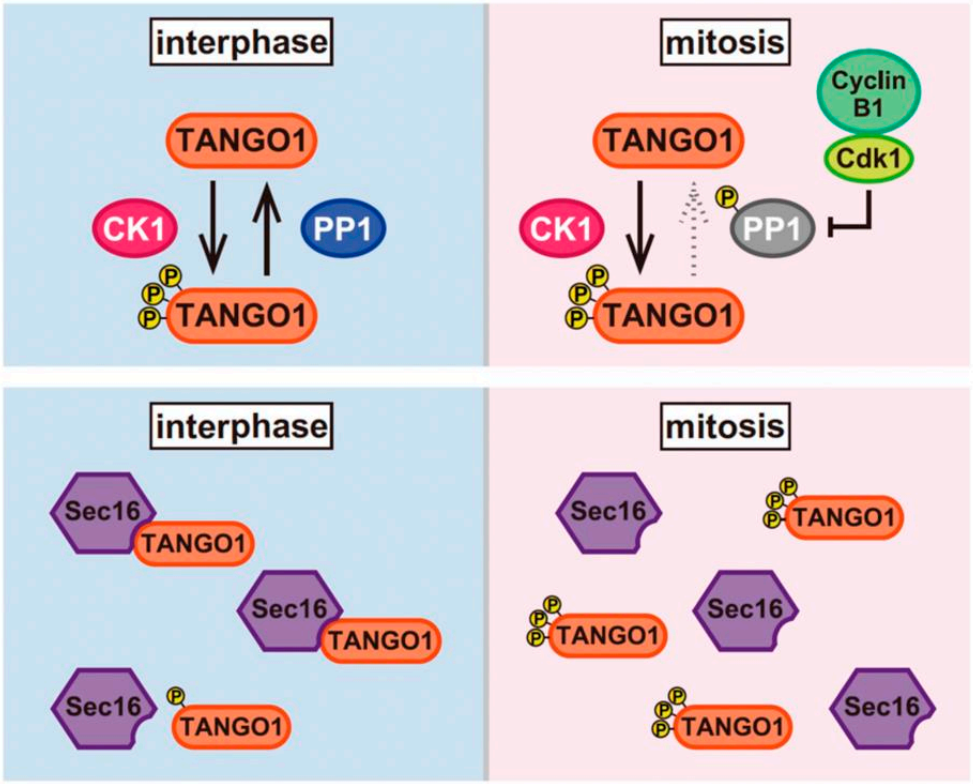
95　小胞体出芽部位の形成と分泌制御メカニズムの解明	齋藤　康太

【目的】小胞体で合成された蛋白質は被覆に包まれた小胞（COPII 小胞）に詰め込まれ、ゴルジ体を経由し細胞内の様々な小器官あるいは細胞外へ輸送される。この小胞輸送の基本原理は、出芽酵母において分泌変異体が網羅的に単離され、その機能が解析されるに伴い飛躍的に明らかになった（Randy Schekman 博士、2013 年ノーベル医学生理学賞）。一方で高等真核生物の分泌機構については、その複雑性を反映し、以下の点が未だ明らかとなっていない。COPII 小胞が出芽する小胞体上のドメインである小胞体出芽部位、すなわち「ER exit site」は、哺乳細胞 1 細胞あたり数百個存在するが、細胞周期や栄養状態などによって、その数や大きさ、局在が変化することが知られている。しかし、ER exit site の局在規定機構およびバイオジェネシスの分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究は、特に細胞分裂期に着目し、ER exit site の崩壊と再形成機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】培養細胞を用いて細胞生物学的手法および生化学的手法によって解析を行った。

【結果】本研究により、TANGO1 は常時 CK1 によってリン酸化されており、リン酸化された TANGO1 は Sec16 との結合活性を低下させることにより、ER exit site の崩壊を促すことが明らかとなった。一方で、脱リン酸化酵素である PP1 は間期に比べて分裂期にその活性が低下することが知られている。間期の細胞においては、CK1 によってリン酸化された TANGO1 は PP1 による脱リン酸化と平衡状態にあり、結果 TANGO1 と Sec16 との結合は安定的に保たれている。一方で、分裂期の細胞においては PP1 の活性が低下することで、相対的に CK1 による TANGO1 のリン酸化が亢進し、その結果 ER exit site の崩壊が促される可能性が明らかになった。本研究によって、細胞分裂期に ER exit site が崩壊するメカニズムが初めて分子レベルで明らかになった。

