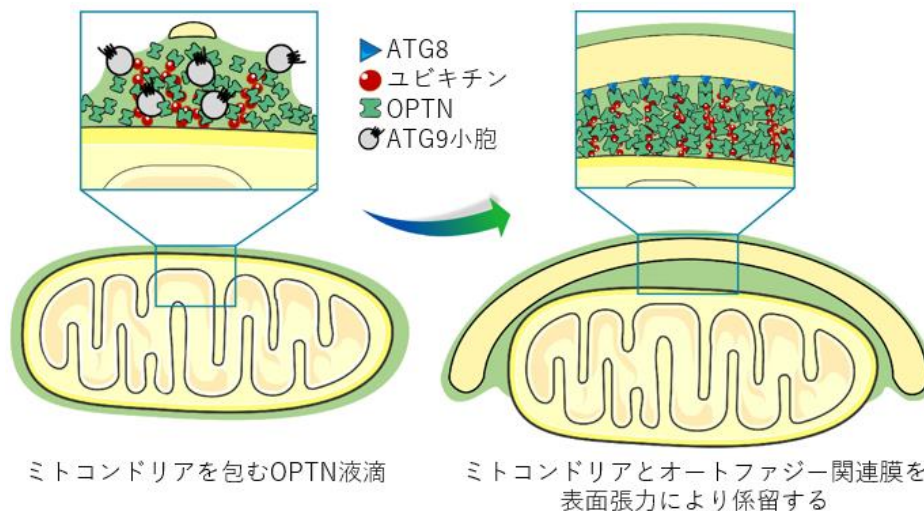


表面張力が損傷ミトコンドリアのオートファジーを促進する ——オートファジーアダプターの相分離によるシート状液滴の意義——

発表のポイント

- ◆ 損傷ミトコンドリア上に集まるオートファジーアダプタータンパク質は液-液相分離を起こし、シート状液滴としてミトコンドリアを覆うことを明らかにしました。
- ◆ このシート状液滴が生み出す表面張力によりオートファジー関連膜構造がミトコンドリア上に係留され、それがミトコンドリアのオートファジー（マイトファジー）を促進することを示しました。
- ◆ シート状液滴がミトコンドリアを包むという今回の発見は、ミトコンドリア以外のオルガネラ（細胞小器官）の分解や、オルガネラ同士の接触などのさまざまな細胞内の現象にも当てはまる可能性が期待されます。

マイトファジー誘導時におけるミトコンドリアを包む液滴の役割



ミトコンドリアを包むオートファジーアダプター（OPTN）の液滴（緑）がATG9小胞やオートファジー関連膜を係留することでマイトファジーを促進する

概要

東京大学大学院医学系研究科の水島昇教授らの研究グループは、品質の低下したミトコンドリアを選択的にオートファジー分解するメカニズムであるマイトファジー（注1）に重要な新しい仕組みを解明しました。損傷を受けたミトコンドリアは細胞に障害を与えうるので、そのような不良ミトコンドリアはParkinというユビキチンリガーゼ（注2）によってユビキチン化され、マイトファジーで分解されます。その過程では、オートファジーアダプタータンパク質（注3）がユビキチン化されたミトコンドリア上に集積することが知られます。また、一般にアダプタータンパク質はサイトゾルで相分離（注4）を起こして液滴を形成する性質がありますが、マイトファジー誘導時にミトコンドリア上に集積したアダプタータンパク質が液滴を形

成するかは不明でした。今回の研究により、損傷したミトコンドリア上に集積したアダプタータンパク質（OPTNやNDP52など）がミトコンドリア表面で相分離を起こし、ミトコンドリアを包むシート状の液滴を形成することが明らかになりました。さらに、この液滴の形成を阻害すると、オートファゴソームのもととなるATG9小胞がミトコンドリアへ局在しなくなり、マイトファジーが起きなくなることが観察されました。このことから、アダプタータンパク質がシート状液滴を形成し、それによる表面張力（濡れ効果）（注5）によってATG9小胞やオートファゴソーム膜が係留され、マイトファジーが進行することが示唆されました。本研究成果は、膜構造上に形成するシート状液滴が異なるオルガネラ間の接触を仲介するという新しい概念を提唱するものであり、他の細胞内構造にも当てはまることが期待されます。本研究成果は、10月17日に国際科学誌「The EMBO Journal」オンライン版に掲載されました。

