酵母に学ぶマイトファジーの機構と生理機能

福田智行, 神吉智丈

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 1-757

要旨: ミトコンドリアは酸素呼吸により細胞に必要なエネルギーの大半を作り出すオルガネラである。一方、呼吸の副産物としてミトコンドリアからは活性酸素が生じ、細胞成分に障害を与えてしまう。したがって、健全な細胞活動のためには、ミトコンドリアの量と質が適切にコントロールされている必要がある。オートファジーによるミトコンドリアの選択的な分解は、真核細胞が余分あるいは異常なミトコンドリアを取り除く手段の1つと考えられている。マイトファジーとよばれるこの反応は、ミトコンドリアの一部を二重膜で囲まれたオートファゴソーム内に包みこみ、次いでリソソームあるいは液胞と融合することで分解する。マイトファジーの機構や制御の理解に、出芽酵母をモデルとした研究は大きく貢献してきた。出芽酵母のミトコンドリア外膜に存在する Atg32 はマイトファジーに特異的なレセプターとしてはたらくし、オートファジー因子と直接作用することで、分解するミトコンドリアとオートファゴソーム形成の場とを結びつける。また、マイトファジーの誘導は Atg32 の転写や翻訳後修飾を介して厳密に制御されている。さらに、Atg32 はマイトファジーに特異的な因子であるため、その欠損株の表現型解析によりマイトファジーの生理的な意義を検証することが可能である。本稿では、Atg32 を中心に酵母で明らかにされたマイトファジーの機構や制御、意義について紹介する。

Molecular mechanism and physiological functions of mitophagy in yeast

Tomoyuki Fukuda, Tomotake Kanki

Department of Cellular Physiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 1-757 Asahimachi-dori, Niigata, 951-8510 Japan

Authors for correspondence: T. Fukuda, tfukuda@med.niigata-u.ac.jp, T. Kanki, kanki@med.niigata-u.ac.jp

Summary: In eukaryotic cells, mitochondria serve as the central source of cellular energy. As a byproduct of energy production, mitochondria also generate reactive oxygen species. Because accumulation of oxidative damage causes diverse pathologies, cells must maintain a proper pool of functional mitochondria in response to energetic demands and various stimuli. Selective removal of mitochondria by autophagy, called mitophagy, is thought to contribute to elimination of excess or dysfunctional mitochondria to maintain mitochondrial homeostasis. Mitophagy is a catabolic process where a part of mitochondria is engulfed into double-membrane vesicles termed autophagosomes, which then fuse with lysosomes/vacuoles, resulting in cargo degradation by lysosomal/vacuolar proteases. Studies using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism have significantly contributed to the understating of the mechanism, regulation, and functional roles of mitophagy. In *S. cerevisiae*, Atg32, a mitochondrial surface protein, is a key molecule in mitophagy, serving as a mitophagy receptor that connects a part of mitochondria to the autophagy machinery through its direct interaction with autophagy proteins required for autophagosome formation. Mitophagy induction in yeast is tightly controlled through transcriptional and post-translational regulations of Atg32. Furthermore, physiological functions of mitophagy have been explored using cells deleted for Atg32 as mitophagy-deficient mutants since Atg32 is a mitophagy-specific protein. In this review, by focusing on yeast mitophagy, we overview recent advances in our understanding of the molecular mechanism and physiological functions of autophagic degradation of mitochondria.