細胞分裂期における ER exit site の形成と崩壊の分子メカニズム



95. 小胞体出芽部位の形成と分泌制御メカニズムの解明

齋藤　康太

秋田大学 大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学講座

Key words：小胞体出芽部位，分泌，細胞周期，TANGO1

緒　言

小胞体で合成された蛋白質は被覆に包まれた小胞 （COPII 小胞）に詰め込まれ、ゴルジ体を経由し細胞内の様々な小器官あるいは細胞外へ輸送される［1］。この小胞輸送の基本原理は、出芽酵母において分泌変異体が網羅的に単離され、その機能が解析されるに伴い飛躍的に明らかになった（Randy Schekman 博士、2013 年ノーベル医学生理学賞）。一方で高等真核生物の分泌機構については、その複雑性を反映し、以下の点が未だ明らかとなっていない。COPⅡ小胞が出芽する小胞体上のドメインである「ER exit site」は、哺乳細胞 1 細胞あたり数百個存在するが、細胞周期や栄養状態などによって、その数や大きさ、局在が変化することが知られている。しかし、ER exit site の局在規定機構およびバイオジェネシスの分子機構はほとんど明らかになっていない［1］。コラーゲンはヒト生体内全タンパク質の約 3 割を占め、小胞体で合成されたのち COPⅡ被覆因子に依存した経路で細胞外に分泌し機能する。しかしながら、その分泌メカニズムは他の分泌タンパク質に比べてよくわかっていない。これは小胞体内で形成するコラーゲンの複合体が巨大（＞300 nm）であり、通常の分泌小胞（直径 60～90 nm）に入りきらないことが主な原因である。これまでにコラーゲンの分泌機構については、特異的に関与する積荷受容体を同定し、その機能を解析してきた［2～10］。一方で、ER exit site の局在規定機構およびバイオジェネシスの分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究において細胞分裂期における ER exit site の崩壊と再形成の分子機構の一端を明らかにしたので報告する。

方　法

1.　免疫染色

冷メタノール固定した細胞に対して、5%BSA／PBS／0.1% TritonX-100 にてブロッキング後、一次抗体および Alexa Fluor 標識した二次抗体によって染色した。核染色には DAPI を用いた。観察は共焦点顕微鏡 ZEISS LSM700 によって行った。

2.　免疫沈降実験およびウエスタンブロット

293T 細胞へのトランスフェクションは PEI を用いた。20 mM Tris-HCl（pH 7.4）、100 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100 およびプロテアーゼ阻害剤によって破砕した細胞を 15,000 rpm、15 min 遠心した上清を細胞抽出液とし、抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。20 mM Tris-HCl（pH 7.4）、150 mM NaCl、0.1% Triton X-100 で 5 回洗浄後、0.2 mg/ml FLAG ペプチドによって溶出した。サンプルは Laemmli Sample buffer と混合し、5 分間煮沸後、SDS-PAGE し、PVDF 膜に転写後、各抗体によってウエスタンブロットを行った。二次抗体は HRP 標識したものを用い、ルミノール・ペルオキシド基質を用い LAS4000 mini（GE healthcare）によって検出した。

3.　*in vitro* キナーゼアッセイ

GST-TANGO1 PRD リコンビナントタンパク質に CK1d（1～351 aa.）を添加し、20 mM Tris-HCl（pH 7.4）、150 mM NaCl、0.1% Triton X-100、2 mM $MgCl_2$、25 mM [γ-^{32}P] ATP 水溶液中で 30℃、1 時間反応させた。リン酸化反応は Laemmli Sample buffer と混合し加熱することで反応させた。SDS-PAGE 後、オートラジオグラフィーにてリン酸化を検出した。

4.　細胞周期の同調

細胞周期の同調は、ダブルチミジン法あるいはノコダゾール法を用いた。

結果および考察

1. CK1δ/εのキナーゼ活性はER exit siteの形態制御に関与する

HeLa細胞にCK1δを過剰発現すると、ER exit siteに局在化するタンパク質であるSec16とSec31の共局在率が有意に低下した。一方でCK1δのキナーゼ活性を欠失した変異体であるCK1δ K38R、あるいはCK1の異なるアイソフォームであるCK1αにおいてはこの現象は観察されなかった。

次に、HeLa細胞でCK1δおよび、その近縁アイソフォームであるCK1εを両者発現抑制したところ、ER exit siteが肥大化することが観察された。CK1δ/εのキナーゼ阻害剤であるIC261を添加した細胞においても同様の表現型が観察されたことから、CK1δ/εのキナーゼ活性がER exit siteの形態制御に関与することが示唆された。

