

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06214

研究課題名(和文) コラーゲン細胞内輸送機構の解明

研究課題名(英文) Study on the intracellular transport mechanism of collagens

研究代表者

細川 暢子 (Hosokawa, Nobuko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：00263153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の巨大な分子であるコラーゲンが、生合成された後にどのようにして細胞内を輸送されるのかについて研究を行った。コラーゲン分子に蛍光タンパク質GFPを融合させて可視化して実験を行った。解析の結果、GFP-コラーゲン分子は小胞によって小胞体からゴルジ装置へ輸送されることが明らかになった。さらにこのコラーゲン輸送小胞が、一般的な積み荷タンパク質の輸送小胞と同じかどうかについて検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コラーゲンはヒトの身体の中で最も多く存在するタンパク質で、細胞外で線維を形成し、骨や皮膚の主要な構成成分となる。細胞内で生合成されたコラーゲンは棒状の大きな分子を形成し、このような分子がどのようにして細胞内で輸送されるかについてはいくつかの機序が提案されて議論されている。今回私たちはコラーゲン分子を可視化して細胞内での輸送経路について検討し、小胞による輸送機構を提唱する。

研究成果の概要(英文)：Collagen is a large and rigid molecule, and in the present study, we analyzed how such large molecules are transported within the cells. We fused a fluorescent protein with a collagen, and performed live-cell imaging. We found that GFP-collagens are transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus by vesicles. We also analyzed whether these vesicles are different from carriers of conventional cargoes.

研究分野：細胞生物学、分子生物学、生化学

キーワード：コラーゲン 細胞内輸送 小胞体 ゴルジ装置 蛍光タンパク質 小胞輸送 ライブセルイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体で生合成されたコラーゲンは、3本の鎖が集まって棒状の分子を形成した後に細胞外へと分泌される。3本鎖を形成したコラーゲンの長径は約300-400 nmで、小胞体からゴルジ装置への輸送を担うCOPII小胞(約60-80 nm)よりも大きく、どのようにして輸送されているかについては謎であった。近年になって一部のコラーゲンについて新しい輸送機構が報告されつつあるものの、別の輸送経路の存在が示唆されていたり、あるいはコラーゲンのタイプによって経路が異なるのかなど、未解明な点が多い。また、コラーゲン分子を可視化して解析を行った報告はほとんど無い。そこで本研究において、蛍光タンパク質を付加することによってコラーゲン分子を可視化し、コラーゲン細胞内輸送機構の解明を行うことにした。

## 2. 研究の目的

代表的なコラーゲンである線維形成性III型コラーゲン、および基底膜形成性IV型コラーゲンについて、輸送小胞の形態学的特徴を明らかにし、輸送に必要なタンパク質因子の同定を行って新たな輸送経路の解明をめざす。III型およびIV型コラーゲンが、どのようにして小胞体からゴルジ装置に輸送されるのかをGFP-コラーゲンを用いて検討する。VII型コラーゲンやI型コラーゲンで報告されているような巨大小胞(メガ・キャリア)を形成するのか、小胞を形成すること無く連続的にゴルジ装置へと輸送されていくのか、といった輸送経路を明らかにする。IV型コラーゲンに関しては、基底膜形成という重要な機能を持つにもかかわらず細胞内輸送機構の解析はほとんどなされていない。線維形成性コラーゲンの輸送機構と比較することで、コラーゲン細胞内輸送の一般性と特異性を抽出できることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) ライブセル・イメージング法を用いた解析

コラーゲン分子に蛍光タンパク質GFPを融合させて、細胞内でのコラーゲンの動きを捉えることができるGFP-コラーゲンを作製し、細胞にトランスフェクトした。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行い、小胞体からゴルジ装置へのGFP-コラーゲン輸送を解析した。

小胞体、ゴルジ装置、並びに小胞体-ゴルジ装置中間区画(ERGIC)のマーカータンパク質を共発現させることによって、小胞体からゴルジ装置への輸送であることを確認するとともに、GFP-コラーゲン輸送小胞の性状を解析した。

### (2) ノックダウン法を用いた解析

小胞体からゴルジ装置へのコラーゲン輸送に関わる因子を同定するため、shRNAおよびsiRNA、あるいは機能欠失変異体をトランスフェクトして、内在性コラーゲンの分泌が阻害されるかどうかをウェスタンブロット法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) IV型コラーゲンの細胞内輸送機構の解析

#### ① GFP-コラーゲンIVは細胞外に分泌されて沈着する。

まず、作製したGFP-コラーゲンIVが、内在性のIV型コラーゲン分子との間で正しく3量体を形成して細胞外に分泌され、内在性のIV型コラーゲンとともに細胞外に沈着することを確認した。

#### ② GFP-コラーゲンIVは直径約400 nmの小胞によって小胞体からゴルジ装置へと輸送される。

次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いたタイムラプス観察を行い、GFP-コラーゲンIVが小胞体からゴルジ装置へと、小胞によって輸送されることを確認した(図1)。

