

研究題目 リン酸化を介した父性オルガネラ選択的オートファジーの制御

機構

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）

研究分担者：佐々木妙子（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不良ミトコンドリアや感染病原体などを選択的に分解に導くシステムとして細胞内の恒常性維持に寄与しており、基質選択性を規定するメカニズムの解明が求められている。われわれはモデル生物である線虫 *C. elegans* の受精卵において、ミトコンドリアを含む精子由来オルガネラが選択的オートファジー (allophagy) によって分解されること、またこの分解がミトコンドリア DNA の母性遺伝のメカニズムとして働くことを見出した (Sato & Sato, *Science*, 2011)。さらに、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 allophagy において基質の認識に関わることを明らかにした。その中で、小迫教授との共同研究により、ALLO-1 上のリン酸化部位を質量分析によって同定し、ALLO-1 T74 のリン酸化レベルが IKKE-1 に依存していることを見出した (Sato et. al., *Nature Cell Biol.*, 2018)。一方で、これまでの解析から、ALLO-1 T74 以外にも IKKE-1 のリン酸化基質が存在する可能性が強く示唆されており、allophagy における IKKE-1 の役割は未だ十分に解明されていない。そこで、本研究では小迫教授と共同研究を継続し、IKKE-1 の新たなリン酸化基質の同定を試み、選択的オートファジーにおけるリン酸化の意義を明らかにす

ることを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

われわれは 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、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比較定量解析を行い、*ikke-1* 変異体でリン酸化レベルが有意に低下するペプチドを複数見出していた。その中にオートファジーの開始を制御する ATG1/ULK1 複合体の構成因子 X が含まれており、その遺伝子破壊株では allophagy が阻害されることを確認した。しかし、TMT 解析で同定した 1ヶ所のリン酸化部位に点変異を導入しても allophagy において明らかな表現型を示さないこと、また Western blotting においてリン酸化フォームが依然として検出されることから、リン酸化部位が複数存在することが示唆された。

そこで因子 X の新たなリン酸化部位を同定するため、GFP タグを融合した因子 X を GFP-Trap を用いて受精卵から免疫沈降で回収し、質量分析を行った。その結果、因子 X には少なくとも 14 か所のリン酸化部位が存在することが明らかとなった。これらすべてのリン酸化部位をアラニンに置換した変異体を作製し、遺伝子破壊株への入れ戻し実験を行ったところ、allophagy による父性オルガネラ分解が遅延し

たことから、allophagy の正常な進行にリン酸化による制御が関与することが示唆された。

また、*allo-1* 変異体では IKKE-1 と因子 X の父性オルガネラ周囲への局在化がともに失われること、ALLO-1 と因子 X が物理的相互作用することも明らかとなり、ALLO-1 を介して IKKE-1 と因子 X が近接することでリン酸化される可能性が考えられた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本研究により線虫受精卵を用いたプロテオミクスの手法を確立し、その有効性を示すことができた。また、選択的オートファジーにおける IKKE-1 の新たなリン酸化基質の候補を同定し、リン酸化による制御が正常な allophagy の進行に必要であることが明らかとなった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

選択的オートファジーはパーキンソン病などさまざまな病態にも関与しており、その詳細な分子機構の解明が望まれている。IKKE-1 の哺乳類ホモログである TBK1 は選択的オートファジーにおいて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、それ以外のオートファジー関連因子のリン酸化は報告されておらず、選択的オートファジーにおける新たなリン酸化の意義の解明につながるものと期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

1) 佐藤美由紀、佐々木妙子、櫛田康晴、小迫英尊、佐藤健. オートファジーレセプター ALLO-1 と TBK1 ファミリーキナーゼによる父性オルガネラ選択的分解のメカニズム. 第 14 回オートファジー研究会、レクターレ湯河原・

オンラインハイブリッド開催、10 月 25 日、2021 年.

2) 佐藤美由紀、佐々木妙子、櫛田康晴、小迫英尊、佐藤健. 線虫受精卵における父性オルガネラの選択的分解機構. 第 44 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜・オンラインハイブリッド開催、12 月 1 日、2021 年.

3) 佐々木 妙子、櫛田 康晴、小迫英尊、佐藤健、佐藤 美由紀. 線虫における父性ミトコンドリア選択的分解の分子基盤. 第 20 回日本ミトコンドリア学会年会、学習院大学、12 月 10 日、2021 年.

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後は因子 X のリン酸化部位変異体の表現型を詳しく解析することで、どのステップにリン酸化が関与するのかを明らかにする必要がある。加えて、精製タンパク質を用いて直接のリン酸化であることを証明する必要もあると考えている。

また、本研究で TMT 解析などのプロテオミクスが線虫受精卵に適応可能であることを示すことができたが、今後はさらに近位依存性ピオチン標識法などの新しい技術の導入も検討し、選択的オートファジーを制御する新たな因子の同定を進めていく予定である。