

相分離した液滴のオートファジー分解に新たなメカニズムを発見
—表面張力が関わるオートファジー「fluidophagy」の提唱—

1. 発表者：

Knorr Lutz Roland（研究当時：東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 特任助教、現所属：マックスプランク研究所 グループリーダー、東京大学大学院医学系研究科 客員研究員）

千野 遥（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 特任研究員）

水島 昇（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆液-液相分離（注1）によって細胞内に生じる膜のない構造（液滴：注2）がオートファジーによって分解される一般的な仕組みはこれまでよくわかっていませんでした。
- ◆今回、生きた細胞、試験管内の無細胞系、数理モデルを使って、オートファゴソーム膜が液滴を囲むように変形することを明らかにしました。これは膜と液滴の「ウェッティング（wetting）現象」（注3）によるものと考えられました。
- ◆本研究では、液滴のオートファジーによる分解として「fluidophagy」という概念を提唱しました。細胞内の液滴の除去のメカニズムを明らかにすることで、神経変性疾患などの発症メカニズムの理解に貢献することが期待されます。

3. 発表概要：

マクロオートファジー（以下「オートファジー」）は細胞内の主要な分解系の一つです。細胞の一部を非選択的に、あるいは細胞にとって有害な成分や不要なものを選択的に、隔離膜によって捕捉し、分解するプロセスです（図1）。液-液相分離は、均質な液体が二つ以上の液相に分離する現象のことです。細胞内でも、たんぱく質や核酸が液-液相分離を起こして球状の「液滴」を生じることがあり、膜のない細胞内構造として近年注目されています。これまで、オートファジーによって選択的に分解されるたんぱく質が液滴を形成する可能性があることはわかっていたのですが、その根底にある普遍的な物理的仕組みについてはわかっていませんでした。

今回、マックスプランク研究所の Roland Lutz Knorr グループリーダー（研究開始当時：東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 特任助教）を中心とし、東京大学大学院医学系研究科の水島昇教授らを含む、ドイツ、日本、イギリス、ノルウェー等の国際共同研究チームは、オートファジーが液滴を捕捉する物理的基盤を明らかにし、これを「fluidophagy（液滴のオートファジー）」と命名しました。今回細胞内の液滴の例として使った p62 たんぱく質は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を含む複数の疾患との関連が示唆されています。本研究の成果は、液滴のオートファジーによる分解機構の解明とともに、神経変性疾患などの病態の理解に貢献することが期待されます。

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」（研究総括：水島昇）の支援を受けて行われました。

本研究成果は、国際科学誌「nature」のオンライン版で公開されました。

4. 発表内容：

(1) 研究の背景

マクロオートファジー（以下「オートファジー」）は細胞内の主要な分解系の一つで、細胞の一部を非選択的に、あるいは細胞にとって有害な成分や不要なもの（たんぱく質凝集体や傷害を受けたオルガネラなど）を選択的に隔離膜によって捕捉して分解するプロセスです（図1）。脂質膜でつくられた扁平な隔離膜が伸長しながら弯曲してカップ状になり、やがて閉鎖して球状になります。その後リソソームと融合して取り囲んだ細胞質成分を分解します。

液体が複数の液相に分離する現象を、液-液相分離と言います。身の回りでも、水と油が分離するときなどに簡単に観察されます。細胞内でも、たんぱく質や核酸が液-液相分離をおこして球状の構造を生じることが知られており、生じたものを液滴とよびます。細胞内の液滴は、膜を持たない細胞小器官として近年注目されています。

通常、液滴は表面張力によって球状となり、その表面積を最小にします。しかし、何かに接すると液滴は変形し、これは「ウェットティング (wetting) 現象」（注3）として知られています。ミリメートルよりも小さい、微小な世界では、表面張力とウェットティング効果による力の大きさが、物体の弾性力に匹敵するようになります。すると液滴は、膜のような柔らかいものに触れたときには逆に膜の方を変形させることもできます。この力のバランスは、「弾性毛细管性 (elasto-capillarity) 」として知られています。今回、ウェットティング現象に着目し、生細胞観察、試験管内の無細胞系、さらに数理モデルを用いてオートファゴソーム膜と液滴の相互作用を解析しました。