Key words: Atg32, autophagy, mitochondria, mitophagy, yeast

はじめに

ミトコンドリアは細胞全体の約10~20%を占めるオルガネラで、多種の代謝経路、細胞死、カルシウム恒常性の維持といった様々な細胞機能において必須の役割を果たす。中でもミトコンドリアで生じる酸素呼吸は、細胞の活動に必要なエネルギーの大半を産み出す重要な反応である。一方、呼吸の副産物としてミトコンドリアからは絶えず活性酸素が発生してしまう。通常、活性酸素は抗酸化酵素により除去されるため、酸化還元状態のバランスは維持されるが、疾患や老化、ミトコンドリアの機能低下などによりこのバランスが崩れると、細胞に重篤な酸化ストレスが引き起こされてしまう。そこで、細胞は機能の低下したミトコンドリアや、余分なミトコンドリアを取り除く必要がある。

マイトファジーとよばれる、選択的なオートファジーがミトコンドリアを分解する反応は、ミトコンドリアの量と質のコントロールを司る経路の1つと考えられている。近年、パーキンソン病のようなヒトの神経変性疾患とマイトファジー機能不全との関わりが示唆されており、マイトファジーは注目の対象となっている。

マイトファジーはオートファジーの一種であるため、オートファジーに関わる因子のほとんどがマイトファジーにもはたらく。本来オートファジーは選択制のない異化反応経路である(図1)。隔離膜とよばれる二重膜の構造が細胞質で構築され、伸長して細胞質成分をランダムにとり囲み、オートファゴソームとよばれる小胞を形成する。オートファゴソームがリソソームあるいは液胞と融合すると、加水分

図1 オートファジーによる細胞質成分の分解。オートファジーの誘導により形成された隔離膜が伸長し、オートファゴソームが構築される。オートファゴソームはリソソームあるいは液胞と融合することで、内容物を分解する。

解酵素のはたらきにより内容物が分解される。こうしたオートファジーの機構は、ノーベル賞を受賞した大隅良典教授のグループを中心に、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をモデルとした研究によって進展してきた。とりわけ、オートファゴソーム形成に関わる Atg タンパク質群の同定と解析により、オートファジー機構の理解が飛躍的に進んだ。その後、オートファジーの基質の一部は選択的にオートファゴソームへ取り込まれることが分かり、ミトコンドリアに加え、ペルオキシソーム、リボソーム、小胞体、リソソームのようなオルガネラや、タンパク質凝集体、出芽酵母の特定の分解酵素 (Ape1, Ams1 タンパク質) などが選択的オートファジーの基質として同定されている。こうした選択的オートファジーの機構や制御の理解にも、酵母を用いた研究が多大な貢献を果たしている。本稿では出芽酵母のマイトファジーに焦点を当て、その機序と生理機能について解説する。

Atg32はマイトファジーのレセプターとして機能する

出芽酵母におけるマイトファジー研究のブレイクスルーとなったのは、マイトファジーを検出する手法の確立と、遺伝学的探索によるマイトファジー因子の同定だといえる。初期の出芽酵母のオートファジー研究では、マイトファジーによって液胞に取り込まれたミトコンドリアが電子顕微鏡で観察されていた (Takeshige et al. 1992)。その後、GFPなどの蛍光タンパク質をミトコンドリアタンパク質に付加して発現することで、液胞に運ばれたミトコンドリアタンパク質を蛍光顕微鏡観察で検出したり、液胞でのミトコンドリアタンパク質の分解をウェスタンブロッティングで検出したりすることが可能になった (Kissova et al. 2004, Kanki and Klionsky 2008)。こうした比較的簡便な検出系を用いて様々な遺伝子破壊株のマイトファジーが解析された結果、オートファジーに必要な Atg タンパク質のほとんどがマイトファジーにも必要であることが見出された。一方で、

Atg11, Atg20, Atg24 のような、非選択的なオートファジーには必須ではないが選択的オートファジーには必要な因子の遺伝子破壊株がマイトファジー欠損を示すことから、マイトファジーは選択的オートファジーであることが遺伝学的に明らかにされた (Kanki and Klionsky 2008, Kanki et al. 2009, Okamoto et al. 2009)。