また、これらの輸送小胞の大きさを測定したと

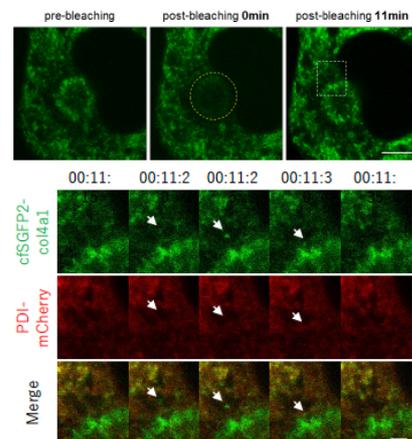


図 1

ころ、直径は約 400 nm であり、通常の積み荷タンパク質を運ぶ輸送小胞の大きさと同じであった (図 2)。

- ③ GFP-コラーゲン IV 輸送小胞は ERGIC 膜を含まない。

ERGIC のマーカータンパク質 ERGIC53 および RAB1 を共発現させて解析した結果、小胞体からゴルジ装置への GFP-コラーゲン IV 輸送小胞は ERGIC 膜を含まないことが明らかになった。

- ④ IV 型コラーゲンの小胞体からゴルジ装置への輸送には、Sar1 および SLY1/SCFD1 が必要である。

shRNA および siRNA をトランスフェクトして、IV 型コラーゲンの小胞体からゴルジ装置への輸送に必要な因子を解析した。その結果、小胞体出口 (ERES) からの輸送に関わる small GTPase、Sar1 および膜融合調節因子である SLY1/SCFD1 が必要であることが分かった。コラーゲン特異的の積み荷受容体である TANGO1 は IV 型コラーゲンの輸送には必要ではなかった。

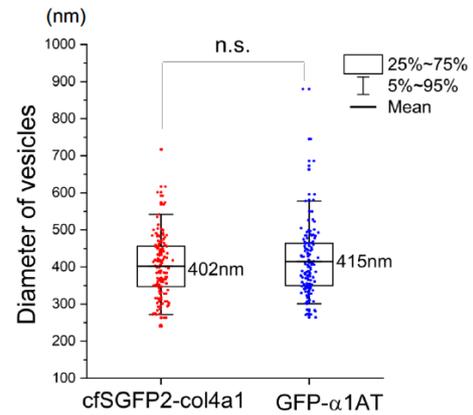


図 2

以上の結果から、IV 型コラーゲンは小胞体からゴルジ装置へと小胞によって輸送されるが、この輸送小胞には ERGIC 膜は含まれておらず、通常の積み荷タンパク質とは異なる輸送経路を使っている可能性が示唆された。

これらの結果について論文にまとめて報告した (Matsui Y, Hirata Y, Wada I, Hosokawa N.: Visualization of procollagen IV reveals ER-to-Golgi transport by ERGIC-independent carriers. *Cell Struct. Funct.*: **45**, 107-119 (2020). doi: 10.1247/csf.20025)。

- (2) III 型コラーゲンの細胞内輸送機構の解析

- ① GFP-コラーゲン III は細胞外に分泌されて沈着する。

次に GFP-コラーゲン III を作製し、このコンストラクトが内在性 III 型コラーゲン分子と 3 量体を形成し、細胞外へと分泌されて沈着することを確認した (図 3)。

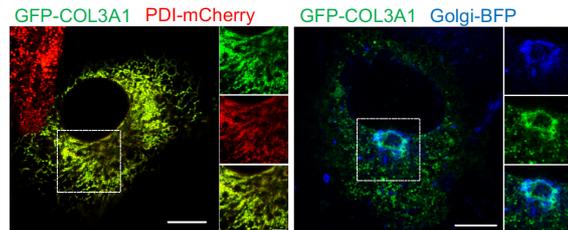


図 3

- ② GFP-コラーゲン III は直径約 350-400 nm の小胞によって小胞体からゴルジ装置へと輸送される。

ライブセル・イメージング法を用いて解析した結果、GFP-コラーゲン III も小胞によって小胞体からゴルジ装置へと輸送されることが明らかになった。この輸送小胞は直径 350-400 nm の大きさを持ち、一般的な積み荷タンパク質の輸送小胞と同じ大きさであった。

- ③ GFP-コラーゲン III 輸送小胞は ERGIC を含む。

GFP-コラーゲン III 輸送小胞が ERGIC 膜を含むかどうかについてライブセル・イメージング法を用いて解析したところ、この輸送小胞は、ERGIC のマーカータンパク質 ERGIC53 および RAB1 と共局在を示した。すなわち GFP-コラーゲン III 輸送小胞は ERGIC 膜を含むことが明らかになった (図 4)。