2. CK1δはTANGO1とSec16の相互作用に影響する

CK1のキナーゼ活性がER exit siteの形態制御に必要であることから、CK1がER exit siteに局在化する因子をリン酸化する可能性を考えた。我々はこれまで、TANGO1とSec16の相互作用によってER exit siteの形成が制御されていることを既に報告している。そこで、TANGO1とSec16の相互作用に対するCK1の添加効果を検証した。293T細胞にTANGO1、Sec16およびCK1δ、CK1δ K38Rを過剰発現し、TANGO1とSec16の相互作用に対する効果を検討した。その結果、CK1δの野生型を発現させた細胞においては、TANGO1とSec16の相互作用が顕著に減弱した（図1）。一方で、CK1δK38Rを発現させた細胞においては、変化が見られなかった。このことは、CK1がTANGO1あるいはSec16をリン酸化することによって、ER exit siteの形態制御に関与する可能性を強く示唆している。

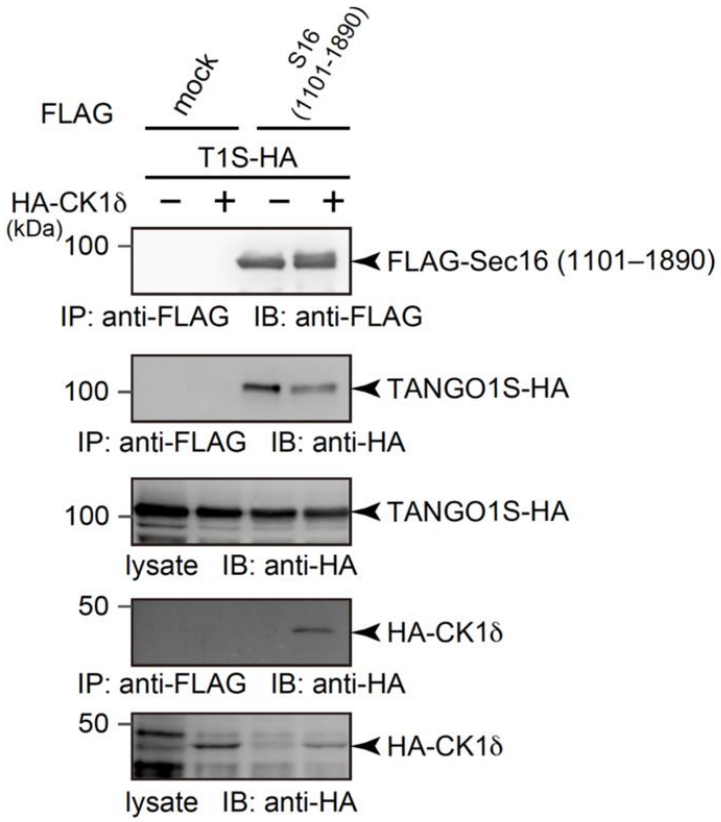


図1. CK1δの発現に伴いTANGO1とSec16の結合量が低下する
HEK293T細胞にFLAGタグを付与したSec16（1101～1890 aa.）およびHAタグを付与したTANGO1S、CK1δを発現させ、抗FLAG抗体による免疫沈降を行った。

3. CK1δはTANGO1 をリン酸化する

CK1 が TANGO1 あるいは Sec16 をリン酸化することで、TANGO1 と Sec16 の相互作用を制御している可能性を検証するため、まずTANGO1、Sec16 上のリン酸化修飾候補配列をデータベースによって検索した。その結果、TANGO1 の Sec16 結合領域の近傍である PRD にリン酸化候補配列が集積する部位を見出し、PPS（Phosphorylation predicted sequence）と命名した。TANGO1 の PPS 領域内のセリン及びスレオニンをアラニンに置換した変異体（TANGO1 SA 変異体）を作製し、TANGO1 が CK1 によってリン酸化される可能性を *in vitro* キナーゼアッセイによって検証した。リコンビナント TANGO1 PRD と、TANGO1 PRD SA 変異体に CK1δを添加し、^{32}P 標識した ATP を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、野生型 TANGO1 PRD は CK1δの添加に伴いリン酸化されたが、SA 変異体は CK1δによってリン酸化されなかった。