選択的オートファジーには標的ごとに特異的なレセプター分子が存在し、選択性の原動力となっている。いずれも標的の表面に局在して分解の目印となり、オートファジー因子との相互作用を介して標的とオートファゴソーム形成の場とを結びつける。Atg32 タンパク質は、出芽酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを用いた網羅的因子探索によりマイトファジーに必須の因子として同定され、詳細な解析からレセプターとしてはたらくことが示された (Kanki et al. 2009, Okamoto et al. 2009, Kondo-Okamoto et al. 2012)。Atg32 はミトコンドリア外膜に存在する一回膜貫通タンパク質で、N末端を細胞質に、C末端を膜間腔に露出する。細胞質にある Atg32 の N末端領域はオートファジー因子の Atg8 と Atg11 に直接結合する (図2)。Atg32 と Atg8 の結合は Atg32 の N末端領域に存在する Atg8-family interacting motif (AIM) あるいは LC3-interacting region (LIR) とよばれるコンセンサス配列 (W/F/Y)XX(L/I/V) に依存する。AIM あるいは LIR は選択的オートファジーのレセプターに共通して見られる配列で、レセプターと Atg8 あるいは LC3 (Atg8 の哺乳類ホモログ) との結合を司る配列である。また、Atg11 との結合に必要な領域に見られる (I/V)LS という配列も、出芽酵母の選択的オートファジーのレセプター間でよく保存されている。Atg8 はリン脂質のフォスファチジルエタノールアミンに共有結合するユビキチン様タンパク質で、隔離膜に局在してオートファゴソームの形成に重要な役割を果たす。一方、Atg11 はオートファゴソーム形成に関わる因子群が集合する足場となるタンパク質で、選択的オートファジーの標的とオートファジータンパク

質群をつなぐアダプターとして機能する。これら Atg8 や Atg11 との相互作用を介して、Atg32 はオートファゴソーム形成に関わる因子群をミトコンドリアに集合させて、分解へと導くレセプターとしてはたらく。

図2 ミトファジーのレセプターとしてはたらく Atg32. ミトコンドリア外膜に局在する Atg32 は分解の目印となり、オートファジー因子の Atg11 と Atg8 に結合することでオートファゴソーム形成の場をミトコンドリアにリクルートする。

Atg32 を介したミトファジーの誘導制御

出芽酵母に効率よくミトファジーを誘導させるためには、あらかじめグリセロールや乳酸のような非発酵性の炭素源を含む呼吸培地で培養し、そのまま定常期まで培養し続けるか、あるいはグルコースを炭素源とする窒素源欠乏培地に移すことで窒素源飢餓状態にする (Kissova et al. 2004, Kanki and Klionsky 2008). 呼吸培地での培養はミトコンドリアの量を増加させるとともに、*ATG32* 遺伝子の転写も誘導する。*ATG32* 遺伝子の転写制御には DNA 結合タンパク質 Ume6 とヒストン脱アセチル化酵素複合体 Sin3-Rpd3 が関与している (Aihara et al. 2014). これらのタンパク質は *ATG32* 遺伝子の転写発現を抑制しており、飢餓や呼吸培地での生育ではこの抑制が外れることにより *ATG32* が誘導されると考えられている。Ume6 と Sin3-Rpd3 は *ATG8* 遺伝子の転写制御にも関与することから (Bartholomew et al. 2012), Atg32 はオートファジー因子と共にその発現が制御されているといえる。

ミトファジーを誘導した細胞を抗酸化剤 N-acetylcysteine (NAC) で処理するとミトファジーが減少することから、活性酸素がミトファジーを促進すると考えられてきた。ミトファジーと同様に Atg32 の発現も NAC 処理により減少するため (Okamoto et al. 2009), Atg32 の発現誘導がミトファジー誘導制御の初発反応かもしれない。NAC 処理はグルタチオンの代謝にも影響するため、Atg32 の発現やミトファジーの誘導は細胞の酸化還元状態に依存している可能性も指摘されている (Deffieu et al. 2009). 他にも、Atg32 の発現はタンパク質 N 末端アセチル化酵素 NatA の欠損株でも減少することが見出されている (Eiyama and Okamoto 2015). NatA はリボソームと結合し、新生ポリペプチド鎖の N 末端のアミノ酸残基に対して、アセチル CoA からアセチル基を転位させる。そのため、NatA の基質の中に *ATG32* の転写制御に関わる因

