17)</sup>。

Atg32 は 59 kDa の一回膜貫通タンパク質で、N 末側を細胞質に、C 末側をミトコンドリア膜間部に配向している。細胞質側ドメインには Atg8 ファミリーとの結合に直接関与する WXXI/L/V モチーフを持ち<sup>18)</sup>、このドメインを介して Atg8 と相互作用する。Atg8 はユビキチン様タンパク質で、AP 膜に局在し、膜形成に必須の役割を果たすコア因子である<sup>19)</sup>。Atg11 に対しても相互作用が確認されたことから、Atg32 がこれらの因子と結合することで、他の Atg タンパク質群を導き、マイトファゴソームが形成されると考えられる。興味深いことに、グリセロール培養時において、Atg32 のタンパク質レベルは、マイトファジーが検出される前に一過的に発現量のピークを迎え、その後減少する。また、抗酸化剤である N-アセチルシステインの処理により、Atg32 の発現が部分的に抑えられることから<sup>8)</sup>、マイトファジーの誘導に酸化ストレスが関与していると考えられる。これまでのデータから作業仮説として、ミトコンドリアが酸化ストレスを受け、ミトコンドリア表面での Atg32 のレベルが上昇すると、Atg11 や Atg8 との相互作用を経て、マイトファゴソーム形成が起こり、その後は通常のオートファジーと同じく液胞と融合し、液胞内にて分解されると予想される<sup>20)</sup> (図5 参照)。

### 4. 今後の課題

どのようにマイトファジーの誘導がかかるのだろうか? 一方で、細胞のエネルギー工場としてのミトコンドリアの機能を考えると、過剰の分解を抑制することも極めて重要である。また、除去すべきミトコンドリアだけがどのように認識され、隔離されているのだろうか? 生化学的なアプローチと共に、細胞内での個別のミトコンドリアの変化 (膜電位、活性酸素種等) を *in vivo* で経時的に検出できる定量解析顕微鏡システムの活用や、タンパク質の挙動を分子レベルで追ってゆく高感度のライブイメージングが有効かもしれない。

現在のところ、一次配列データからは、Atg32 と Atg11 の多細胞生物でのホモログは見つけれられていない。ほ乳類では、膜電位の下がったミトコンドリアにユビキチンリガーゼ

である Parkin が局在し、マイトファジーに働いていると報告されている<sup>21)</sup>。ミトコンドリア品質管理と神経変性疾患等の病態とのリンクが注目を集めていることから、ほ乳類におけるマイトファジーのメカニズムの解明に向けて期待が高まっている。今後、酵母での分子メカニズムの解明を足がかりに、選択的ミトコンドリア分解の全貌が明らかにされるであろう。

#### 文 献

- 1) Tatsuta, T. and Langer, T.: *EMBO J.*, **27**, 306–314 (2008)
- 2) Wallace, D.C.: *Ann. Rev. Genet.*, **39**, 359–407 (2005)
- 3) Nakatogawa, H. *et al.*: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 458–467 (2009)
- 4) Farre, J.C. *et al.*: *Dev. Cell*, **14**, 365–376 (2008)
- 5) Bernales, S. *et al.*: *PLoS Biol.*, **4**, e423 (2006)
- 6) Kraft, C. *et al.*: *Nat Cell Biol.*, **5**, 602–610 (2008)
- 7) Kraft, C. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1793**, 1404–1412 (2009)
- 8) Okamoto, K. *et al.*: *Dev. Cell*, **17**, 87–97 (2009)
- 9) Kabeya, Y. *et al.*: *Mol. Biol. Cell*, **5**, 2544–2553 (2005)
- 10) Cheong, H. *et al.*: *Mol. Biol. Cell*, **7**, 3438–3453 (2005)
- 11) Kawamata, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1884–1889 (2005)
- 12) Kabeya, Y. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **356**, 405–410 (2007)
- 13) Kanki, T. and Klionsky, D.J.: *J. Biol. Chem.*, **283**, 32386–32393 (2008)
- 14) Yorimitsu, T. and Klionsky, D.J.: *Mol. Biol. Cell*, **4**, 1593–1605 (2005)
- 15) Meijer, W.H. *et al.*: *Autophagy*, **2**, 106–116 (2007)
- 16) Shintani, T. *et al.*: *Dev. Cell*, **3**, 825–837 (2002)
- 17) Kanki, T. *et al.*: *Dev. Cell*, **17**, 98–109 (2009)
- 18) Noda, N.N. *et al.*: *FEBS Lett.*, **584**, 1379–1385 (2010)
- 19) Nakatogawa, H. *et al.*: *Cell*, **130**, 165–178 (2007)
- 20) Okamoto, K. *et al.*: *Autophagy*, **5**, 1203–1205 (2009)
- 21) Narendra, D. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **183**, 795–803 (2008)