

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 2年 4月30日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名	徳島大学 先端酵素学研究所
職 名	教授
研究代表者	小迫 英尊

下記のとおり令和元年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 19010)

1. 共同研究課題名	線虫と哺乳類細胞を用いた TBK1 ファミリーの恒常性維持機構の解明			
2. 共同研究目的	TBK1 ファミリーは自然免疫応答やオートファジーで重要な役割を果たすセリン/スレオニンキナーゼである。本共同研究では、最先端のプロテオミクス技術と線虫を用いた個体レベルでの遺伝学的解析を組み合わせることにより、恒常性維持における TBK1 ファミリーの多面的な分子機能を明らかにする。			
3. 共同研究期間	平成31年 4月 1日 ~ 令和 2年 3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 小迫 英尊	先端酵素学研究所	教授	研究の総括と質量分析	
(分担研究者) 茂谷 康	先端酵素学研究所	講師	哺乳類細胞からのサンプル調製	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	生体膜機能分野	氏 名	佐藤 美由紀

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

TBK1 ファミリーは、哺乳類では TBK1 および IKK ϵ 、線虫では IKKE-1 などから成り、自然免疫応答やミトコンドリア分解を介した代謝調節系などで重要な役割を果たしている。TBK1 の多面的な役割を分子レベルで明らかにするためには、TBK1 の相互作用因子や下流基質を網羅的に同定してその機能を明らかにする必要がある。そこでまず TBK1 を活性化または阻害した哺乳類細胞を出発材料とした大規模定量リン酸化プロテオーム解析を行う。また IKKE-1 と相互作用する父性ミトコンドリア特異的なオートファジー受容体である ALLO-1 に注目し、クロスリンク-質量分析(XL-MS)解析によって IKKE-1/ALLO-1 複合体の相互作用部位を同定する。

7. 共同研究の成果

本年度は以下の2つの成果を得た。

1. マウス RAW264.7 マクロファージ細胞を用いて、STING リガンドで STING/TBK1 経路を活性化または TBK1 阻害剤で抑制した細胞抽出液を調製した。そして抽出液をトリプシン消化した後、TMT (tandem mass tag) 標識と IMAC (immobilized metal affinity chromatography) によるリン酸化ペプチドの精製、および高 pH 条件での逆相分画を組み合わせたところ、LC-MS/MS 解析によって約2万種類のリン酸化ペプチドを比較定量することに成功した。その結果、既知の TBK1 基質である IRF3 や STING と共に、LC3 ファミリーに属するオートファジー関連分子などを新たな TBK1 基質候補として見出した。現在これらの分子の線虫での RNAi 実験を計画中である。
2. GFP と融合した ALLO-1 を線虫卵に発現させ、質量分析中に切断可能な DSBU (disuccinimidyl dibutyric urea) を用いて卵抽出液中で複合体をクロスリンクし、GFP-Trap (アルパカ由来 GFP 結合 nanobody 固定化ビーズ) で ALLO-1/IKKE-1 複合体を免疫沈降した。沈降物を on-bead トリプシン消化し、LC-MS/MS 解析したところ、ALLO-1 と IKKE-1 の分子間クロスリンクペプチドは検出されなかったが、ALLO-1 の分子内クロスリンクペプチドは検出された。現在分子間クロスリンクを検出するための条件を検討中である。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

なし

② この共同研究に基づくとの記載のある論文

なし