

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06063・19K21188

研究課題名（和文）リン酸化修飾によるER exit site形成制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）ER exit site formation is regulated by phosphorylation modification

研究代表者

前田 深春（Maeda, Miharu）

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40823422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、研究代表者はER exit siteの構成を超解像顕微鏡SCLIMを用いて解析し、ER exit site内にそれぞれの構成因子が偏在したドメインが存在することを明らかにした。また、TANGO1がカゼインキナーゼ1（CK1）によって直接リン酸化されること、リン酸化によってTANGO1とSec16の結合親和性が低下し、ER exit siteの構成因子が乖離することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ER exit siteは近年、分泌の調節点として機能することが明らかになりつつある。本研究による成果は、分泌の出発点であるER exit siteについて基礎的な知見をもたらした。また、ER exit siteの構成がTANGO1のリン酸化修飾に関連することを示唆している。これらの結果は、ER exit siteの形成制御がシグナル経路等の下流において制御される可能性を示唆しており、これまで不明だったER exit siteの環境応答メカニズム解明につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used super-resolution confocal live imaging microscopy (SCLIM) to investigate the localization of endogenous proteins, and we identified domains abundant in transmembrane complexes (TANGO1/cTAGE5/Sec12) juxtaposed to Sec16. Interestingly, this domain can be distinguished from the inner and the outer coats of CopII proteins within each mammalian ER exit site.

Moreover, we identified that Casein Kinase 1delta (CK1delta) directly phosphorylates TANGO1 and reduces the interaction between TANGO1 and Sec16 leading to disassembly of ER exit sites.

研究分野：機能生物化学

キーワード：分泌 小胞体 ER exit site TANGO1 Sec16 CK1 リン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質は、小胞体上の特殊なドメインである ER exit site において形成される COPII 小胞によってゴルジ体へ輸送される。ER exit site は COPII 小胞の被覆因子である Sec23/24 複合体、Sec13/31 複合体が集積する場であり、この集積には Sec16 が必要であることが明らかになっている。我々は以前に、TANGO1 が結合を介して Sec16 を小胞体膜にリクルートすることが、ER exit site の形成に必要であることを明らかにした (Maeda et al., 2017)。また、タンパク質修飾データベースより、TANGO1 の一部のアミノ酸配列にはリン酸化の報告が多数存在することを見出していた。しかしながら、TANGO1 のリン酸化修飾が ER exit site の形成にどのような影響を及ぼすかは不明だった。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点である。

- ① 哺乳細胞における ER exit site の基本的な構成を明らかにする。
- ② リン酸化修飾による TANGO1 の機能的変化を明らかにする。
- ③ TANGO1 のリン酸化酵素を同定する。

3. 研究の方法

ER exit site の解析においては、理化学研究所 生細胞超解像イメージング研究チーム (中野明彦先生、黒川量雄先生) の多色・超解像・高速共焦点顕微鏡システム超解像顕微鏡 (Super-resolution confocal live imaging microscopy; SCLIM) を用いて撮影を行った。撮影した画像はソフトウェア Volocity (Perkin Elmer) により解析を行った。

TANGO1 のリン酸化については、細胞生物学的および生化学的手法を中心に用いて解析を行った。

4. 研究成果

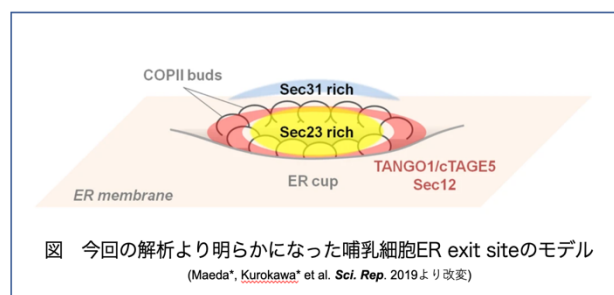
(1) ER exit site 内にはサブドメインが存在する

ER exit site に局在するタンパク質の相互作用特性については、多くの知見が集積している。しかしながら、ER exit site 内におけるこれらの因子の空間的關係性については十分に解明されていなかった。我々はこれまでの解析の中で、COPII 小胞被覆因子 (Sec23, Sec31)、Sec16、および ER exit site の膜タンパク質 (TANGO1, cTAGE5, Sec12) を認識する抗体を作製してきた。そこで、これらの抗体を用いて哺乳細胞の ER exit site 関連因子を染色し、超解像顕微鏡 super-resolution confocal live imaging microscopy (SCLIM) により解析することで、ER exit site 内の内在タンパク質の詳細な位置関係を解析することにした。

まず Sec12 を中心に他の ER exit site 構成因子との位置関係について、合計 5 細胞から、各 8 箇所 (合計 40 箇所) を限定し、この領域内における共局在率を指標として解析を行った。その結果、Sec12 と cTAGE5、Sec12 と TANGO1、そして Sec12 と Sec16 の共局在率はほぼ同程度であるのに対し、Sec31 と Sec12 の共局在率は有意に低く、分散も大きい結果になった。

次に Sec31 を中心に解析を行ったところ、Sec31 と cTAGE5、Sec31 と TANGO1、Sec31 と Sec16 はいずれも共局在率のばらつきが大きい一方で、COPII 小胞の内側被覆因子である Sec23 と Sec31 との共局在率は、比較的安定した値を示していた。さらに Sec23 との位置関係を解析した結果、cTAGE5、TANGO1、Sec16 のいずれも Sec23 とある程度近接して存在していることが明らかになった。