4. TANGO1 の CK1 によるリン酸化によって細胞分裂期の ER exit site は崩壊する

ER exit site は細胞分裂期に崩壊し、これが細胞分裂期における小胞体からの分泌停止の主要な要因であることが知られているが、分子メカニズムは不明である。TANGO1 の CK1 によるリン酸化が、細胞分裂期の ER exit site の崩壊に関与している可能性を検討する目的で、野生型 TANGO1 あるいは TANGO1 SA 変異体を安定的に発現させた細胞の分裂期 ER exit site の形態を観察した。結果、野生型 TANGO1 を発現させた細胞においては、細胞分裂期には、通常の細胞と同様に ER exit site は崩壊し、Sec16 と Sec31 の共局在率は顕著に減少した。一方で、TANGO1 SA 変異体を発現させた細胞においては、分裂中期においても Sec16 と Sec31 が共局在する様子が観察された。以上の結果は、TANGO1 の細胞分裂期のリン酸化が、ER exit site の崩壊に重要である可能性を強く示唆している。次に細胞分裂期の ER exit site 崩壊に対する CK1 の役割を検討するため、CK1δ/εを発現抑制した細胞における細胞分裂期の ER exit site を観察した。その結果、CK1δ/εを発現抑制した細胞においては、細胞分裂期においても有意に Sec16 と Sec31 の共局在率が上昇した。以上の結果より、CK1 による TANGO1 のリン酸化が細胞分裂期における ER exit site の崩壊に重要である可能性が強く示唆された。

5. TANGO1 の CK1 によるリン酸化によって細胞分裂期の ER exit site は崩壊する

ER exit site は細胞分裂期に崩壊し、これが細胞分裂期における小胞体からの分泌停止の主要な要因であることが知られているが、分子メカニズムは不明である。TANGO1 の CK1 によるリン酸化が、細胞分裂期の ER exit site の崩壊に関与している可能性を検討する目的で、野生型 TANGO1 あるいは TANGO 1 SA 変異体を安定的に発現させた細胞の分裂期 ER exit site の形態を観察した。結果、野生型 TANGO1 を発現させた細胞においては、細胞分裂期には、通常の細胞と同様に ER exit site は崩壊し、Sec16 と Sec31 の共局在率は顕著に減少した

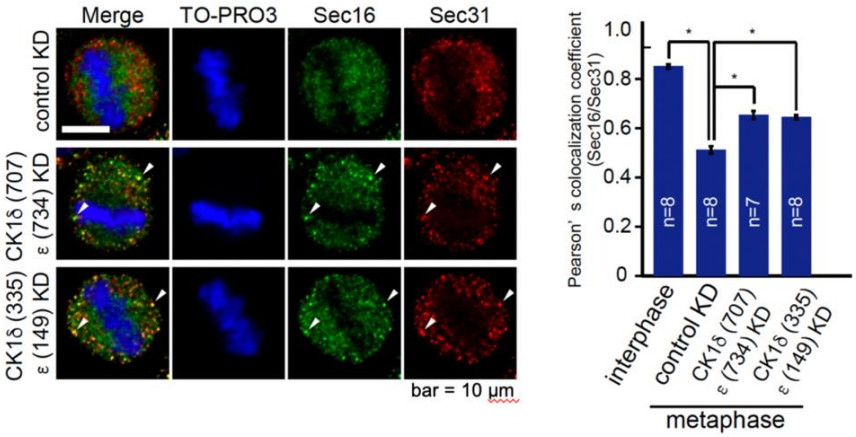


図 2. CK1δ、CK1ε は細胞分裂中期における ER exit site の崩壊に重要である

CK1δおよび CK1ε をノックダウンした細胞をダブルチミジン法により同調させた後、細胞分裂期の細胞を免疫染色した（スケールバー：10μm）。グラフは Sec16/Sec31 の細胞ごとの共局在率を示す。t-test、Error Bar：±SEM、$p < 0.05$。

一方で、TANGO1 SA 変異体を発現させた細胞においては、分裂中期においても Sec16 と Sec31 が共局在する様子が観察された。以上の結果は、TANGO1 の細胞分裂期のリン酸化が、ER exit site の崩壊に重要である可能性を強く示唆している。次に細胞分裂期の ER exit site 崩壊に対する CK1 の役割を検討するため、CK1 δ / ε を発現抑制した細胞における細胞分裂期の ER exit site を観察した。その結果、CK1 δ / ε を発現抑制した細胞においては、細胞分裂期においても有意に Sec16 と Sec31 の共局在率が上昇した（図 2）。以上の結果より、CK1 による TANGO1 のリン酸化が細胞分裂期における ER exit site の崩壊に重要である可能性が強く示唆された。