(2) 研究内容

p62 はオートファジーによって選択的に分解されるたんぱく質ですが、細胞内では他の分子とともに液滴を形成しうることが知られています。そこで、オートファゴソーム膜が p62 液滴を分解する過程を生きた細胞で観察したところ、p62 液滴の全体を取り囲む場合と、その一部をちぎる取り囲む場合があることを明らかにしました（図2）。そこで、液滴と膜の相互作用の数理モデルを構築したところ、膜の面積と液滴の表面張力に依存して、液滴の一部をちぎるか全体を囲むかが決まることが予測されました（図3）。さらに、試験管内の無細胞系でこの反応を再構成したところ、オートファゴソームを模倣した人工の二重膜が、液滴との相互作用によって変形することが実証されました（図4）。これらのことから、液滴をオートファゴソーム膜が隔離する際に、オートファゴソーム膜の曲げ弾性エネルギーに加えて、液滴とオートファゴソーム膜間のウェットティング効果が寄与していることが明らかになりました。また、このウェットティング効果を生じるには、オートファゴソーム膜上の LC3 ファミリーたんぱく質と p62 の相互作用が重要であることが分かりました。この相互作用がないと、p62 液滴上で形成されたオートファゴソーム膜が p62 を取り囲めず、反対側を囲んでしまう様子が観察されました。すなわち、ウェットティング効果がオートファゴソームの曲がる方向性を決めることを意味します。

現在、生命科学のさまざまな分野で液-液相分離や液滴の研究が盛んにおこなわれています。本研究は液滴と膜のウェットティング現象が細胞内でおこっており、それがオートファゴソーム膜の変形および液滴のちぎりとつながるということを、数理モデル、人工脂質膜を使った試験管内実験、細胞内実験によって示しました。また、オートファジーによる液滴の分解を「fluidophagy」と命名しました。

(3) 社会的意義

オートファジーは一般に、老化や神経変性疾患と関連するとして注目を集めています。今回細胞内の液滴のモデルとして使った p62 は、オートファジーによって選択的に分解されるとともに、その他のたんぱく質を分解するアダプターとしても機能します。オートファジーによる p62 の分解は、酸化ストレス応答の制御、神経変性疾患の病態形成、炎症、腫瘍とも関連することが知られています。また、p62 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を含む複数の疾患との関連も示唆されています。p62 液滴が隔離膜と相互作用するメカニズムを理解することによって、これらの疾患の病態の理解が深まり、その予防法や治療法の基盤となることが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*nature*」 (英国時間 1 月 20 日：オンライン版)

論文タイトル：Wetting regulates autophagy of phase-separated compartments and the cytosol

著者： Jaime Agudo-Canalejo*, Sebastian W. Schultz*, Haruka Chino, Simona M. Migliano, Chieko Saito, Ikuko Koyama-Honda, Harald Stenmark, Andreas Brech, Alexander I. May, Noboru Mizushima, Roland L. Knorr#

(*equally contributed, #corresponding author)

DOI 番号：10.1038/s41586-020-2992-3

アブストラクト URL：<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2992-3>

6. 問い合わせ先：

<本研究に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野

教授 水島 昇 (みずしま のぼる)

Tel：03-5841-3440、Fax：03-3815-1490

E-mail：nmizu@m.u-tokyo.ac.jp

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 総務係

Tel：03-5841-3304、Fax：03-5841-8585

E-mail：ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

(注1) 液-液相分離

高分子が溶けている溶液中で、分子間の相互作用などに応じて特定の高分子が濃縮し、複数の液相に分離する現象のこと。

(注2) 液滴

細胞内で液-液相分離によって生じた球状の構造。細胞内のたんぱく質や核酸が液-液相分離を起こして液滴をつくることもあり、膜のない細胞内構造（非膜型細胞小器官）として近年注目されている。

(注3) ウエットイング (wetting、「濡れ」) 現象

固体に接触した液体が、球形を保つよりも固体表面に広がろうとする現象で、液体の表面張力によって制御される。2枚の下敷きの上に薄く水を張ると張り付く毛細管現象が身近の例である。ウエットイングの度合いは、接着力と凝集力の間の力のバランスによって決定される。