子が含まれていると予想されている。また、*ATG32* の転写はリン脂質のメチル化の影響を受けることが報告されている (Sakakibara et al. 2015). このリン脂質のメチル化は還元型グルタチオンの量にも影響することから、細胞の酸化還元状態に依存して *ATG32* の発現量を変動させているかもしれない。

転写制御に加え、Atg32 は翻訳後修飾による調節も受ける。主要な修飾として、ミトファジー誘導時に検出される Ser¹¹⁴ と Ser¹¹⁹ 残基におけるリン酸化が見出されている (Aoki et al. 2011). とりわけ Ser¹¹⁴ のリン酸化はミトファジーおよび Atg32 と Atg11 の結合に必要であり、Atg32 と Atg8 との結合には影響しない (Aoki et al. 2011, Kondo-Okamoto et al. 2012). 出芽酵母のプロテインキナーゼの破壊株を用いた網羅的なスクリーニングから、カゼインキナーゼ 2 (CK2) が Ser¹¹⁴ と Ser¹¹⁹ をリン酸化するキナーゼとして同定されている (Kanki et al. 2013). CK2 の欠損株では Atg32 のリン酸化が減少し、Atg32 と Atg11 の結合やミトファジーも低下するため、CK2 による Atg32 のリン酸化はミトファジーを促進するといえる。CK2 は恒常的に発現しているため、ミトファジー誘導条件にのみ Atg32 のリン酸化を上昇させる未知の機構が存在していると考えられる。

Atg32 がリン酸化以外の翻訳後修飾を受けることも知られている。ミトコンドリア膜間腔にある Atg32 の C 末端領域は、ミトファジー誘導時にプロセシングを受けて短くなる (Wang et al. 2013). このプロセシングはミトコンドリアの i-AAA (ATPase associated with various cellular activities) プロテアーゼ Yme1 を必要とする。C 末端へのエピトープタグの付加あるいは Yme1 の遺伝子破壊によりこのプロセシングを阻害すると、ミトファジーは減少する。また、Yme1 の遺伝子破壊株では Atg32 と Atg11 との相互作用も低下することから、C 末端領域のプロセシングが隔離膜の形成に影響する可能性が示唆されている。この C 末端でのプロセシングの他にも、ウェスタンブロッティングで検出される Atg32 の分子量を 20 kDa 増大させる非リン酸化系の修飾も見出されている (Levchenko et al. 2016). この修飾は液胞でのタンパク質分解を阻害する際に観察されることから、通常は修飾を受けた Atg32 は効率よく分解されていると予想される。さらに、この修飾にはオートファジー因子が必要なことから、修飾とオートファゴソームの形成がリンクしている可能性がある。

ミトファジーに影響する Atg32 以外の因子

ミトファジーのレセプターとしてはたらく Atg32 の他にも、ミトファジーに影響する様々な因子や要因が同定されている。以下に代表的なものとして、ミトコンドリアと小胞体間の接触と、ミトコンドリア分裂の関与について紹介する。

近年、哺乳類細胞においてオートファゴソームは小胞体とミトコンドリアの接触部位で形成されることが報告されている。ミトファジーのような選択的なオートファジーが生じる場についての詳細な解析はないものの、出芽酵母においてミトコンドリアと小胞体との接触に必要な ER-mitochondria encounter structure (ERMES) 複合体がミトファジーに関与することが見出されている (Bockler and Westermann 2014). ERMES の欠損株ではミトファ