発表内容

（研究背景）

細胞内分解機構の一つであるオートファジーが誘導されると、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体が細胞質成分を包み込み、リソソームと融合してその内容物を分解します。特に、損傷したミトコンドリアは細胞毒性を持ちうるため、Parkinというユビキチンリガーゼ（注2）によってユビキチン化され、オートファジーによって分解されます（図1）。このようなミトコンドリアを選択的に分解するオートファジーはマイトファジーとよべれます。この過程では、OPTNやNDP52といったオートファジーアダプタータンパク質（注3）がユビキチン化されたミトコンドリアに集積することがマイトファジー誘導に不可欠であることが知られており、それはこれらのアダプターがミトコンドリアのユビキチンとオートファゴソーム膜を連結しているためだと考えられています。一方、これらのアダプタータンパク質はユビキチン化タンパク質と相互作用し、サイトゾルで相分離して液滴を形成することが確認されています（注4）。しかしながら、アダプタータンパク質の相分離とParkin依存的マイトファジー誘導との関係性は不明でした。

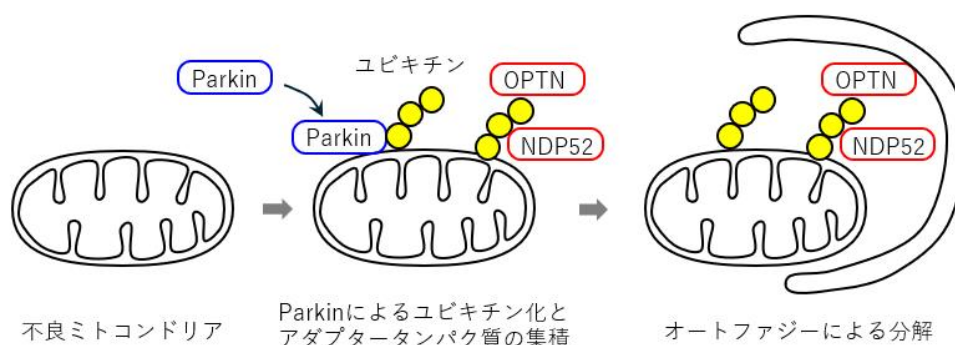
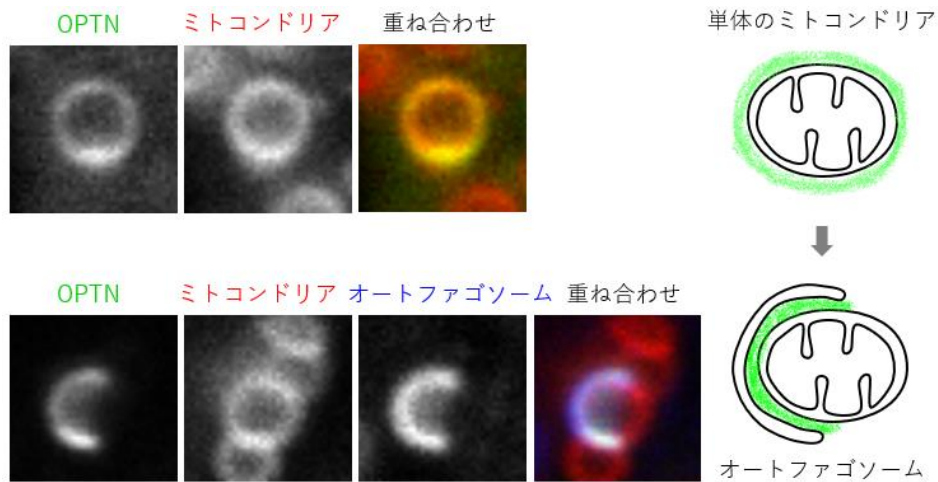


図1：Parkin 依存的マイトファジー

ミトコンドリアが損傷を受けると、Parkinというユビキチンリガーゼによりユビキチン化され、OPTNやNDP52などのオートファジーアダプタータンパク質が集積する。アダプタータンパク質はユビキチンとオートファジー因子の両方と結合する性質を持ち、マイトファジー誘導やオートファゴソームによる効率的な取り込みに重要な役割を持つ。

（研究の内容）

本研究では、マイトファジー誘導時におけるアダプタータンパク質の挙動を分子生物学的実験と数理的モデルを組み合わせることで解析しました。マイトファジー誘導時に、オートファジーアダプタータンパク質群はミトコンドリア上に均一に局在しますが（図2上段）、オートファ



ゴソームが形成され始めると、OPTN と NDP52 はオートファゴソーム形成部位に濃縮することが観察されました（図2下段）。

図2：OPTN はオートファゴソーム形成部位に濃縮する

オートファジーアダプタータンパク質である OPTN はミトコンドリア上に均一に集積するが、オートファゴソームが形成されると、オートファゴソーム形成部位に濃縮を示す。