8. 添付資料：

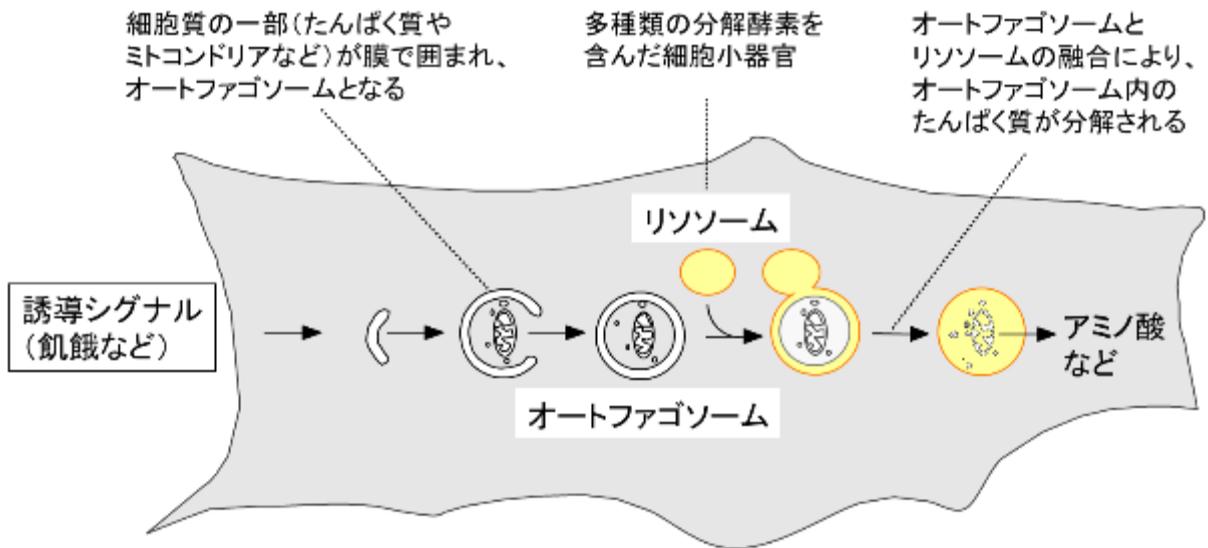


図1：オートファジーの概念図

オートファジーが誘導されると、隔離膜が細胞質の一部を取り囲みオートファゴソームが形成される。オートファゴソームはリソソームと融合し、リソソーム内の酵素によってオートファゴソーム内部を分解する。

膜(LC3, 緑) 液滴(p62, マゼンタ)

