

## 蛋白質液滴のオートファジーにおける初期過程の蛍光可視化

(東北大多元研<sup>1</sup>・東北大院生命<sup>2</sup>・日本医大<sup>3</sup>) ○高嶋 一平<sup>1</sup>・馮 逸凡<sup>2</sup>・山本 林<sup>3</sup>・水上 進<sup>1,2</sup>

Fluorescence imaging of initiation process in autophagy of protein condensates (<sup>1</sup>*Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University*, <sup>2</sup>*Graduate School of Life Sciences, Tohoku University*, <sup>3</sup>*Institute for Advanced Medical Sciences, Nippon Medical School*) ○Ippei Takashima,<sup>1</sup> Yifan Feng,<sup>2</sup> Hayashi Yamamoto,<sup>3</sup> Shin Mizukami<sup>1,2</sup>

Liquid-liquid phase separation of protein condensate (hereafter referred to as “droplet”) regulates intracellular protein activities through the autophagic degradation (fluidophagy) which has recently attracted attention as an intracellular event. Here we report a chemical tool to spatiotemporally detect the initial process of fluidophagy via the fluorogenic inverse electron-demand Diels-Alder (IEDDA) reaction. In this method, diene (tetrazine) and dienophile of the IEDDA reaction are introduced into the protein on the droplet and LC3B on the isolation membrane, respectively. When the droplet contacts the isolation membrane during autophagy process, both reactants are placed in close proximity, promoting the fluorogenic IEDDA reaction along the contact interface. In contrast, the reaction does not proceed without autophagy induction due to the controlled reactivity of the designed reactant pair. In this presentation, we will also show the result using this tool to monitor fluidophagy process from contact between the droplet and the isolation membrane to lysosome fusion.

**Keywords :** *fluidophagy; membrane contact site; Fluorescence detection*

タンパク質凝縮の液液相分離（以下、液滴）は細胞内タンパク質の活性制御に関わり、その制御機構の一つとして液滴オートファジー (fluidophagy) が近年注目されている。本発表では、この液滴オートファジーの初期過程として、液滴と隔離膜間の接触を発蛍光型の逆電子需要ディールズアルダー (IEDDA) 反応で時空間的に検出する手法を紹介する。本手法では、反応剤ペアであるジェン（テトラジン）とジェノフィルをそれぞれ液滴側のタンパク質と隔離膜上に局在する LC3B へ導入する。オートファジーの誘導により液滴が隔離膜に認識され、両反応剤が近接することで発蛍光型 IEDDA 反応が生じる。また、これら反応剤ペアの構造最適化により、オートファジーが誘導されない場合には反応が進行しないように調整した。さらに本ツールを用いて液滴と隔離膜間での接触からリソソーム融合に至る液滴オートファジー過程のモニタリングを行ったので合わせて報告する。