

26. 液—液相分離とオートファジーの共創による生体防御機構の解明

順天堂大学大学院医学研究科 教授 小松 雅明

概要

本研究は、液—液相分離により形成される p62 body（液滴）が、どのようにして分解対象となるかという未解明の課題に対し、その物性制御機構の解明を目的とした。これを達成するため、細胞・試験管内再構成・ノックインマウスを統合した解析系を構築し、p62 の Ser403 リン酸化を制御する分子機構と液滴物性の関係を解析した。

その結果、TBK1 と PP2A が拮抗的に Ser403 リン酸化を制御し、この修飾が p62 body を液状からゲル様状態へ転換させ、オートファジー分解を促進する分子スイッチであることを見出した。さらに本機構が細胞のみならず神経細胞やマウス個体においても機能し、プロテオスタシス維持に寄与することを明らかにした。

今後は、老化や疾患における本制御機構の破綻の解明と、液滴物性を標的とした治療戦略の開発が課題である。本研究は、相分離再構成系や高速原子間力顕微鏡解析、ノックインマウス作製、プロテオーム解析など高コストかつ学際的な研究基盤を必要とし、財団助成はこれらを統合的に推進し、分子から個体レベルに至る研究を実現する上で不可欠であった。

背景および目的

液—液相分離によって生じる生体分子凝縮体（液滴）は、膜を介さずに反応やシグナル伝達を空間的に制御する仕組みとして近年注目されている。その一方で、これらの凝縮体がどのような条件で分解対象となるのか、特にオートファジーがどの凝縮体を選択的に除去するのかという分子基盤は未だ十分に理解されていない。

p62/SQSTM1 は、PB1 ドメインによる自己会合と UBA ドメインによるユビキチン結合を介して多価相互作用を形成し、ユビキチン化タンパク質を取り込んで液—液相分離により p62 body と呼ばれる液滴状凝縮体を形成する。p62 body は、不要タンパク質の隔離・分解の場であると同時に、KEAP1 を取り込むことで NRF2 経路を活性化するストレス応答のハブとしても機能する。したがって、同一の p62 body が「シグナルの場」と「分解されるカーゴ」という異なる機能状態をいかに切り替えるのか、その分子機構の解明が重要である。

p62 の Ser403 リン酸化はユビキチン親和性を高める修飾として知られているが、この修飾が p62 body の大きさ、流動性、表面張力といった物性を制御し、オートファジー分解能を規定するかは未解明であった。また、この制御機構が培養細胞にとどまらず、神経細胞や組織といった生理的環境においても機能するのか、さらにリン酸化と脱リン酸化が同一凝縮体内でどのように拮抗し分解の閾値を設定するのかも明らかでなかった。

そこで本研究は、p62 body 内における Ser403 リン酸化の制御機構を同定し、この修飾が凝縮体の物性変化を介してオートファジー分解とプロテオスタシス制御に果たす役割を、分子・細胞・個体レベルで統合的に明らかにすることを目的とした。

方法

本研究では、p62 body（液滴）の物性とオートファジー分解の関係を明らかにするため、細胞・再構成・物理・構造・個体レベルを統合した解析を行った。まず、Huh-1 細胞を主系として、CRISPR および siRNA により TBK1 や PP2A（PPP2R5A/B/E）を操作し、p62 リン酸化と p62 body のサイズ・流動性・分解を評価した。FRAP や免疫蛍光解析に加え、STED、CLEM、免疫電子顕微鏡を用いて、p62 body の物性変化とオートファジー取り込みを多階層的に解析した。