アダプタータンパク質のオートファゴソーム形成部位への顕著な濃縮から、ミトコンドリア膜上で相分離が起こっている可能性が考えられました。そこで、ミトコンドリア膜上へ集積した OPTN を光褪色後蛍光回復法（FRAP）を用いて解析したところ、OPTN や NDP52 はサイトゾルとミトコンドリア膜上の間で動的に入れ替わっていることが示され、相分離が起こっているという仮説を支持しました。

さらに、数理モデリングによってアダプタータンパク質が相分離している場合の挙動を予測したところ、ミトコンドリア同士やミトコンドリアと形成中のオートファゴソームとの膜接触部位にアダプタータンパク質が流入することが示されました（図3）。

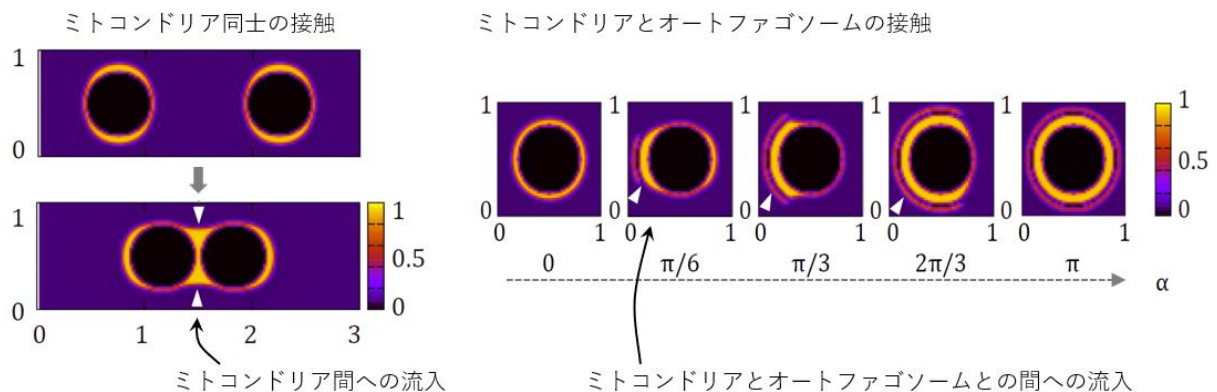


図3：数理モデリングによるアダプタータンパク質の分布解析

数理モデリングによる相分離したアダプタータンパク質の分布変化。ミトコンドリア同士が接触すると、アダプタータンパク質はミトコンドリア同士の間へ流入し（左）、ミトコンドリアとオートファゴソームが接触すると、アダプタータンパク質はミトコンドリアとオートファゴソームの間へ流入する（右）。

蛍光顕微鏡を用いた生細胞観察法によりミトコンドリア同士の接触、およびミトコンドリアと形成中のオートファゴソームとの接触を観察したところ、数理モデリングで予想されたような膜接触部位への OPTN の流入が観察され、アダプタータンパク質の流動性が示唆されました (図 4)。

