

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

研究代表者の松田は 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、オートファジーを誘導することを明らかにしてきた（J Cell Biol 2010, Nat Commun 2012, J Biol Chem 2013, Nature 2014, J Cell Biol 2015, eLife 2018, EMBO Rep 2019 など）。

損傷ミトコンドリア特異的なオー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、遺伝性潜在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る。

さらに、上記の研究を進める過程では、研究代表者(松田)と共同研究者(小迫)の協力体制が重要な役割を担ってきた。研究代表者の松田は一貫してユビキチンの研究に携わっており、ユビキチン連結酵素やユビキチン基質の細胞生物学的・生化学的な解析について専門知識と実験スキルを有する一方で、質量分析装置を用いたユビキチン連結酵素の結合因子の同定や、ユビキチン基質の同定などは専門分野ではない。そのために研究を効率的に進めるためには、質量分析の専門家の協力が必須であった。幸い、共同研究者（小迫）は質量分析装置を用いた相互作用因子の同定や、翻訳後修飾部位の決定のエキスパートであり、両者はユビキチンリン酸化酵素 PINK1 およびユビキチン連結酵素 Parkin の解析で数々の共同研究成果を上げてきた経験がある（Nat. Commun., 2012; J. Biol. Chem., 2013; Nature, 2014; J. Cell Biol., 2015, J. Biol. Chem., 2019; EMBO Rep., 2019）。

今回、我々は「PINK1/Parkin によって付加されたユビキチンがアダプタータンパク質やオートファゴソーム形成に関わる因子と相互作用

しつつ、選択的オートファジーを誘導する」仕組みをさらに解明するために、PINK1/Parkin 依存性なオートファジーの誘導時に、下流のオートファジー関連因子と相互作用する新たなタンパク質の単離を試みた。

[1-2]研究の方法・経過

PINK1/Parkin 依存性のオートファジーは、ミトコンドリアにダメージを与える薬剤で処理した時に限定して、不良ミトコンドリア周辺のみで特異的に起こるので、“時空間的に分離した条件で” オートファジーの始動機構を解析することができる。

2020 年度の成果報告書に記載したように、最初の試みとしては、Fluoppi システムを用いて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た。実際にオー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すことができたが、その細胞内機能の解析を進める過程で困難が生じており、引き続き研究を継続している状況である。

一方で、別なアプローチによる研究が奏功している。つまり「Parkin 依存性なオートファジー誘導条件において、オートファジー関連因子 DFCP1, WIPI1 と結合する因子」を小迫博士との共同研究として探索した結果、興味深い因子の単離に成功した。多数のオートファジー関連因子の中で DFCP1, WIPI1 の両者に着目した理由は、オートファジー誘導に伴う細胞内局在変化（損傷ミトコンドリア近傍への移行）が顕著だからである。質量分析解析から、オートファジー誘導時に特異的に DFCP1 や WIPI1 と結合する相互作用因子の候補を多数単離し、さらにオートファジー条件において損傷ミトコンドリアの近傍に移行するものをスクリーニングし

た結果、オートファジーとの関連が知られていなかった2つのタンパク質:BCAS3 と C16orf70 を同定した。両者の免疫染色による細胞内局在はよく一致したが、その後の解析から、BCAS3 と C16orf70 は複合体を形成することが明らかとなった。さらに、両者は通常時は細胞質に存在するが、ミトファジーを誘導すると損傷ミトコンドリアの近傍で形成される隔離膜に移行することが示された。

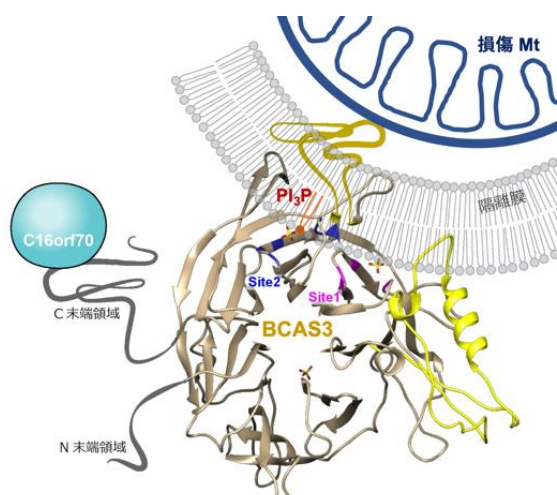
BCAS3 タンパク質の立体構造のモデリングから、BCAS3 とホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) との結合が予測された。まず、生化学的な解析として liposome flotation assay を行い、実際に BCAS3 とリポソームが PI3P 依存的に結合することが示された、次に BCAS3 の PI3P 結合予測部位に変異を導入して細胞に発現させて、ミトファジー誘導時の局在変化を観察した。損傷ミトコンドリア近傍に形成される隔離膜への BCAS3 の集積は、PI3P 結合予測部位に変異を導入することで阻害された。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

上述の一連の実験結果から、BCAS3-C16orf70 複合体は、PI3P との結合を介してミトファジー誘導時に隔離膜に局在化する新規因子であること、PINK1/Parkin 依存性のミトファジーの過程で機能する新しい下流因子であることが示された (図1)。

図1:BCAS3-C16orf70 複合体の機能モデル



[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

BCAS3-C16orf70 複合体の隔離膜近傍への移行は、ミトファジー誘導時のみならず、より一般的なオートファジー誘導時にも観察される

ことから、隔離膜形成プロセスのさらなる理解への波及効果が期待できる。今後は BCAS3 -C16orf70 複合体のヒト疾患への関与について解析を進めることで、さらに研究を発展させる予定である。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Kojima, W., Yamano, K., Kosako, H. (共同研究者), Imai, K., Kikuchi, R., Tanaka, K., and Matsuda, N (研究代表者). Mammalian BCAS3 and C16orf70 associate with the autophagosome formation site in response to selective and non-selective autophagy. *Autophagy*, 17(8):2011-2036 (2021).

本年度に論文を *Autophagy* 誌に発表した。上記論文の謝辞欄には、本研究所プログラムの共同研究であることを明記した。

【4】今後の課題等

本共同研究課題は今年度で終了するが、引き続き小迫博士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深めていきたいと考えている。