次に、精製 p62 およびユビキチン鎖、NBR1、TAX1BP1、AZI2、TBK1 を用いた *in vitro* 相分離系を構築し、p62 body 形成と因子リクルート機構を検証した。さらに、PPP2R5E と KEAP1 の相互作用を AlphaFold3 予測、HS-AFM、NMR 滴定および免疫沈降により解析した。

p62 body の物理特性は、FRAP による分子移動性、表面揺らぎ解析による表面張力推定、Cahn-Hilliard モデルによる相分離シミュレーションにより評価した。最後に、p62 リン酸化模倣ノックイン ES 細胞由来神経細胞およびノックインマウス肝を用い、生理条件下での p62 body 動態とプロテオスタシスへの影響を検証した。

結果および考察

まず、TBK1 は活性型を含めて p62 body 内の限局したサブドメインに局在し、その局在には NBR1、TAX1BP1、AZI2 が必要であることが明らかとなった。TBK1 欠損やこれら因子のノックダウンにより p62 の Ser403 リン酸化が低下したことから、TBK1 が p62 body 内部で直接この部位をリン酸化することが示された。

一方、PP2A 阻害により Ser403 リン酸化は増加し、特に PPP2R5A/B/E を含む PP2A ホロ酵素がその脱リン酸化を担うことが分かった。PPP2R5E は KEAP1 との結合を介して p62 body に集積し、この相互作用を破壊すると局在および p62 body サイズ制御能が失われた。これらの結果から、TBK1 と PP2A は p62 body 内で拮抗的に作用し、リン酸化状態を動的に制御することが示された。

次に、p62 body の物性に着目した解析を行ったところ、PPP2R5A/B/E の抑制またはリン酸化模倣体 p62S403E（ヒト；マウス p62 の対応残基は S405E）の発現により、p62 body は小型化し、分子移動性が低下し、表面張力が上昇した。数理モデル解析においても、分子間相互作用の増強により多数の小型構造が安定化することが示され、Ser403/405 リン酸化が液状からより緻密なゲル様状態への転換を誘導すると考えられた。

機能的には、小型化した p62 body は単位体積あたりより多くの LC3 陽性構造を伴い、FIP200 依存的な p62 のオートファジー分解の促進および Bafilomycin A1 感受性の増大を示したことから、オートファジー取り込み効率が高いと考えられた。ヒ素ストレスにおいても Ser403 リン酸化は上昇し、リン酸化模倣体はユビキチン化基質の除去をより強く促進した。

さらに、p62S405E（リン酸化模倣）ノックインマウス ES 細胞由来神経細胞およびノックインマウス肝においても、p62 body は「小型で数が多い」表現型を示し、生理条件下でも本制御機構が機能することが明らかとなった。肝臓では不溶性画分中の p62 およびユビキチン化タンパク質が増加したが、これは分解不全ではなく、小型で形成されやすい p62 body が高速で回転する高フラックス状態を反映すると解釈される。この結果は、形成促進と分解促進が同時に進行するという本研究のモデルを強く支持する。

以上より、TBK1 と PP2A-PPP2R5A/B/E は p62 body 内で拮抗して Ser403/405 リン酸化の閾値を設定し、その結果として p62 body を流動的なシグナル状態から、分解に適した高張力・低流動性状態へと切り替える分子スイッチとして機能することが明らかとなった（図1）。これにより、p62 body は単なる凝集体ではなく、物性制御とオートファジー効率が結びついた可逆的な品質管理装置として理解される。

