

様式3

平成30年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

2020年1月15日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関：東北大学

部局・職名：大学院生命科学研究科 細胞小器官疾患学教室・教授

氏名：田口 友彦

1. 研究課題 コムギ無細胞タンパク質合成系を利用した自然免疫分子 STING の小胞体-
ゴルジ体間輸送におけるバイオフィグナル解析

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 田口 友彦	東北大学大学院 生命科学研究科 細胞小器官疾患 学教室	教授	細胞レベルでの STING 相互作用分子 群の機能解析
研究分担者 前川 大志	愛媛大学 プロテオサイエンス センター 細胞増殖腫瘍制 御部門	助教	STING と TBK1 の結合検出系の構築

3. 研究成果

別紙のとおり

別紙：研究成果報告

研究課題名:コムギ無細胞タンパク質合成系を利用した自然免疫分子 STING の小胞体-
ゴルジ体間輸送におけるバイオシグナル解析

研究代表者:田口友彦(東北大学大学院生命科学研究科・教授)

研究分担者:前川大志(愛媛大学プロテオサイエンスセンター・助教)

研究目的:

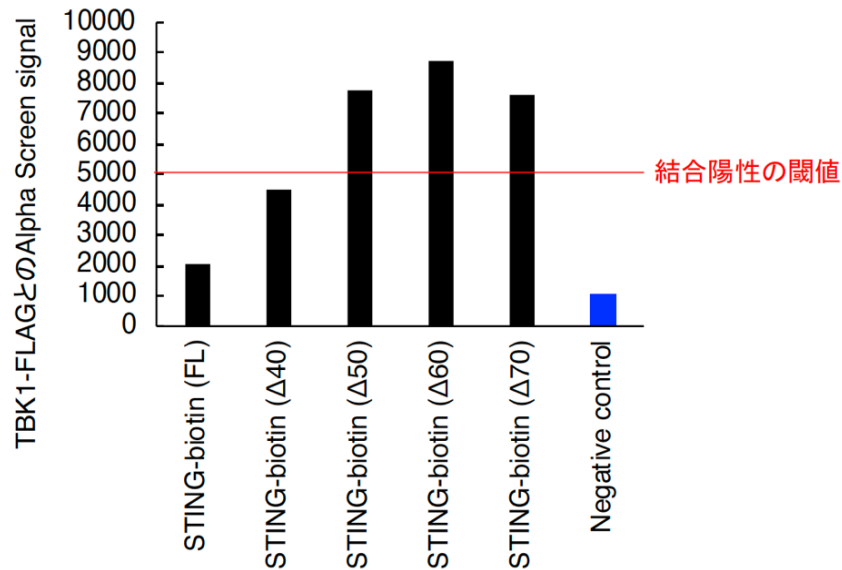
STING はウイルス等に由来する細胞質 DNA を感知し、インターフェロン等の産生を促す自然免疫応答において極めて重要なタンパク質である。また、STING が恒常的に活性化している自己炎症疾患も報告されている。申請者らは STING が細胞質 DNA を感知した後、小胞体からゴルジ体へ輸送されて活性化する事を発見した (Mukai *et al.*, Nat. Commun. 2016)。即ち、小胞体からゴルジ体への輸送が STING の活性化において律速になっているが、その分子機構は解析されていない。本解析の最大の障壁は、小胞体-ゴルジ体間の輸送制御分子群や、当該経路で機能するシグナル伝達分子の分子量が大きいため、リコンビナントタンパク質の精製が困難な点にある。そこで本共同研究は、この課題を解決し、STING/シグナル伝達分子(バイオシグナル)の *in vitro* 再構築を目的とする。

研究内容:

細胞レベルでの解析で、研究代表者が独自に見出したゴルジ体における STING 活性化の分子機構を、*in vitro* で解析するために、コムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーンで再構築を試みた。具体的には、研究分担者(前川大志)が FLAG タグを付加した TBK1 と、ピオチンを付加した STING の細胞質ドメインをコムギ無細胞タンパク質合成系 (WEPRO7240)により合成した。同時に、TBK1 が相互作用する STING 結合ドメインを決定するために、STING 細胞質ドメインの C 末端からアミノ酸を削った一連の変異体群 (40 アミノ酸欠損、50 アミノ酸欠損、60 アミノ酸欠損、70 アミノ酸欠損)の合成も実施した。ウェスタンブロット法で合成を確認後、これらの合成タンパク質を用いてアルファスクリーンを実施し、STING と TBK1 との結合の検出を試みた。

研究成果:

アルファスクリーンを実施した結果、全長の STING 細胞質ドメインと TBK1 との結合は検出できなかったが、C 末端を削っていく事で、STING 細胞質ドメインと TBK1 との結合を検出する事に成功した (次ページの図 1)。この結果は、「STING 細胞質ドメインの C 末端が通常は TBK1 との結合を阻害しているが、何らかの生理的条件下では STING 細胞質ドメインの構造が変化し C 末端による auto-inhibition が解除され、TBK1 との結合が可能となり、下流にシグナルを伝達する」という、新しい STING/TBK1 の結合様式を示唆するものである。



【図1】

STINGの細胞質ドメインは全長ではTBK1との結合活性を持たないが、C末端から50アミノ酸欠損させる事で、TBK1との結合活性を獲得する。
赤線: 結合陽性の閾値

成果発表: 該当無し。

今後の課題:

本研究成果 (STING/TBK1 の新しい結合様式の発見)は、2018 年の段階では、大変新規性が高く、特許申請や論文発表までは公表を見送っていたが、2019 年 5 月に Nature 誌に本研究成果と類似した STING/TBK1 の共結晶解析のデータが先に報告された (Zhang et al., Nature, 2019)。そのため、2020 年 1 月に成果報告をした次第である。今後は、TBK1 以外の STING 制御分子が構成する STING signalosome の再構成をコムギ無細胞タンパク質合成系を利用して実施していく予定である。