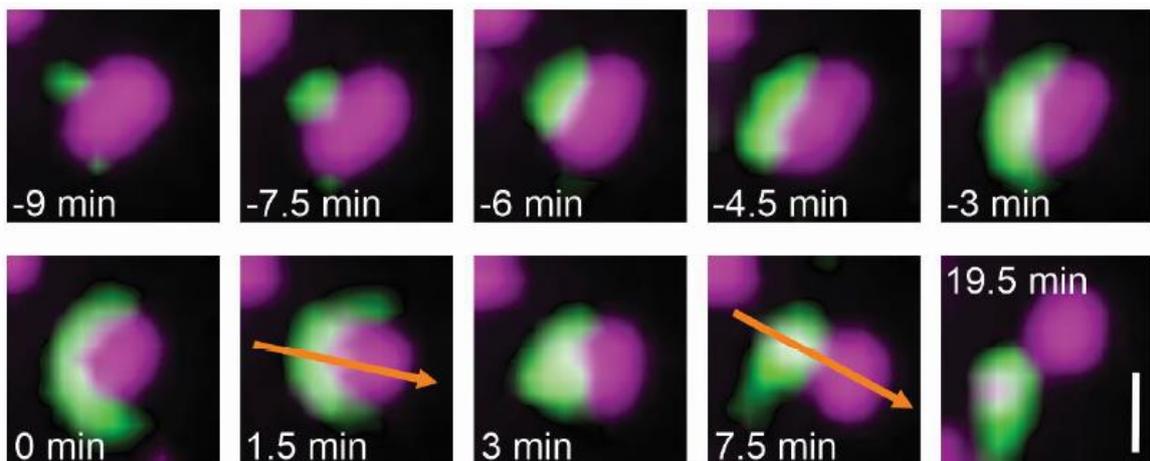


図2：p62液滴の一部をオートファゴソームがちぎる様子

隔離膜 (LC3、緑) が伸長して、液滴 (p62、マゼンタ) を取り囲む様子を、生きたマウス線維芽細胞でタイムラプス観察した。スケールバー：1 μ m。

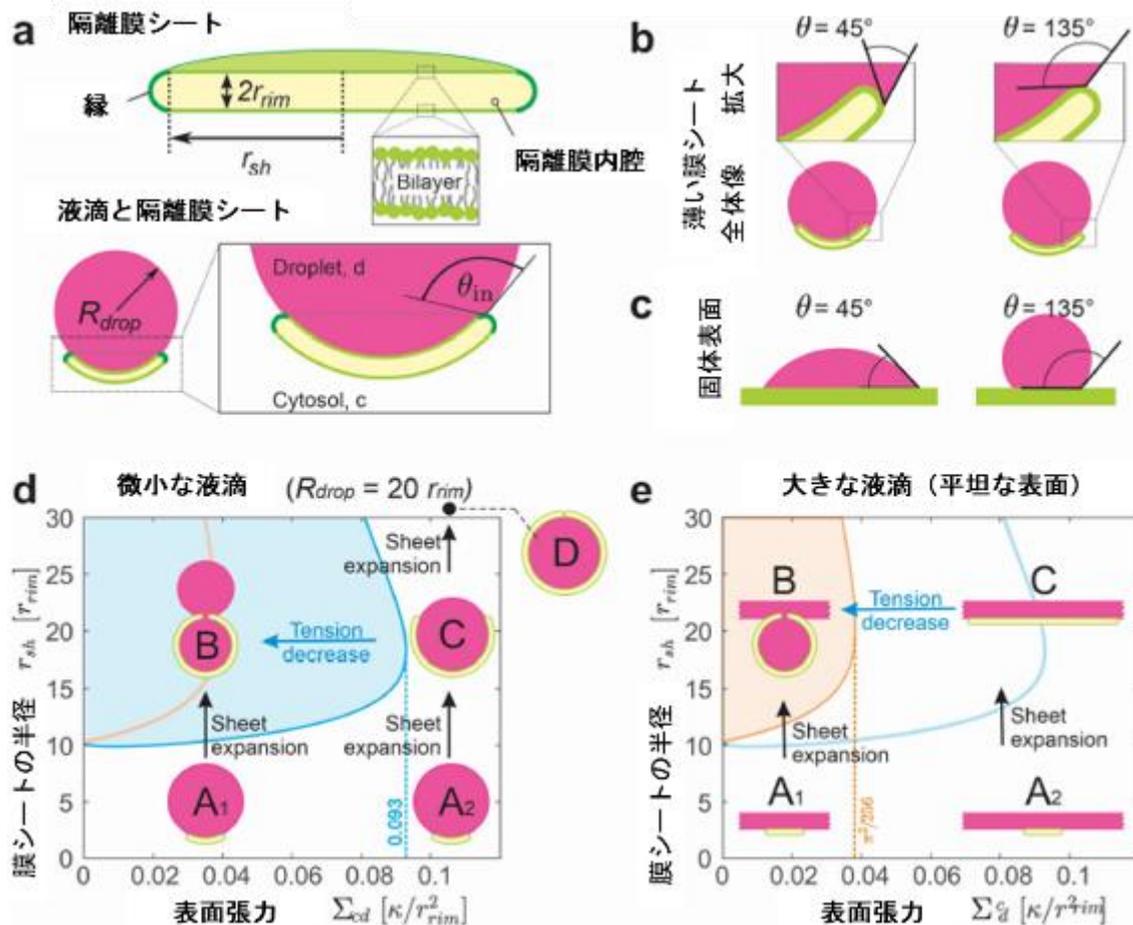
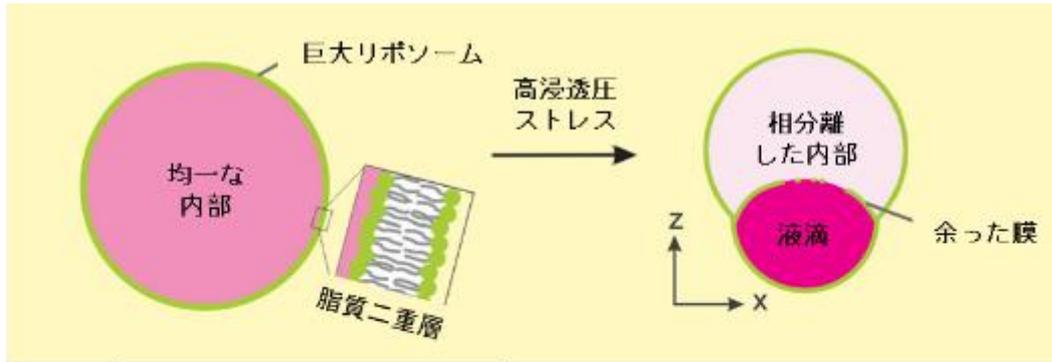