ジーが減少するものの、この欠損株で人為的にミトコンドリアと小胞体を接触させるとマイトファジーが回復することから、ERMES自体ではなくミトコンドリアと小胞体の接触がマイトファジーに重要な役割を果たしているといえる。ERMESはマイトファジー誘導時にAtg32やオートファゴソーム形成が完了しない。したがって、隔離膜が伸長してミトコンドリアを包む際に、ERMESはオートファゴソーム形成の場を小胞体に近接させることで、小胞体から膜の伸長に十分な量の脂質が供給されるようにしているかもしれない。また、ERMESの構成因子の一部(Mdm34とMdm12)のユビキチン化がマイトファジーを促進することも報告されている(Belgareh-Touze et al. 2017)。

ミトコンドリアは分裂と融合により、その形態やサイズを調整する。ミトコンドリアのサイズはオートファゴソームに比べてはるかに大きいため、隔離膜で包みこむためにはミトコンドリアを分裂させて小さな断片を作り出すことが必要だと長らく考えられてきた。実際に、酵母のミトコンドリア分裂に関わるダイナミン様タンパク質Dnm1は、Atg11と結合することでミトコンドリア上のオートファゴソーム形成の場にリクルートされる(Mao et al. 2013)。一方で、Dnm1の欠損株でも相当量のマイトファジーが認められることから、Dnm1に依存しない形でミトコンドリアが分裂して断片化が生じる可能性が示唆されてきた。同様に、哺乳類細胞では分裂因子Drp1(Dnm1の哺乳類ホモログ)を欠損しても、マイトファジーは正常に生じる(Yamashita et al. 2016)。また、哺乳類細胞にマイトファジーを誘導すると、オートファゴソーム形成の場においてDrp1に依存せずにミトコンドリアの一部が断片化して隔離膜に包まれる様子が観察されている。こうした既知の分裂因子に依らないミトコンドリア断片化の機序については、今後の研究の発展に興味をもたれる。

マイトファジーの生理的意義

哺乳類では、マイトファジーが多様な生理機能を果たすことが知られている。例えば、赤血球の発生段階におけるミトコンドリアの除去はマイトファジーを必要とする(Schweers et al. 2007, Sandoval et al. 2008)。また、寒冷刺激に応じて白色脂肪細胞はミトコンドリアを多く含むベージュ細胞へと分化して熱産性能を上昇させるが、刺激がなくなり白色脂肪細胞に戻る際にはマイトファジーによってミトコンドリアを減少させる(Altshuler-Keylin et al. 2016)。さらに、若年性パーキンソン病の原因遺伝子であるPARK2とPINK1/PARK6がそれぞれコードするタンパク質ParkinとPINK1が、脱分極した異常なミトコンドリアの除去を担う因子であることが明らかになっている(Narendra et al. 2008, Narendra et al. 2010)。こうした一過的に誘導されるマイトファジーに加えて、様々な組織で恒常的にマイトファジーが生じていることが観察されている(McWilliams et al. 2018)。

酵母細胞においても、マイトファジーは機能低下したミトコンドリアの除去により、ミトコンドリアの品質維持に貢献すると考えられている。哺乳類細胞とは異なり、酵母の場合、脱共役剤やミトコンドリアATP合成酵素の阻害剤でミトコンドリア機能を阻害してもマイトファジーの顕

著な誘導は見られない。しかし、ミトコンドリアATP合成酵素のフォールディングや内膜でのイオン交換を欠損させることでミトコンドリアの機能を低下させた際に、マイトファジーが誘導されることが見出されている(Priault et al. 2005, Nowikovsky et al. 2007)。出芽酵母のマイトファジーは、酸素呼吸培地での長期培養や窒素源飢餓により効率よく誘導される。オートファジーの欠損株をこうした条件におくと、細胞内に活性酸素が蓄積すると同時に機能低下したミトコンドリアが増加してしまう(Zhang et al. 2007)。また、Atg32やAtg11のようなマイトファジー因子を欠損した出芽酵母では、活性酸素あるいは酸化ストレスに起因してミトコンドリアゲノムの不安定性が上昇するため、呼吸能を失ったミトコンドリアをもつ細胞が増加する(Kurihara et al. 2012)。分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*においても、窒素源飢餓時にプロテアソームの機能が低下するとミトコンドリアで過剰な活性酸素が生じるため、マイトファジーによるミトコンドリアの除去が細胞の生存に必要となる(Takeda et al. 2010)。現在までのところ、酵母のマイトファジーが機能の低下したミトコンドリアを特異的に認識して除去するのか、それともミトコンドリア全体の量を減らすことで活性酸素の蓄積を抑えているのかについての明確な理解は得られていない。ただ、プロテオミクス解析により、マイトファジーによるマトリックスのタンパク質の分解速度はタンパク質ごとに異なることが報告されており(Abeliovich et al. 2013)、特定のタンパク質群あるいはミトコンドリア領域が優先して分解される可能性がある。