6. PP1 は TANGO1 の脱リン酸化によって ER exit site の形成に関与する

CK1 による TANGO1 のリン酸化が細胞分裂期における ER exit site の崩壊に重要であることが明らかになったが、CK1 の活性は細胞周期を通じてそれほど変化せず、細胞分裂期の CK1 によるリン酸化亢進のメカニズムは不明であった。そこで、脱リン酸化酵素に注目して解析を行った。代表的な脱リン酸化酵素、PP1 および PP2 の阻害剤を添加した細胞の ER exit site を観察したところ、PP2 阻害剤である endothall は ER exit site の形態に影響を及ぼさなかったが、PP1 および PP2 両者を阻害するオカダ酸を添加した細胞においては、Sec16 と Sec31 の共局在率が低下した。さらに PP1 を siRNA によって発現抑制した細胞においても、同様に Sec16 と Sec31 の共局在率の低下が観察された。次に PP1 による ER exit site 形態の制御が、TANGO1 のリン酸化を介しているか検討する目的で、TANGO1 に対するリン酸化状態がオカダ酸によって変化するか検討した。結果、野生型 TANGO1 はオカダ酸の添加によって有意にリン酸化が亢進したが、TANGO1 SA 変異体のリン酸化状態には影響がなかった。

7. 細胞周期依存的な TANGO1 のリン酸化制御機構

本研究により、TANGO1 は常時 CK1 によってリン酸化されており、リン酸化された TANGO1 は Sec16 との結合活性を低下させることにより、ER exit site の崩壊を促すことが明らかとなった。一方で、脱リン酸化酵素である PP1 は間期に比べて分裂期にその活性が低下することが知られている。間期の細胞においては、CK1 によってリン酸化された TANGO1 は PP1 による脱リン酸化と平衡状態にあり、結果 TANGO1 と Sec16 との結合は安定的に保たれている。一方で、分裂期の細胞においては PP1 の活性が低下することで、相対的に CK1 による TANGO1 のリン酸化が亢進し、その結果 ER exit site の崩壊が促される可能性が明らかになった。本研究によって、細胞分裂期に ER exit site が崩壊するメカニズムが初めて分子レベルで明らかになった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、秋田大学大学院医学系研究科情報制御学・実験治療学講座の前田深春および小松幸恵である。

文　献

1） Saito K, Maeda M. Not just a cargo receptor for large cargoes; an emerging role of TANGO1 as an organizer of ER exit sites. J Biochem. 2019 Aug 1;166(2):115-119. doi: 10.1093/jb/mvz036. Review. PMID:31098622

2） Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, Woodley D, Polischuk R, Schekman R, Malhotra V. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. Cell. 2009 Mar 6;136(5):891-902. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.025. PMID:19269366

3） Saito K, Yamashiro K, Ichikawa Y, Erlmann P, Kontani K, Malhotra V, Katada T. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. Mol Biol Cell. 2011 Jul 1;22(13):2301-8. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0143. Epub 2011 Apr 27. PMID:21525241

4） Saito K, Yamashiro K, Shimazu N, Tanabe T, Kontani K, Katada T. Concentration of Sec12 at ER exit sites via interaction with cTAGE5 is required for collagen export. J Cell Biol. 2014 Sep 15;206(6):751-62. doi: 10.1083/jcb.201312062. Epub 2014 Sep 8. PMID:25202031

5) Tanabe T, Maeda M, Saito K, Katada T.Dual function of cTAGE5 in collagen export from the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell. 2016 Jul 1;27(13):2008-13. doi: 10.1091/mbc.E16-03-0180. Epub 2016 May 11.PMID:27170179

6) Maeda M, Saito K, Katada T. Distinct isoform-specific complexes of TANGO1 cooperatively facilitate collagen secretion from the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell. 2016 Sep 1;27(17):2688-96. doi: 10.1091/mbc.E16-03-0196. Epub 2016 Jul 13. PMID:27413011

7) Maeda M, Katada T, Saito K. TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion. J Cell Biol. 2017 Jun 5;216(6):1731-1743. doi: 10.1083/jcb.201703084. Epub 2017 Apr 25. PMID:28442536

8) Ge L, Zhang M, Kenny SJ, Liu D, Maeda M, Saito K, Mathur A, Xu K, Schekman R. Remodeling of ER-exit sites initiates a membrane supply pathway for autophagosome biogenesis. EMBO Rep. 2017 Sep;18(9):1586-1603. doi: 10.15252/embr.201744559. Epub 2017 Jul 28. PMID:28754694

9) Maeda M, Kurokawa K, Katada T, Nakano A, Saito K. COPII proteins exhibit distinct subdomains within each ER exit site for executing their functions. Sci Rep. 2019 May 14;9(1):7346. doi: 10.1038/s41598-019-43813-3. PMID:31089171

10) Centonze FG, Reiterer V, Nalbach K, Saito K, Pawlowski K, Behrends C, Farhan H. LTK is an ER-resident receptor tyrosine kinase that regulates secretion. J Cell Biol. 2019 Aug 5;218(8):2470-2480. doi: 10.1083/jcb.201903068. Epub 2019 Jun 21. PMID:31227593