図3：液滴を取り囲む隔離膜シートの変形の物理モデル

a 隔離膜シートと、液滴と隔離膜シートの関係を断面で表した模式図。隔離膜シートの縁を濃い緑で示す。接触角は接線間で定義される (θ_{in})。

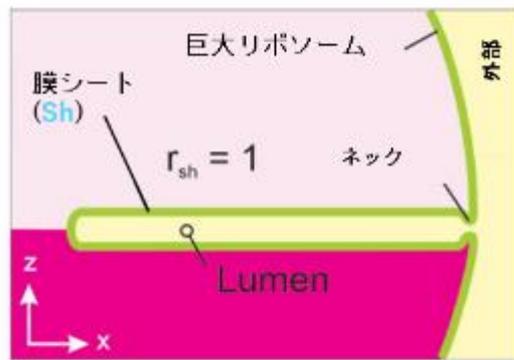
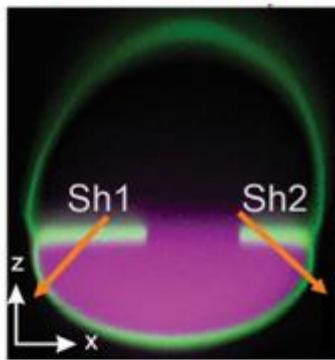
b, c 液滴がシート状膜 (b) と固体 (c) にウェットिंगする場合の模式図。シートの膜に対して接触角 θ_{in} が大きく変わっても液滴の形には大きな差を生じないが (b)、固体表面の場合は、接触角の変化に対して液滴の形は大きく変わる (c)。

d, e 小さい液滴と大きい液滴のオートファジーの安定性に関する相図。図中 A₁ と A₂ は初期状態。液滴の表面張力が弱く隔離膜シートサイズが大きい場合は、液滴はちぎりとられる (B の形)。表面張力が強くなると、継続的な膜シート成長が起こる (C の形)。隔離膜シートが十分に大きければ、液滴を完全に取り囲む。



XZ平面像（横から）

膜（緑） 液滴（マゼンタ）



膜（緑） 液滴（マゼンタ）

3h後

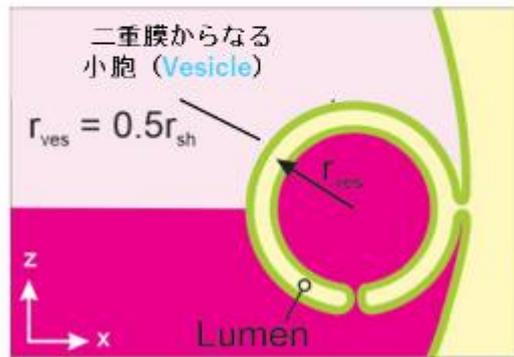
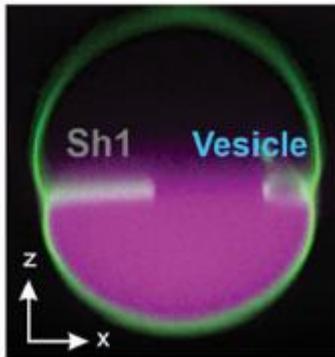


図4：液滴を取り囲む膜シートの変形の試験管内再構成

上段：巨大リポソームの模式図。一層の脂質二重膜（緑）から成り、FITC デキストランとポリエチレングリコール溶液が充填されている（薄いマゼンタ）。高浸透圧条件にすると、全体が小さくなるとともに内部の均一な溶液が相分離して液滴（濃いマゼンタ）を形成する。余った膜がシート状に液滴境界部に伸びる。

中段：共焦点レーザー顕微鏡によって高浸透圧条件のリポソームを観察した結果（膜シート：緑、液滴：マゼンタ）。液滴境界部に伸びた膜シートの形態の模式図を右に示す。

下段：中段の3時間後。膜シートの一部は、液滴を囲むように自然と曲がる。液滴を囲んだ膜の形態の模式図を右に示す。