マイトファジーがミトコンドリアDNAの品質管理に寄与する可能性も示唆されている。通常、酵母細胞のミトコンドリアDNAは同一のコピーで占められたホモプラスミーとよばれる状態になっている。一方、活性酸素などの影響から生じた突然変異を含む変異型のコピーが混在する状態をヘテロプラスミーとよぶ。中でも大きな欠失を含む変異型のミトコンドリアDNAは、呼吸能はないもののゲノムサイズが小さく短時間で複製されるためにコピー数が増加し易く、世代を経るとポピュレーションの大半を占めるようになる。こうした大きな欠失を含むミトコンドリアDNAをもつ酵母と、通常型のミトコンドリアDNAをもつ酵母が接合すると、その接合子においてマイトファジーが誘導され、マイトファジーに依存して変異型のミトコンドリアDNAのコピーの増加が抑えられることが見出されている(Karavaeva et al. 2017)。呼吸能を無くした変異型のミトコンドリアDNAが何らかの機構で選択され、マイトファジーによって除去されるのかもしれない。ヘテロプラスミーにおける変異型ミトコンドリアDNAの増減はミトコンドリア病発症の主要因であるため、今後の研究展開に興味をもたれる。

応用面からも、マイトファジーに着目した研究が行われている。カンジダ酵母*Candida glabrata*は免疫不全患者に日和見感染を引き起こす。宿主体内ではトランスフェリンやフェリチンのような鉄結合タンパク質が存在し、*C. glabrata*にとっては鉄欠乏環境となる。鉄欠乏時の*C. glabrata*ではマイトファジーが活性化しており、Atg32の遺伝子破壊によってマイトファジーが欠損すると長期間生存できない(Nagi et al. 2016)。また、マウスを用いた実験に

より Atg32 を欠損した *C. glabrata* の病原性が低下することも示されている。したがって、マイトファジー関連因子が抗真菌薬の標的になるかもしれない。一方、発酵生産におけるマイトファジーの機能も解析されている。醸造中の酵母ではマイトファジーが誘導されており、Atg32 の遺伝子破壊によってマイトファジーが欠損すると発酵能が高まることが報告されている (Shiroma et al. 2014)。

おわりに

真核生物において、マイトファジーはミトコンドリアの量や質をコントロールすることにより多様な生理機能を果たす。マイトファジーのレセプターとして Atg32 が同定されて以来、出芽酵母におけるマイトファジーの分子機構や生理的役割の理解が進んできた。一方で、例えばマイトファジーの誘導機構については、マイトファジーを活性化するための刺激や、刺激を Atg32 の発現誘導や修飾に伝えるシグナル伝達経路、過剰なマイトファジーを抑制するための負の制御の有無など、今後明らかにされるべき課題も多く残されている。また、ミトコンドリアの特定の領域が認識されて優先的に分解されているか否か、分解に特異性があるのであればその機構についても今後の解析が求められる。さらに、ミトコンドリアがオートファゴソームに包まれる機構に関しても、オートファジー因子の集合や、膜形成のための脂質の供給、既知のミトコンドリア分裂因子に依存しないミトコンドリアの断片化、といった個々のステップに関する分子レベルでの詳細な研究が重要である。マイトファジー以外の選択的オートファジーや非選択的オートファジーの研究も精力的に行われているため、多種のオートファジー研究の進展により、双方向的に理解の深化が促されると期待できる。