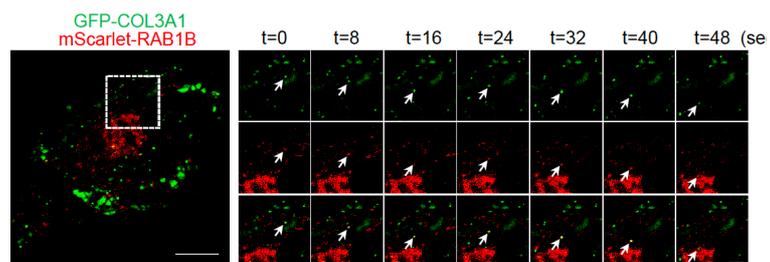


図 4

- ④ GFP-コラーゲン III は一般的な積み荷タンパク質を輸送する小胞と同じ小胞によって輸送される。

GFP-コラーゲン III 輸送小胞は一般的な積み荷タンパク質を輸送する小胞と似た性状を

示すことから、これらのタンパク質が同じ小胞によって輸送されるかどうかについて検討した。その結果、GFP-コラーゲン III は一般的な積み荷タンパク質と同じ小胞に乗って小胞体からゴルジ装置へと輸送されることが示された。

⑤ GFP-コラーゲン III は ERES から輸送される。  
免疫細胞染色法と組み合わせることによって、GFP-コラーゲン III は ERES からゴルジ装置へと輸送されることを示す結果が得られた。

⑥ III 型コラーゲンの小胞体からゴルジ装置への輸送には、Sar1、TANGO1 および CUL3 が必要である。

III 型コラーゲンの小胞体からゴルジ装置への輸送に必要な因子を、siRNA および Sar1 については機能欠失変異体をトランスフェクトすることによって解析した。その結果、III 型コラーゲンの輸送には、Sar1、TANGO1 および CUL3 が必要であることが分かった。CUL3 はコートタンパク質のユビキチン化を介して COPII 小胞の大きさを調節すると考えられている。

以上の結果から、III 型コラーゲンの小胞体からゴルジ装置への輸送は、ERGIC を経由し、一般的な積み荷タンパク質と同じ経路によって輸送されている可能性が示唆された。これらの結果をまとめて現在論文投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hanafusa K, Wada I, Hosokawa N	4. 巻 294
2. 論文標題 SDF2-like protein 1 (SDF2L1) regulates the endoplasmic reticulum localization and chaperone activity of ERdj3 protein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 19335-19348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yu S, Ito S, Wada I, Hosokawa N	4. 巻 293
2. 論文標題 ER-resident protein 46 (ERp46) triggers the mannose-trimming activity of ER degradation-enhancing $\alpha$ -mannosidase-like protein 3 (EDEM3)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10663-10674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.003129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Y, Hirata Y, Wada I, Hosokawa N	4. 巻 45
2. 論文標題 Visualization of procollagen IV reveals ER-to-Golgi transport by ERGIC-independent carriers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 107-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.20025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hattori T, Hanafusa K, Wada I, Hosokawa N	4. 巻 in press
2. 論文標題 SEL1L degradation intermediates stimulate cytosolic aggregation of polyglutamine expanded protein.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田幸大、松井優人、和田郁夫、細川暢子
2. 発表標題 ライブイメージング法を用いたIII型コラーゲン細胞内輸送メカニズムの解析.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会、第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花房賢、細川暢子
2. 発表標題 SDF2L1はERdj3の小胞体局在に必須であり、ERdj3のシャペロン活性を増幅する.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会、第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川暢子、于尚誉、和田郁夫
2. 発表標題 EDEM3による小胞体マンノーストリミング活性はErp46によって制御される.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuiper BP, Hanafusa K, Hosokawa N, Wada I
2. 発表標題 Photon counting multiple histograms (PCMH) analysis of the ERdj3-SDF2L1 complex
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川暢子、和田郁夫
2. 発表標題 小胞体膜タンパク質SEL1L分解産物は細胞質におけるタンパク質凝集体形成に關与する
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ed. J. Hirabayashi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 699
3. 書名 In vitro Mannosidase Assay of EDEMs: ER Degradation-Enhancing alpha-Mannosidase-Like Proteins (N. Hosokawa). In "Lectin Purification and Analysis: Methods and Protocols" (Ed. J. Hirabayashi)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 年報  <a href="https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2020/12/%E5%B9%B4%E5%A0%B12019.pdf">https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2020/12/%E5%B9%B4%E5%A0%B12019.pdf</a>  <a href="https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2019/10/db4028a015db3e794cb8e5fa5aa0afb0.pdf">https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2019/10/db4028a015db3e794cb8e5fa5aa0afb0.pdf</a>  <a href="https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/10/de3d8d76f8175aeefed7eab8def fb749.pdf">https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/10/de3d8d76f8175aeefed7eab8def fb749.pdf</a>            京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 細胞機能調節学分野  <a href="https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/research/lab11/">https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/research/lab11/</a></p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------