

令和2年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究		
研究課題名		TBK1 が活性化する脂質ドメインの同定		
新規・継続の別		新規・継続		
研究代表者	所属	東北大学 大学院生命科学研究科	40歳 以下○	35歳 以下○
	職名・氏名	助教・向井 康治朗		○
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	東北大学 大学院生命科学研究科	/	/
	職名・氏名	大学院生・進藤 瑠璃		○
	所属	東北大学 大学院生命科学研究科	/	/
	職名・氏名	大学院生・湯本 瑛亮		○
	所属	東北大学 大学院生命科学研究科	/	/
職名・氏名	大学院生・朽津 芳彦		○	
受け入れ教員	職名・氏名	教授・田中 一馬		
概要 (100～150 字程度)		本研究では、脂質とタンパク質分布を同時に観察し評価する顕微鏡実験系（共通実験装置 FV-1000 を使用）を利用し、DNA 刺激時に TBK1 キナーゼがリクルートされるゴルジ体の脂質ドメインの性質を明らかにする。		
研究目的 (300 字程度)		これまでに、細胞質 DNA に応答して I 型インターフェロンを産生するシグナル伝達経路（STING 経路）において、TBK1 キナーゼがゴルジ体の一部の領域にリクルートされて活性化していることを明らかにしてきた（Ogawa & Mukai et al., BBRC 2018）。この知見から TBK1 はゴルジ体の膜ドメイン上で活性化している可能性が考えられたため、本研究において TBK1 が活性化している膜ドメインに局在する脂質分子の性質を明らかにすることを目指した。		
研究内容・成果 (1000 字程度・Web 会議の回数も記載)		細胞質に DNA が露出すると、細胞質 DNA センサーである cGAS（cyclic GMAP-AMP synthase）が活性化し、セカンドメッセンジャーである cGAMP（cyclic GMAP-AMP）が産生される。cGAMP は小胞体局在の 4 回膜貫通タンパク質 STING に結合し、STING は小胞体からゴルジ体へと輸送される。ゴルジ体へ移行した STING はパルミトイル化修飾を受けた後に、下流キナーゼ TBK1 をリクルートするが（Mukai et al, <i>Nat Commun</i> 2016）、膜タンパク質である STING が脂質修飾を受ける意義は不明であった。我々は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸で修飾されたタンパク質は脂質ラフトとの親和性が上がること（Levental et al., <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 2010）、および、脂質ラフト構成因子であるスフィンゴミエリンはゴルジ体で生合成されること（Duran et al., <i>EMBO J</i> 2012）に着目し、パルミトイル化された STING がゴルジ体の脂質		

	<p>ラフト様ドメインで TBK1 をリクルートしているのではないかと考えた。そこで本研究では、スフィンゴミエリンが濃縮しているドメインを可視化し、そのドメインに TBK1 がリクルートされるかを検証した。まず、スフィンゴミエリン結合タンパク質であるイソギンチャク由来の毒素 Equinatoxin-II (Bakrac et al., <i>J Biol Chem</i> 2010; Makino et al., <i>FASEB J</i> 2014) のアミノ酸を置換し、pore-forming 活性を減弱させた改変型 Equinatoxin-II を作製した。この mCherry タグ付き Equinatoxin-II を細胞にトランスフェクションし、STING アゴニストを添加した後に、細胞を固定して内在性の TBK1 を免疫染色した。その細胞サンプルを共通実験装置 FV-1000 で観察したところ、STING アゴニスト刺激依存的に核近傍に集積した TBK1 が、ゴルジ体上の Equinatoxin-II と共局在している様子が観察された。この結果より、ゴルジ体上のスフィンゴミエリンが濃縮している脂質ラフト用ドメインに TBK1 がリクルートされている可能性が示唆された。これら本年度の実験の多くは、コロナ禍の状況下から研究代表者の研究室で行い、実験の結果の議論を田中研究室岸本助教を中心にオンラインならびに電話で進め、方向性を決定づけた。また、Equinatxoin-II の調製に関しては一部、岸本助教が行なった。今後は、この TBK1 のリクルートにスフィンゴミエリンが必要であるかを次年度の共同利用プログラムから検討していきたい。</p>
<p>成果</p>	<p>【学会報告】</p> <p>「自然免疫分子 STING の小胞体局在性維持機構とその破綻に起因する遺伝性自己炎症性疾患」向井康治朗, 小川笑満里, 朽津芳彦, 植村武文, 和栗聡, 鈴木健裕, 堂前直, 新井洋由, Anthony K. Shum, 田口友彦, 第 93 回日本生化学会大会 2020 年 9 月 16 日, オンライン開催</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 「細胞内物質輸送異常が引き起こす STING の活性化に起因する自己炎症性疾患」向井 康治朗, 小川 笑満里, 朽津 芳彦, 新井 洋由, 田口 友彦, 第 7 2 回日本細胞生物学会大会 2020 年 6 月 9 日 ● 「ホスファチジルイノシトール -4 リン酸(PI4P)近傍タンパク質の解析」ニシユンウェイ, 向井康治朗, 鈴木 健裕, 堂前直, 新井 洋由, 田口 友彦, 河野望, 第 7 2 回日本細胞生物学会大会 2020 年 6 月 9 日, オンライン開催 ● 「リン酸化 STING を認識するモノクローナル抗体の作製」高橋 花乃子, 湯本 瑛亮, 高谷 英子, 進藤 瑠璃, 高阿田 有希, 篠島 あゆみ, 堀口 雛, 朽津 芳彦, 向井 康治朗, 田口 友彦, 第 7 2 回日本細胞生物学会大会 2020 年 6 月 9 日, オンライン開催

	<ul style="list-style-type: none"> ● 「光クロスリンク技術を用いた自然免疫分子 STING の結合タンパク質の探索」進藤 瑠璃, 樋野 展正, 土井 健史, 向井 康治朗, 田口 友彦, 第72回日本細胞生物学会大会 2020年6月9日, オンライン開催 ● 「自然免疫分子 STING は trans-Golgi network において下流キナーゼ TBK1 をリクルートする」見目 悠, 向井 康治朗, 田口 友彦, 第72回日本細胞生物学会大会 2020年6月9日, オンライン ● 「自然免疫分子 STING シグナルの収束機構」朽津 芳彦, 高阿田 有希, 向井 康治朗, 田口 友彦, 第72回日本細胞生物学会大会 2020年6月9日, オンライン開催
	<p>【論文発表】 該当ありません。</p>
	<p>【新聞報道】 該当ありません。</p>