

平成30年3月19日

平成29年度 徳島大学先端酵素学研究所「共同利用・共同研究」

成果報告書

申請者

氏名：佐藤美由紀 (e-mail: m-sato@gunma-u.ac.jp)

所属：群馬大学・生体調節研究所・生体膜機能分野 准教授

群馬県前橋市昭和町3-39-15 (電話：027-220-8842, FAX：027-220-8844)

申請項目

共同研究 B-5 細胞情報学分野 (担当:小迫英尊教授)

申請内容

選択的オートファジーを制御する分子機構の解析

研究内容

選択的オートファジーはタンパク質凝集体や感染病原菌, 不良ミトコンドリアなどを選択的に分解に導くシステムであり, その異常はがんや神経変性疾患などさまざまな疾患の発症に関与することが明らかとなってきた。申請者らは以前, 線虫 *C. elegans* の受精卵において精子に由来するミトコンドリア等の父性オルガネラを基質とする新たな選択的オートファジー経路, allophagy を発見した (Sato & Sato, *Science*, 2011)。さらに allophagy における基質選択性に関与する分子の探索を行い, オートファジーアダプターとして働く新規分子 ALLO-1 と哺乳類の TBK1・IKKεファミリーに相同性を示す IKKE-1 キナーゼを見出した。TBK1 は哺乳類において自然免疫に加え選択的オートファジーにも関与し, optineurin などのオートファジーアダプターをリン酸化することが報告されている。本共同研究では ALLO-1 が IKKE-1 によるリン酸化の標的である可能性を検証するため, まず ALLO-1 のリン酸化部位の同定を試みた。GFP-ALLO-1 を線虫受精卵から免疫沈降し, トリプシン消化後に質量分析によってリン酸化ペプチドを検出したところ, 1カ所のリン酸化部位 (T74) の同定に成功した。さらに, ターゲット質量分析法の1つである parallel reaction monitoring (PRM)法を用い

た比較定量解析により、*ikke-1* 変異体ではこの部位のリン酸化のレベルが有意に低下することも判明し、ALLO-1 が IKKE-1 の基質の一つである可能性が示された。これらの結果を含む一連の研究成果は、本年度 Nature Cell Biology 誌に Article として掲載された（論文1）。

一方で、IKKE-1 の標的は ALLO-1 T74 だけでなく、これ以外にも未知の基質があることがこれまでの解析結果から示唆されている。そこで、この未知の基質を同定するため、野生型または *ikke-1* 変異体の受精卵におけるリン酸化ペプチドの網羅的定量解析を行った。ここでは TMT (tandem mass tag) 標識法と IMAC (immobilized metal affinity chromatography) によるリン酸化ペプチドの精製法を組み合わせた方法を用いた。その結果、*ikke-1* 変異体でリン酸化レベルが顕著に低下するタンパク質が見出された。現在、線虫を用いてこのリン酸化の生理的意義の検討を行っている。

論文

- 1) Sato, M., Sato, K., Tomura, K., Kosako, H., and Sato, K. (2018). The autophagy receptor ALLO-1 and the IKKE-1 kinase control clearance of paternal mitochondria in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Cell Biology** 20, 81-91.

学会発表

- 1) The 8th International Symposium on Autophagy
The mechanism of paternal mitochondria clearance via allophagy
2017.5.29-6.1, Nara Kasugano International Forum IRAKA (奈良市)
- 2) ConBio2017
「父性オルガネラ選択的オートファジーにおける基質認識のメカニズム」
2017. 12. 6-9, 神戸ポートアイランド (神戸市)
- 3) 第 123 回日本解剖学会全国学術集会
「オートファジーによる父性オルガネラ選択的分解の分子メカニズム」
2018. 3. 28-30, 日本医科大学武蔵境校舎 (東京都武蔵野市)