リン酸化により、p62凝集体は「大型で流動的」な状態から、「小型でゲル状」の状態へと変化し、分解効率が向上する

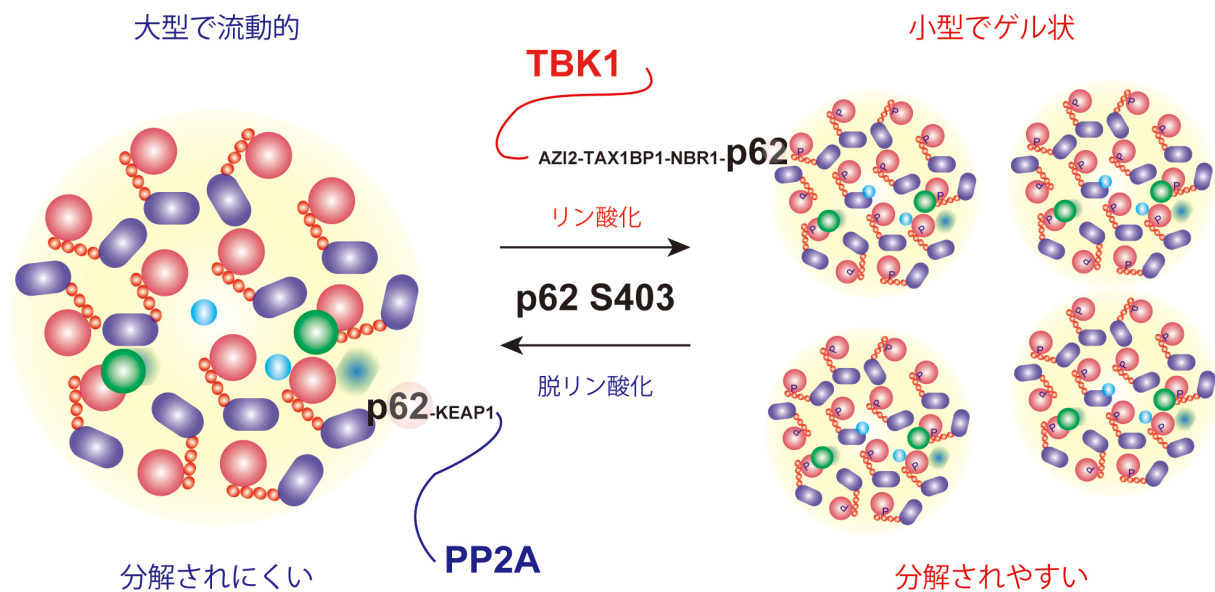


図 1. p62 body の性質がオートファジー分解効率を決める。

細胞の中では、不要になったり傷ついたタンパク質は「オートファジー」という仕組みによって分解される。その際、p62 というタンパク質がこれらを集めて「p62 body (液滴)」を作り、分解へと導く。この図は、その p62 body の性質が「リン酸化」という化学的な変化によって大きく変わることを示す。リン酸化が少ない状態では、p62 body は「大きくて流動的」であり、分解されにくい状態にある。一方、TBK1 リン酸化酵素によって p62 がリン酸化されると、p62 body は「小さくてゲル状」になり、分解されやすくなる。この変化は、PP2A という酵素によって元に戻すこともでき、可逆的に変化しする。つまり、p62 body は単なる「集まり」ではなく、その性質（柔らかさや大きさ）によって分解のされやすさが決まることが明らかとなった。

(完)

発表論文

- 1) Komatsu-Hirota S, Tabata K, Sou YS, Kakuta S, Sakamaki J-i, Tsuchiya H, Li J, Kumeta H, Sakai Y, Fujioka Y, Noshiro D, Shimobayashi SF, Kurimura T, Taniguchi T, Abe M, Koike M, Morishita H, Noda NN, Komatsu M*. Phosphorylation tunes p62 condensates to drive autophagic degradation of ubiquitinated proteins. EMBO J. in press.
- 2) Komatsu M*, Noda NN*, Inada T*. The mechanistic basis and cellular functions of UFMylation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2026 Jan 9. doi: 10.1038/s41580-025-00944-y.
- 3) Takada S, Shinomiya N, Mao G, Tsuchiya H, Koga T, Komatsu-Hirota S, Sou YS, Abe M, Ryzhii E, Suzuki M, Nakao M, Waguri S, Morishita H, Komatsu M*. KEAP1 retention in phase-separated p62 bodies drives liver damage under autophagy-deficient conditions. EMBO Rep. 2025 Jul;26(13):3384-3410. doi: 10.1038/s44319-025-00483-9.