

令和4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 生命科学研究所	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所		
	職名・氏名	大学院生・松本健太郎	○	
	所属	東北大学大学院生命科学研究所		
	職名・氏名	大学院生・進藤瑠璃	○	
受け入れ教員	職名・氏名	田中一馬		
概要 (100～150 字程度)		研究代表者の以前の研究から、自然免疫応答経路 STING シグナルにおいて、下流キナーゼ TBK1 がゴルジ体膜の一部の領域で活性化することを明らかにしてきた。この知見に着目し、本研究では、 TBK1 活性化に必要なゴルジ体脂質ドメインの特性の解析を行う。		
研究目的 (300 字程度)		研究代表者の向井は、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。そこで本研究では、脂質プローブを用いて 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的とした。		
研究内容・成果 (1000 字程度・Web 会議の回数も記載)		スフィンゴミエリンプローブ (Equinatoxin-II)、コレステロールプローブ (Filipin III, θ -toxin iD4H ドメイン)、脂質膜のパッキング (≡ 流動性) を可視化するプローブ (di-4-ANEPPDHQ) を用いて、 TBK1 がリクルートされた膜が脂質ラフト様の性質をもつかを検証した。具体的には、まず、mNeonGreen- θ -toxin iD4 と TBK1 -mScarletI を安定発現させたマウス胎児線維芽細胞を、DNA で刺激して共焦点顕微鏡観察を行った。その結果、mNeonGreen- θ -toxin iD4 と TBK1 -mScarletI がトランスゴルジネットワーク上で共局在することを見出した。さらに、mNeonGreen- θ -toxin iD4 リコンビナントタンパク質を作成し、in vitro でコレステロール含有リポソームとの結合実験を行った。その結果、30%以上のコレステロールを含む膜と結合したことから、 TBK1 がリクルートされる膜は 30%以上のコレステロールを含む膜領域である可能性が示唆された。コレステロールは膜の流動性と密接に関係しているため、次に TBK1 がリクルー		

	トされる領域の膜の流動性の可視化を試みた。具体的には、TBK1-Halo を安定発現させたマウス胎児線維芽細胞を DNA で刺激して、di-4-ANEPPDHQ のレシオ画像と比較した。その結果、TBK1 がリクルートされる膜の流動性は、細胞内の他の領域に比べて優位に低いことが明らかとなった。 なお、これらの解析にあたり、Zoom を用いた web 会議を 5 回実施している。<u>また、研究分担者の進藤が令和 5 年 2 月に、研究所にて技術指導を受けるために訪問した。実験レクチャーを受けたほか、今後の実験方針についても議論した。</u>
成果	【学会報告】 向井 康治朗, 朽津 芳彦, 田口 友彦、リソソームミクロオートファジーによる STING の分解を介した自然免疫応答制御、生化学会大会、名古屋、2022 年 11 月 9 日
	【論文発表】 Shindo, R., Kuchitsu, Y., Mukai, K., and Taguchi, T. (2022). The activity of disease-causative STING variants can be suppressed by wild-type STING through heterocomplex formation. <i>Front Cell Dev Biol</i> 10, 1037999. (IF 6.081) Kemmoku, H., Kuchitsu, Y., Mukai, K., and Taguchi, T. (2022). Specific association of TBK1 with the trans-Golgi network following STING stimulation. <i>Cell Struct Funct</i> 47, 19-30. (IF 2.29)
	【新聞報道】 該当ありません