

研究題目 小胞体-ミトコンドリア繫留タンパク質 PDZD8 修飾酵素の同定

研究組織

研究代表者：平林祐介（東京大学工学系研究科）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：長尾崇弘（東京大学工学系研究科）

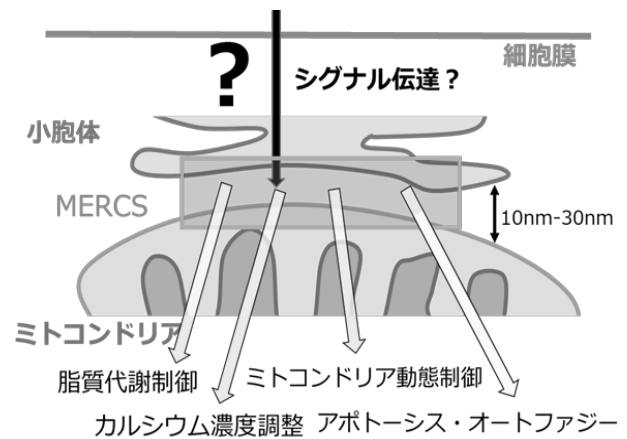
【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

近年、細胞内のオルガネラ同士の物理的接触場が様々な生体恒常性に必須の生化学反応に不可欠であることが明らかになってきた。ミトコンドリア-小胞体間接触場 (MERCS : Mitochondria-ER Contact Site) ではこれらのオルガネラ同士が 10nm-30nm に近接しており、その形成がカルシウム濃度、脂質代謝、オートファジーなどに重要な働きを果たすことが示されつつある (図)。MERCS 形成は細胞の状態や環境に依存することが報告されており、MERCS 量の異常もアルツハイマー病やパーキンソン病の患者やモデル動物において観察されている。従って、MERCS 形成量の制御は非常に重要であるが、その制御機構はほとんど分かっていない。

一方、我々は、哺乳動物細胞において小胞体局在タンパク質 PDZD8 が MERCS 形成を担う主要な繫留因子であることを初めて明らかにした (Hirabayashi et al., *Science*, 2017)。重要なことに、昨年までの共同利用により小迫教授と行った質量分析の結果、PDZD8 の複数のセリン残基がリン酸化されていることが明らかになった。これらは、キナーゼカスケードによる PDZD8 のリン酸化を介した MERCS 形成制御の可能性を強く示唆する。

そこで本研究では、PDZD8 をリン酸化するキナーゼの同定による、リン酸化シグナル伝達依存的 MERCS 形成制御機構の解明を目的とした。本研究は、MERCS 形成がどのような外部シグナルにตอบสนองし、如何なるシグナル伝達ネットワークを介して時空間的に制御されるのかを明らかにする上で非常に重要な研究である。



図：ミトコンドリア-小胞体接触の概要
MERCS 形成はカルシウム動態制御を始めとした様々な細胞内機能との関連が示唆されている

[1-2] 研究の方法・経過

本共同研究では、PDZD8 をリン酸化するキナーゼを同定するために、シグナル依存的に PDZD8 と相互作用するタンパク質を TurboID 法により探索した。そのために、PDZD8 にビオチン化酵素 TurboID を融合したタンパク質を発現させた細胞にビオチンを添加し、PDZD8-TurboID によりビオチン化されたタンパク質、即ち PDZD8 の極近傍 (20 nm 以内と考えられている) に存在するタンパク質を同定した。ビオチン化タンパク質の同定には、小迫教授らが最近開発した新規アビジン様タンパク質 Tamavidin 2-REV によるビオチン化ペプチドの濃縮法 (Motani & Kosako, *J. Biol. Chem.*, 2020) を用いた。実験は計画通りに遂行し、様々なリン酸化制御の候補タンパク質を得た。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果
Tamavidin 2-REV により濃縮されたビオチン化ペプチドの LC-MS/MS 解析の結果を統計処理し、Control に比べ有意に多く免疫沈降されてきたタンパク質を同定した。その結果、これまでの培養細胞を用いた研究の結果や既報から結合が予想されたタンパク質群が同定された。その中から、キナーゼおよびホスファターゼを探索した結果、20 以上の候補因子を得ることが出来た。現在、これらの候補因子について PDZD8 の修飾に果たす役割を検討している。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

タンパク質複合体形成のような恒常的相互作用とは異なり、キナーゼとその基質の相互作用はリン酸化導入に伴い解離する一過的な相互作用であることが多い。そのため基質からキナーゼを同定するには、PDZD8 側からキナーゼをビオチンといった小分子で標識した後、質量分析によってビオチン化されたタンパク質を網羅的に探索することが必要不可欠である。そこで、TurboID スクリーニングなどの大規模相互作用解析の分野を牽引する小迫教授との共同研究が必要となった。本共同研究の結果は、今回用いた手法の有用性を示すものである。

今回得られた候補因子の中から PDZD8 を修飾する酵素を同定し、それによる修飾が持つ生理的意義を明らかにすることによって、MERCs 形成制御を担うシグナル伝達経路を同定することが可能になる。これにより、これまで見過ごされてきたであろう MERCs と疾患の因果関係を見つけ、新たな治療法を確立するための礎となり、社会的にも大きなインパクトを持つ。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表
なし。

[3-2] 学会発表
なし。

[3-3] 成果資料等
なし。

【4】今後の課題等

本年度中の修飾酵素の同定には至らなかったが、得られた候補因子についての更なる研究により、PDZD8 については MERCs の制御について明らかにしていく。