本稿では出芽酵母の知見に焦点を絞ったが、哺乳類細胞におけるマイトファジー研究も、Parkin や PINK1 の関与が明らかになって以来著しく発展している。また、Parkin や PINK1 を含む経路の他にも、Atg32 と同様に外膜に存在するレセプターによって誘導されるマイトファジーが複数同定されている。こうした多様な経路によるマイトファジー誘導の機構が明らかになり始めた一方で、パーキンソン病とマイトファジー欠損との直接的な因果関係は今のところ見出されていない。今後、哺乳類細胞におけるマイトファジー制御の機構解明に、酵母のマイトファジーの機構や、Atg32 を介した制御の知見が貢献するかもしれない。

最後に、オートファジーは真核生物間で高度に保存されているものの、植物細胞におけるマイトファジーはほとんど明らかになっていない。しかし、オートファジーによる小胞体やペルオキシソームの分解に加えて、オートファジーで葉緑体を分解する経路が同定されている (Izumi and Nakamura 2017)。今後、多様な生物種において、ミトコンドリアに限らず、様々なオルガネラやその他の基質を認識して分解するオートファジーの分子機構、制御機構、生理機能の研究により、真核生物間におけるオートファジーの普遍性や多様性が明らかになってゆくと期待される。

引用文献

Abeliovich, H., Zarei, M., Rigbolt, K. T., Youle, R. J., and Dengjel, J. (2013) Involvement of mitochondrial dynamics

- in the segregation of mitochondrial matrix proteins during stationary phase mitophagy. *Nat Commun* 4: 2789.
- Aihara, M., Jin, X., Kurihara, Y., Yoshida, Y., Matsushima, Y., Oku, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiumi, T., Yamamoto, T., Sakai, Y., Kang, D., and Kanki, T. (2014) Tor and the Sin3-Rpd3 complex regulate expression of the mitophagy receptor protein Atg32 in yeast. *J Cell Sci* 127: 3184-3196.
- Altshuler-Keylin, S., Shinoda, K., Hasegawa, Y., Ikeda, K., Hong, H., Kang, Q., Yang, Y., Perera, R. M., Debnath, J., and Kajimura, S. (2016) Beige adipocyte maintenance is regulated by autophagy-induced mitochondrial clearance. *Cell Metab* 24: 402-419.
- Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., and Kang, D. (2011) Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol Biol Cell* 22: 3206-3217.
- Bartholomew, C. R., Suzuki, T., Du, Z., Backues, S. K., Jin, M., Lynch-Day, M. A., Umekawa, M., Kamath, A., Zhao, M., Xie, Z., Inoki, K., and Klionsky, D. J. (2012) Ume6 transcription factor is part of a signaling cascade that regulates autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 11206-11210.
- Belgareh-Touze, N., Cavellini, L., and Cohen, M. M. (2017) Ubiquitination of ERMES components by the E3 ligase Rsp5 is involved in mitophagy. *Autophagy* 13: 114-132.
- Bockler, S. and Westermann, B. (2014) Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Dev Cell* 28: 450-458.
- Deffieu, M., Bhatia-Kissova, I., Salin, B., Galinier, A., Manon, S., and Camougrand, N. (2009) Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. *J Biol Chem* 284: 14828-14837.
- Eiyama, A. and Okamoto, K. (2015) Protein N-terminal Acetylation by the NatA Complex Is Critical for Selective Mitochondrial Degradation. *J Biol Chem* 290: 25034-25044.
- Izumi, M. and Nakamura, S. (2017) Partial or entire: Distinct responses of two types of chloroplast autophagy. *Plant Signal Behav* 12: e1393137.
- Kanki, T. and Klionsky, D. J. (2008) Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J Biol Chem* 283: 32386-32393.
- Kanki, T., Kurihara, Y., Jin, X., Goda, T., Ono, Y., Aihara, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiumi, T., and Kang, D. (2013) Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Rep* 14: 788-794.
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., and Klionsky, D. J. (2009) Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell* 17: 98-109.
- Karavaeva, I. E., Golyshev, S. A., Smirnova, E. A., Sokolov, S. S., Severin, F. F., and Knorre, D. A. (2017) Mitochondrial depolarization in yeast zygotes inhibits clonal expansion of selfish mtDNA. *J Cell Sci* 130: 1274-1284.
- Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S., and Camougrand, N. (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of