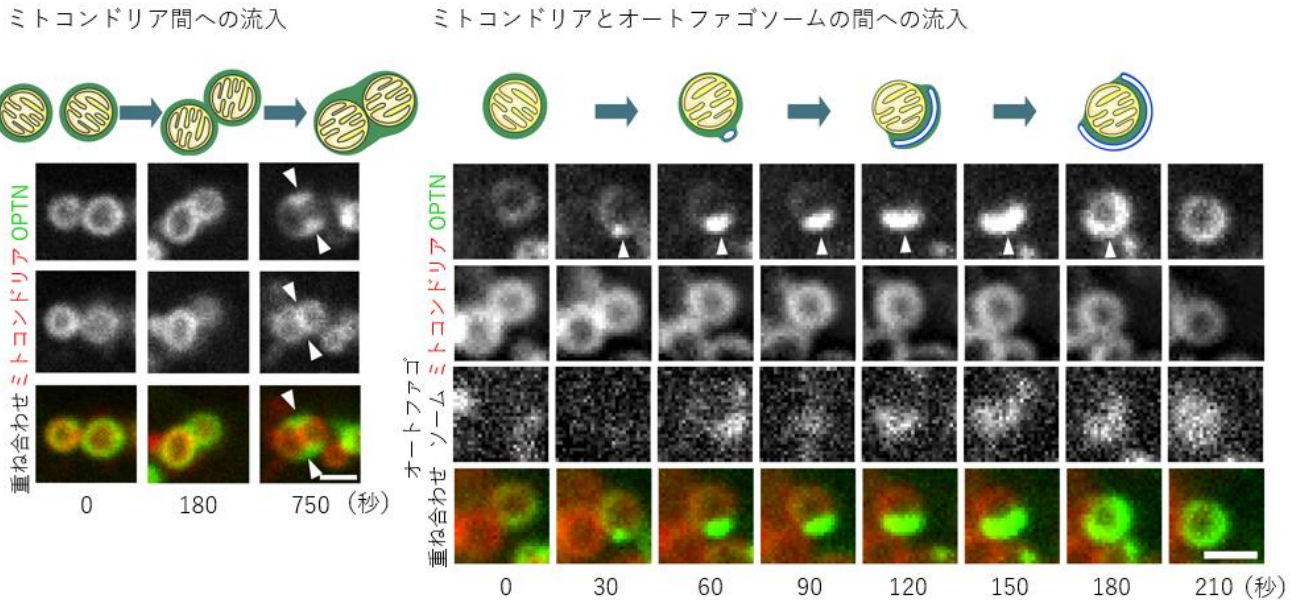


図 4 : アダプタータンパク質は膜接触部位において流動性を示す

生細胞観察による OPTN の分布変化。隣り合うミトコンドリア同士が接触した場合、はじめはミトコンドリア上に均一に分布した OPTN がミトコンドリア接触部位に流入した (左)。ミトコンドリアとオートファゴソームが接触した場合、はじめはミトコンドリア上に均一に分布した OPTN がオートファゴソーム形成部位に流入し濃縮した (右)。膜間隙に流入した OPTN (矢先)。

相分離には分子間の多価相互作用が重要であることが知られています。ユビキチンと 1 対 1 で強固に結合する OPTN の変異体を作製したところ、この変異体はミトコンドリアへ集積したものの流動性を欠き、オートファジー上流因子である ATG9 小胞の集積が抑制され、マイトファジー活性が低下していました。このことから、損傷を受けたミトコンドリア上でアダプタータンパク質がシート状液滴を形成し、その表面張力 (注 5) によって ATG9 小胞やオートファ

ゴソーム膜を係留し、それがマイトファジー活性に必須であることが示唆されました。(図5)。

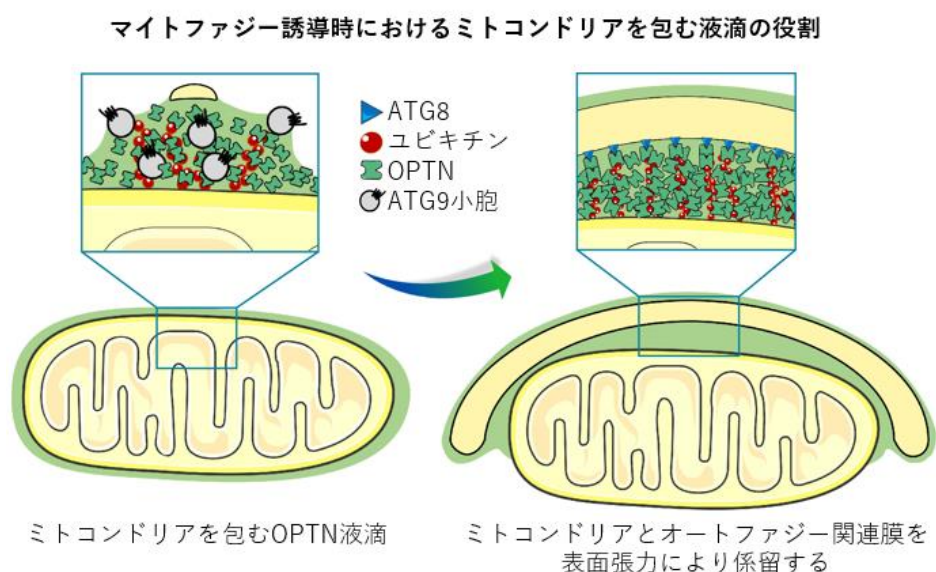


図5：モデル図

Parkin 依存的マイトファジーが誘導されると、ユビキチン化されたミトコンドリア上に OPTN などのオートファジーアダプターが集積し、ミトコンドリアを包むシート状の液滴を形成する。OPTN による液滴形成は、その表面張力により ATG9 小胞やオートファゴソーム膜を係留することでマイトファジー活性を促進する。

(今後の展望)

