

研究題目 父性オルガネラ選択的オートファジーを制御する分子機構の解析

研究組織

研究代表者：佐藤 美由紀（群馬大学・生体調節研究所）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学・先端酵素学研究所藤井節郎記念医科学センター）

研究分担者：佐々木 妙子（群馬大学・生体調節研究所）

榎田 康晴（群馬大学・生体調節研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

選択的オートファジーは細胞内の恒常性維持に寄与しており、その異常はがんや神経変性疾患など様々な疾患の発症に関与することが明らかとなりつつある。線虫 *C. elegans* の受精卵では、精子由来のミトコンドリア等の父性オルガネラがアロファジーと呼ばれる選択的オートファジーによって分解され、この経路はミトコンドリア DNA 母性遺伝の仕組みとして、また選択的オートファジーのモデル系として注目されている。代表者らと小迫の研究グループは最近、新規オートファジーアダプター・ALLO-1 と TBK1 ファミリーキナーゼ・IKKE-1 がアロファジーの基質選択性に関与することを見出した (*Nat. Cell Biol.*, 2018)。本研究ではこれら因子の作用機構を解明するため、IKKE-1 のリン酸化標的や ALLO-1 相互作用因子の探索を試みた。

[1-2]研究の方法・経過

TMT (tandem mass tag) 標識法と IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) によるリン酸化ペプチドの精製法を組み合わせることにより、*ikke-1* または *allo-1* 破壊株の受精卵で

リン酸化レベルが低下するペプチドの同定を行った (①)。

また、GFP-ALLO-1 を発現する線虫から受精卵を集め、PFA で架橋後に GFP-Trap によるプルダウン法で GFP-ALLO-1 を回収し、質量分析により結合タンパク質の同定を試みた (②)。

さらに、これらの方法で同定された因子がアロファジーに関与するのかを機能的二次スクリーニングにより検証した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

①の方法により、*ikke-1* または *allo-1* 破壊株でリン酸化レベルが低下するペプチドが複数見出された。その中に、すでにリン酸化部位として同定していた ALLO-1 の Thr-74 に加え、新たに2カ所の ALLO-1 リン酸化部位を見出した。これらの部位を全てアラニンに置換した変異体を作製し、分子量の変化によりリン酸化型の有無を確認したところ、この変異体でもリン酸化型が一部残っていることが判明した。ALLO-1 のすべてのリン酸化部位の同定を目指し、再度の解析を予定している。また、*ikke-1* 変異体でリン酸化レベルが顕著に低下する因子に関して

RNAiによる二次スクリーニングを行ったところ、アロファジーに関与する因子を同定した。現在、この因子に対するリン酸化の意義を明らかにするための解析を行っている。

また、②の方法で同定した因子に対しても二次スクリーニングを行ったが、ノックダウンによりアロファジーが強く阻害される因子は現在までのところ見つかっていない。架橋反応が適切でなかった可能性があるため条件検討を再度行うとともに、PFA以外の架橋剤の使用も検討している。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究においてIKKE-1によるリン酸化標的の候補を同定することができた。また、ALLO-1にも複数のリン酸化部位が存在することが明らかとなった。今後は、このリン酸化の意義の解明や、IKKE-1による直接のリン酸化であることの検証等を行う予定である。それにより、アロファジーの制御におけるリン酸化の役割が明らかにできるものと考えている。哺乳類におけるゼノファジーやマイトファジーにおいてもTBK1キナーゼがオートファジーアダプターをリン酸化することが知られているが、アダプター以外の未知のリン酸化基質の存在も示唆されている。本研究は選択的オートファジー経路におけるキナーゼの役割を理解するためのモデルとしても期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) 佐藤美由紀. ミトコンドリアのオートファジーによる分解とその生理機能. 生体の科学 69(6) : 586-590, 2018年.

[3-2]学会発表

1) 佐藤美由紀, 佐藤健. キナーゼとアダプターによる父性オルガネラ選択的オートファジーの制御. 第91回日本生化学会大会, 京都国際会館, 9月26日, 2018年.

2) Miyuki Sato, Ken Sato. The autophagy receptor ALLO-1 and the TBK1/IKK ϵ -related kinase regulate clearance of paternal mitochondria in *C. elegans*. 第41回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 11月29日, 2018年.

[3-3]成果資料等

なし.

【4】今後の課題等

解析の精度を上げるためには試料調製法のさらなる工夫が必要であるが、線虫においてもプロテオミクスを用いた解析の有効性を示すことができたと考えている。