- mitochondria. *J Biol Chem* 279: 39068-39074.
- Kondo-Okamoto, N., Noda, N. N., Suzuki, S. W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., Hashimoto, A., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Okamoto, K. (2012) Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *J Biol Chem* 287: 10631-10638.
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., and Kang, D. (2012) Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem* 287: 3265-3272.
- Levchenko, M., Lorenzi, I., and Dudek, J. (2016) The Degradation Pathway of the Mitophagy Receptor Atg32 is re-routed by a posttranslational modification. *PLOS One* 11: e0168518.
- Mao, K., Wang, K., Liu, X., and Klionsky, D. J. (2013) The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Dev Cell* 26: 9-18.
- McWilliams, T. G., Prescott, A. R., Montava-Garriga, L., Ball, G., Singh, F., Barini, E., Muqit, M. M. K., Brooks, S. P., and Ganley, I. G. (2018) Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metab* 27: 439-449 e435.
- Nagi, M., Tanabe, K., Nakayama, H., Ueno, K., Yamagoe, S., Umeyama, T., Ohno, H., and Miyazaki, Y. (2016) Iron-depletion promotes mitophagy to maintain mitochondrial integrity in pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Autophagy* 12: 1259-1271.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., and Youle, R. J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183: 795-803.
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M. R., and Youle, R. J. (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLOS Biol* 8: e1000298.
- Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R. J., and Schweyen, R. J. (2007) Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ* 14: 1647-1656.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 17: 87-97.
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F. M., di Rago, J. P., and Martinou, J. C. (2005) Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ* 12: 1613-1621.
- Sakakibara, K., Eiyama, A., Suzuki, S. W., Sakoh-Nakatogawa, M., Okumura, N., Tani, M., Hashimoto, A., Nagumo, S., Kondo-Okamoto, N., Kondo-Kakuta, C., Asai, E., Kirisako, H., Nakatogawa, H., Kuge, O., Takao, T., Ohsumi, Y., and Okamoto, K. (2015) Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J* 34: 2703-2719.
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S. K., Schumacher, A., Prchal, J. T., Chen, M., and Wang, J. (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454: 232-235.
- Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L., and Ney, P. A. (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19500-19505.
- Shiroma, S., Jayakody, L. N., Horie, K., Okamoto, K., and Kitagaki, H. (2014) Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function. *Appl Environ Microbiol* 80: 1002-1012.
- Takeda, K., Yoshida, T., Kikuchi, S., Nagao, K., Kokubu, A., Pluskal, T., Villar-Briones, A., Nakamura, T., and Yanagida, M. (2010) Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 3540-3545.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119: 301-311.
- Wang, K., Jin, M., Liu, X., and Klionsky, D. J. (2013) Proteolytic processing of Atg32 by the mitochondrial i-AAA protease Yme1 regulates mitophagy. *Autophagy* 9: 1828-1836.
- Yamashita, S. I., Jin, X., Furukawa, K., Hamasaki, M., Nezu, A., Otera, H., Saigusa, T., Yoshimori, T., Sakai, Y., Mihara, K., and Kanki, T. (2016) Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol* 215: 649-665.
- Zhang, Y., Qi, H., Taylor, R., Xu, W., Liu, L. F., and Jin, S. (2007) The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. *Autophagy* 3: 337-346.

Received: 14 March 2018 / Accepted: 2 April 2018