これまで、オルガネラ表面に形成されるシート状液滴の存在や生理的な役割については、ほとんど明らかにされていませんでした。本研究により、障害を受けたミトコンドリア上でオートファジーアダプタータンパク質が相分離を起こし、形成されたシート状液滴が、オートファジーの上流因子である ATG9 小胞の係留とオートファジー誘導に不可欠であることが明らかとなりました。この発見は、アダプタータンパク質による液滴形成が、毛細管現象を生み出すことでマイトファジー誘導において重要であることを示すだけでなく、液滴が他のオルガネラ間の接触形成にも普遍的に関与する可能性を示唆しています。このようなオルガネラ膜上に形成される液滴と、オルガネラコンタクトサイトにおける役割が他のオルガネラにおいても機能しうるかについては、今後のさらなる解析が必要です。このミトコンドリア上でのシート状液滴形成の発見をきっかけに、オルガネラ間で形成される液滴とその機能が解明され、細胞内でのオルガネラ同士の相互作用に関する新たな知見が得られることが期待されます。

発表者・研究者等情報

東京大学 大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻

水島 昇 教授

Zi Yang 研究当時：博士課程

現：ライプニッツ分子薬理学研究所 ポストドクトラルフェロー

吉井 紗織 助教

境 祐二 研究当時：助教

現：横浜市立大学 特任准教授

Zhang Jing 修士課程大学院生

千野 遥 研究当時：特任研究員

現：ハーバードメディカルスクール ポストドクトラルフェロー

ケルン大学 Faculty of Medicine and University Hospital Cologne

Knorr Roland L 教授

論文情報

雑誌名：The EMBO Journal

題名：Autophagy adaptors mediate Parkin-dependent mitophagy by forming sheet-like liquid condensates

著者名：Zi Yang, Saori R. Yoshii, Yuji Sakai, Jing Zhang, Haruka Chino, Roland L. Knorr, Noboru Mizushima*

DOI: 10.1038/s44318-024-00272-5

URL: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44318-024-00272-5>

研究助成

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究（ERATO）「水島細胞内分解ダイナミクスプロジェクト（課題番号：JPMJER1702）」（研究総括：水島昇）、科学研究費助成事業 特別推進研究「膜構造の分解を基軸とした細胞内分解の研究（課題番号：22H04919）」（代表：水島昇）、科学研究費助成事業 基盤研究（C）「オートファジー膜ダイナミクスの理論的解明（課題番号：23K05715）」（代表：境祐二）、東京工業大学（現・東京科学大学）国際先駆研究機構 World Research Hub（WRH）プログラム（代表：Knorr Roland L.）、German Research Foundation（Project 460056461）（代表：Knorr Roland L.）の支援により実施されました。

用語解説

(注1) マイトファジー

ミトコンドリアを標的とした選択的オートファジー。損傷を受けて質の低下したミトコンドリアはオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造により包み込まれ、その後、オートファゴソームがリソソームと融合することで分解される。

(注2) ユビキチンリガーゼ

ユビキチンリガーゼは、分解対象となる基質タンパク質を認識し、基質にユビキチンを付加する。ユビキチンは分解装置であるプロテアソームやオートファジーによって認識されるシグナルとなる。

(注3) オートファジーアダプタータンパク質

ユビキチンとオートファジー関連タンパク質の両方と結合することができ、それらを連結することで選択的オートファジーを誘導するタンパク質の総称。OPTN や NDP52 などが知られている。

(注4) 相分離

溶液中において高分子同士の分子間の相互作用により、異なる液相が分かれて存在する現象。細胞内ではタンパク質や RNA などの高分子が相分離を起こし、液滴と呼ばれる構造を形成する。相分離した高分子は液滴内外で動的であり、交換が起こっている。

(注5) 表面張力

液体の表面や界面の面積をできるだけ小さく保とうとする力。細胞内では、表面張力の強さなどに応じて液滴と生体膜の間に「濡れ効果」が働くことがある。濡れ効果は、液滴と膜、液滴とサイトゾル、サイトゾルと膜間の界面張力により決まる。この現象には、完全な濡れ、部分的な濡れ、脱濡れの3つの状態があり、これにより液滴と膜がどの程度接触するかが決まる。日常的に見られる毛細管現象も、表面張力によるものである。

問合せ先

(研究内容については発表者にお問合せください)

東京大学大学院医学系研究科

教授 水島 昇 (みずしま のぼる)

Tel : 03-5841-3440 E-mail : nmizu@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム

Tel : 03-5841-3304 E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp