

研究題目 改良型ビオチン化リガーゼ (TurboID) と液-液相分離を利用したオートファジーアダプター相互作用因子の解析

研究組織

研究代表者：松田憲之（東京都医学総合研究所・ユビキチンプロジェクト）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

研究代表者は10余年にわたり、PINK1（セリン・スレオニンキナーゼ）と Parkin（ユビキチン連結酵素：E3）が連動して損傷ミトコンドリアの外膜タンパク質をユビキチン化することで、マイトファジーを誘導することを明らかにしてきました（*J Cell Biol* 2010, *Nat Commun* 2012, *J Biol Chem* 2013, *Nature* 2014, *J Cell Biol* 2015, *eLife* 2018, *EMBO Rep* 2019）。損傷ミトコンドリア特異的なマイトファジーの破綻はミトコンドリアの品質低下や ROS の過剰産生に直結するものであり、遺伝性潜性パーキンソン病の発症のみならず孤発性パーキンソン病の発症にも関与することが示唆されています。

細胞内で、ユビキチンは選択的オートファジーのシグナルとして機能しますが、その時には「一連のアダプタータンパク質がユビキチン鎖と結合し、さらにオートファゴソーム形成に関わる因子と相互作用することで、選択的オートファジーが誘導される」と考えられています。哺乳類細胞では、ユビキチン結合活性を有する5種類のオートファジーアダプター（p62, NBR1, TAX1BP1, NDP52, OPTN）が知られていますが、PINK1/Parkin の関与するマイトファジーにおいては、OPTN と NDP52 が主に機能していると考えられました。しかしながら、OPTN と NDP52 がマイトファジーを誘導する分子メカニズムには未解明な点が残されていました。また、損傷ミトコンドリア上で蓄積する PINK1 や PINK1 が産生するリン酸化ユビキチンがオートファジーシグナルとして直接機能する可能性も考えられていました。我々は本研究を通じて、PINK1/Parkin によって付加されたユビキチン鎖がオートファジーシグナルとして読み出される新たな仕組みの解明を試みます。

[1-2]研究の方法・経過

マイトファジー誘導時におけるオートファジーアダプター群（p62, NBR1, NDP52, OPTN）の細胞内局在を調べたところ、全てが損傷ミトコンドリアに局在化しました。しかし、p62 と NBR1 がミトコンドリア全体に亘って局在するのに対して、NDP52 と OPTN はミトコンドリアの一部（サブドメイン）のみに局在することを見出しました。オートファゴソームのマーカー分子である LC3B もこのサブドメインに局在したことから、NDP52 と OPTN はユビキチン化されたミトコンドリアとオートファゴソームの結合部位（コンタクトサイト）に特異的に蓄積していると予想されました。

次に我々は、「ユビキチン鎖を認識した NDP52 や OPTN と結合して、ユビキチン鎖をオートファジーシグナルに変換する分子の実態」に迫りたいと考えました。最も単純な解析方法はアダプター分子の相互作用因子を単離することですが、そのようなスクリーニングは既に多くの研究者によって行われており、斬新な手法を導入しなければ新たな知見が得られないと予想されます。そこで、タンパク質間相互作用を蛍光輝点に変換して高感度に検出できる Fluoppi システム（Watanabe et al. *Sci Rep* 2017）を用いて、この課題に挑みました。

Fluoppi システムにおいては、ホモオリゴマー形成能を有する Ash タグを融合したタンパク質 (A) と、四量体形成能を有する蛍光タンパク質であるアザミグリーン (AG) を融合させたタンパク質 (B) を共発現させます。A と B が結合する場合、A と B の相互作用・Ash タグの多量体形成・AG の四量体形成が連鎖的に引き起こされて、細胞内に液-液相分離による液滴が形成されます。我々はすでに Fluoppi システムを用いた論文を複数報告しており（Koyano et al. *Nature*

2014; Yamano et al. *J. Biol. Chem* 2015)、使用実績があることもこの実験系を用いた理由の一つです。Ash タグをユビキチン鎖に融合させたタンパク質と、アザミグリーン (AG) をオートファジーアダプターに融合させたタンパク質を細胞内で共発現させたところ、液-液相分離による液滴が形成されました。

上述のように NDP52 と OPTN はオートファゴソームのマーカー分子である LC3B とミトコンドリアのコンタクトサイトに局在することから、まずオートファジーアダプターとユビキチンの形成する液滴中に LC3 ファミリータンパク質が含まれるかどうかを検討しました。すると、意外にも NDP52 や OPTN の形成する液滴よりも、むしろ p62 や NBR1 の形成する液滴の方が LC3 ファミリータンパク質を含んでいる (より共局在している) ことが示されました。LC3 と p62 が相互作用することは小松博士ら (Komatsu et al. *Cell* 2007) によっても報告されていますが、先述のように p62 や NBR1 は PINK1/Parkin の誘導するマイトファジーには必須ではないので、「LC3 との結合能だけではマイトファジーにおける NDP52 や OPTN の必要性は説明できない」ことが示唆されます。

そこで、OPTN と結合してユビキチンシグナルをオートファジーシグナルに変換する分子の実態に迫るべく、OPTN とユビキチン鎖によって形成される液滴中に含まれるオートファジー関連因子(ATG タンパク質)を検索しました。まず ATG13, ATG14, WIPI2, ATG16L1 の局在を調べたところ、いずれも OPTN とユビキチン鎖の形成する液滴中には含まれず、OPTN の形成する液滴の近傍に小さな点状に局在しました。この局在パターンは、“液滴をオートファジー分解の対象とみなして、オートファゴソーム膜で包み込もうとしている状態”を反映している可能性が高いと思われます。一方で ATG9A について調べると、その局在が OPTN の形成する液滴に完全に一致することが示されました。他のオートファジーアダプター (NDP52, p62, NBR1) の形成する液滴中に ATG9A は含まれていなかったため、OPTN - ATG9A 間に特異的相互作用があることが示されました。

さらに、OPTN - ATG9A 間の相互作用が PINK1/Parkin の誘導するマイトファジーに必須であるのかどうかを検討しました。OPTN の部

分欠失変異体やアミノ酸置換変異体を用いて ATG9A との結合に必須な部位を絞り込む実験から、OPTN のロイシンジッパードメインが ATG9A との結合に必須であることがわかりました。実際にロイシンジッパードメインに変異を導入した OPTN は、野生型 OPTN と同様にユビキチン鎖と液滴を形成しますが、ATG9A の液滴への局在能は完全に失われました。次に、ロイシンジッパードメインを介した OPTN - ATG9A 間の相互作用がマイトファジーに必須かどうかを検討しました。全てのオートファジーアダプターを破壊した細胞 (penta KO 細胞) に野生型 OPTN またはロイシンジッパードメインに変異を有する OPTN を入れ戻して、マイトファジー活性を測定しました。ミトコンドリア傷害薬で細胞を 3 時間処理した際のマイトファジー活性を定量測定したところ、penta KO 細胞で約 3、penta KO 細胞に野生型 OPTN を入れ戻した細胞で約 75 に対して、penta KO 細胞にロイシンジッパードメイン変異体を入れ戻した細胞では約 20 でした。この結果から、OPTN - ATG9A 間の相互作用が PINK1/Parkin の誘導するマイトファジーに非常に重要であることが示されました。

今後は、共同研究を通じてこの方法をさらに発展させ、オートファジーアダプターと直接相互作用する因子を液-液相分離の中に閉じ込め、ビオチン標識したのちに質量分析で解析し、新規のミトコンドリア分解制御因子の同定を目指します。既に小迫博士との共同研究を進めており、マイトファジー誘導条件下で、ユビキチンと OPTN の形成する液滴中に特異的に含まれる新たな因子を複数見出しています。現在は、次のスクリーニングとして、「これら因子が PINK1/Parkin 依存的なマイトファジーに関与しているのかどうかを検討する実験」を進めていきます。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

2019 年、オートファジーアダプターの一つである NDP52 が FIP200 (オートファジー始動複合体の構成因子) と結合することで損傷ミトコンドリア上のユビキチンをオートファジーシグナルに変換することが報告されました (Vargas et al. *Mol Cell* 2019; Ravenhill et al. *Mol Cell* 2019)。一方で、これまでの研究成果から、OPTN が ATG9A (オートファゴソーム形成時に膜を供給する重要因子) と結合することを解明

し、ユビキチン→NDP52→FIP200 とユビキチン→OPTN→ATG9A という2つの経路を介してPINK1 /Parkin がミトファジーを誘導することが明らかになってきています。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまでオートファジーアダプターはユビキチンとLC3の両方に結合するタンパク質と定義されていましたが、本研究を通じて、オートファジーアダプター分子群に新たなオートファジー関連因子との繋がりがあることが示されると期待されます。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

研究は現在進行中であり、まだ共同研究は論文になっていませんが、共同研究の前提となる成果は以下のように論文にて発表しました。

Yamano, K., Kikuchi, R., Kojima, W., Hayashida, R., Koyano, F., Kawawaki, J., Shoda, T., Demizu, Y., Naito, M., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2020) "Critical role of mitochondrial ubiquitination and the OPTN-ATG9A axis in mitophagy"
J Cell Biol (2020) 219 (9): e201912144.
DOI : org/10.1083/jcb.201912144

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後はFluoppiシステムを用いたこの研究をOPTN以外のオートファジーアダプターにも応用し、小迫先生と協力して新たな相互作用因子を同定することで、選択的オートファジーの分子基盤の理解をさらに深めていきたいと考えています。