

令和 3 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 ・ <span style="border: 1px solid black;">継続</span>                                                                                                                                                                                                                                                                              |             |             |
| 研究代表者                              | 所属    | 東北大学<br>大学院生命科学研究科                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 40 歳<br>以下○ | 35 歳<br>以下○ |
|                                    | 職名・氏名 | 助教・向井康治朗                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |             | O           |
| 研究分担者<br>(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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |             | O           |
|                                    | 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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |             | O           |
|                                    | 所属    | 東北大学 大学院生命科学研究科                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |             |             |
|                                    | 職名・氏名 | 大学院生・松本健太郎                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |             | O           |
|                                    | 所属    | 北海道大学・遺伝子病制御研究所                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |             |             |
|                                    | 職名・氏名 | 助教・岸本拓磨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |             |             |
| 受け入れ教員                             | 職名・氏名 | 教授・田中一馬                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |             |             |
| 概要<br>(100～150 字程度)                |       | 本研究は、I 型インターフェロン応答シグナルを活性化する際に重要な役割を担うキナーゼ TBK1 がオルガネラ膜にターゲッティングする分子機構を明らかにすることを目的とする。本年度は、TBK1 がリクルートされる部位の膜脂質に着目し研究を進めた。                                                                                                                                                                                                         |             |             |
| 研究目的<br>(300 字程度)                  |       | 申込者の向井は、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た (Ogawa & Mukai et al., <i>BBRC</i> 2018; Kemmoku et al., <i>Cell Struct Funct</i> 2022)。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る。本研究では、各脂質関連プローブを細胞に発現させ、TBK1 が活性化しているゴルジ体の膜ドメインに局在する脂質膜の性質を明らかにすることを目的とする。                      |             |             |
| 研究内容・成果<br>(1000 字程度・Web 会議の回数も記載) |       | 本研究では、まず TBK1 がリクルートされるゴルジ体と脂質を同時に観察するための細胞の作成を行った。具体的には、Halotag を付加した Rab6 (ゴルジ体タンパク質) を安定発現するマウス胎児線維芽細胞 (Halo-Rab6 安定発現細胞) を作製した。膜ドメイン可視化に関しては、脂の質流動性を可視化することができる di-ANEPPDHQ を用いた。このプローブの解析方法に関しては、これまでに di-ANEPPDHQ を用いた解析の実績がある (Makino et al., <i>FASEB J</i> 2017) 田中研究室岸本助教と複数回に渡る議論 (電話及び web 会議を合計 8 回、岸本助教の東北大への出張 1 回) |             |             |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <p>を行い、実験系の確立を進めた。当初は北海道大学の顕微鏡を利用する予定であったが、コロナ禍に対応するため、研究の中心は当研究室顕微鏡装置での細胞内解析にシフトし、解析方法に関して具体的にアドバイスをいただいた。</p> <p>実験手順としては、膜透過性 Halo タグリガンド (STELLA Fluor 650) と di-ANEPPDHQ を培地中に添加した後に共焦点顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した。その後、Rab6-Halo の画像をもとにゴルジ体領域の di-ANEPPDHQ シグナル画像を抜き出して、ゴルジ体の膜流動性を定量した。この実験系を利用して研究を遂行し、ゴルジ体にコレステロールを輸送する OSBP の機能阻害を行った細胞において、ゴルジ体の脂質の流動性が上昇するとともに、TBK1 を介した I 型インターフェロン応答が減弱する結果を得た。この結果より、TBK1 がゴルジ体で活性化する際に、コレステロールが作り出すゴルジ膜の膜環境が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。現在、TBK1 自体とゴルジ膜の脂質状態を同時に可視化するために、Halo タグを付加した TBK1 発現細胞の条件検討を進めている。</p> |
| 成果 | <p>【学会報告】</p> <p>参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|    | <p>【論文発表】</p> <p>著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のこと</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | <p>【新聞報道】</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |