

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 3 年 5 月 1 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 2 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において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、生体の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 | 令和 2 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 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、細胞質 DNA に対する STING-TBK1-IRF3 経路による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 の下流基質をアンパイアスに同定してそのリン酸化による機能制御を明らかにする必要がある。そこで哺乳類細胞において STING との相互作用タンパク質を BioID (proximity-dependent biotin identification)法によって大規模に同定し、TBK1 の基質となる分子があるか検証する。また TMT (tandem mass tag)標識法を用いた大規模定量リン酸化プロテオーム解析により、IKKE-1 依存的にリン酸化されることが判明した EPG-7 について、免疫沈降-質量分析によってリン酸化部位を全て同定することを試みる。

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に高活性ビオチン化酵素 TurboID と融合した STING を安定発現させ、STING アゴニスト処理の有無でビオチン標識を行なった後、抽出液をトリプシン消化した。ビオチンとの可逆的結合能を有する Tamavidin 2-REV ビーズを用いてビオチン化ペプチドを精製し、LC-MS/MS 解析したところ、4000 種類以上のビオチン化ペプチドが定量され、STING の活性化によって IRF5 (interferon regulatory factor 5)が複数の部位でビオチン化されることが判明した。そこで、IRF5 が TBK1 によってリン酸化されるか検討したところ、Phos-tag ウェスタンブロットにおいて TBK1 の活性化に依存した IRF5 のバンドシフトが検出された。現在このリン酸化シフトしたバンドを切り出し、IRF5 のリン酸化部位の同定を試みている。
2. GFP と融合した EPG-7 を線虫卵に発現させ、GFP-Trap (アルパカ由来 GFP 結合 nanobody 固定化ビーズ) で免疫沈降した。沈降物をビーズ上でトリプシン消化し、LC-MS/MS 解析したところ、TMT 標識法で同定された部位とは異なる 3 箇所のリン酸化部位が同定された。これらの部位でのリン酸化が ikke-1 変異体で減少するか、またリン酸化部位を変異させると父性ミトコンドリアのオートファジーに影響が出るか検討中である。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換 (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

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

- ・第 93 回日本生化学会大会、2020 年 9 月 14-16 日、「最先端プロテオミクス技術を用いた疾患に関与するシグナル伝達機構の解明」

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

- ・2020 年 5 月: EPG-7 の免疫沈降-質量分析についてメールと電話で打ち合わせ後、抽出液の輸送
- ・2020 年 7 月: GFP-Trap を用いた質量分析の結果について電話で議論
- ・2021 年 2 月: EPG-7 の免疫沈降-質量分析についてメールで打ち合わせ
- ・2021 年 2 月: EPG-7-GFP 発現受精卵抽出液の輸送