以上の結果は、ER exit site 内が均一ではなく、各構成因子が偏在したサブドメインを形成していることを示唆している (図)。また、これまでの解析から TANGO1, cTAGE5, Sec12 は安定なヘテロ複合体を形成すること、同時に TANGO1, cTAGE5 は Sec23 と一過性に相互作用すること、さらに Sec23 は Sec16 や Sec31 と結合することが明らかになっている (Espenshade et al., 1995; Stagg et al., 2006)。これらの知見も考慮すれば、ER exit site 構成因子の偏在は、各タンパク質間相互作用の特性を反映していると考えられる。



(2) ER exit site においても COPII 小胞被覆因子は脂質膜に対して層状に偏在する

次に ER exit site における分泌タンパク質の輸送過程を観察する目的で、GFP タグを付与した VSVG-ts045 をモデルとして解析を行った。VSVG-ts045 は、39.5°C で細胞を培養することにより小胞体内にとどまり、細胞を 37°C に移すことで分泌が開始される (Presley et al. 1997)。39.5°C 環境下における VSVG のシグナルは小胞体内腔領域を示しており、実際に Sec23 と Sec31 の周囲を取り囲むように存在している様子が観察された。この結果は、先の電子顕微鏡による解析の知見と合致する (Bannykh et al. 1996)。さらに、細胞を 37°C に移して 8 分間培養し、VSVG-ts045 が ER exit site に集積される時点での観察を行った結果、一部の VSVG は依然として小胞体の網状構造をしていたが、ほとんどのシグナルは Sec23 と Sec31 の近傍に点状の構造体として観察された。そして興味深いことに、多くの点において Sec23 は Sec31 と VSVGts045 の間に位置していた。この結果は、ER exit site においても COPII 小胞と同様に Sec23 が小胞体膜を覆い、さらにその外側を Sec31 が覆っていることを示している。

(3) TANGO1 のリン酸化修飾は TANGO1 と Sec16 の結合親和性を減弱させ、ER exit site を崩壊させる

我々は以前に、翻訳後修飾データベースである Phosphosite Plus を用いて、TANGO1 の細胞質側領域の一部にリン酸化報告が多数存在する残基を見出した。この領域は TANGO1L においては 1651-1750 アミノ酸領域、TANGO1S においては 529-628 アミノ酸領域に該当する。この領域を phosphorylation predicted sequences (PPS) として、TANGO1S の PPS 内におけるリン酸化候補残基にアラニンを置換した非リン酸化変異体 (SA 変異体) および、グルタミン酸に置換したリン酸化模倣変異体 (SE 変異体) を作出し、Sec16 との結合親和性を検討した。その結果、SE 変異体の結合親和性は野生型 TANGO1S に比べて大幅に減弱していた一方で、SA 変異体は野生型よりも Sec16 との結合量が増加していた。したがって TANGO1 の PPS 領域がリン酸化されることで Sec16 と TANGO1 の結合親和性が減弱することが明らかになった。

我々は以前の解析から、TANGO1 と Sec16 の結合は ER exit site を形成するのに必要であることを明らかにしている。そこで次に、TANGO1S 各変異体、あるいは野生型 TANGO1S を、内在の TANGO1L および TANGO1S を発現抑制した細胞にそれぞれ発現させ、ER exit site の形成能を評価した。その結果、野生型 TANGO1S や SA 変異体は Sec16、Sec31 と同じ場所に局在し、通常と同様の ER exit site が観察されるのに比べて、SE 変異体は小胞体膜上に拡散し、ER exit site 構成因子も解離していた。また、SE 変異体を発現する細胞では小胞体からの VSVG の輸送が遅延していた。以上の結果は、TANGO1 の PPS 領域がリン酸化されることで、Sec16 との結合親和性が減弱し、ER exit site の崩壊と分泌の阻害が生じることを示唆している。

(4) CK1 δ は TANGO1 を直接リン酸化し、ER exit site を崩壊させる

次に、TANGO1 の PPS 領域をリン酸化するキナーゼを探索した。先行知見として CK1 δ が小胞体-ゴルジ体間のタンパク質輸送に関与することが明らかになっていた (Lord et al., 2011) ため、CK1 δ が TANGO1 を直接リン酸化するかを γ -32P-ATP を用いた in vitro の評価系で検証した。結果として、TANGO1 は CK1 δ 存在下でリン酸化されたが、TANGO1 の SA 変異を含むリコンビナントにおいて 32P はほとんど検出されなかった。以上の結果より、CK1 δ によって TANGO1 の PPS 領域が直接リン酸化されることが明らかになった。

さらに、CK1 δ が ER exit site の構成や形態に与える影響を評価した。CK1 δ を過剰発現させた細胞では Sec16 と Sec31 は解離し、TANGO1S の SE 変異体を発現させた際と同様の表現型が観察された。一方、キナーゼ活性を有さない CK1 δ K38R 変異体を発現させた細胞では、ER exit site の乖離は認められなかった。また、CK1 δ の阻害剤である IC261 を添加した細胞において、ER exit site は肥大化していた。以上の結果より、CK1 δ がそのキナーゼ活性により ER exit site の形態に影響を与え得ることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Kota, Maeda Miharuru	4. 巻 166
2. 論文標題 Not just a cargo receptor for large cargoes; an emerging role of TANGO1 as an organizer of ER exit sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz036	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 Maeda Miharuru, Kurokawa Kazuo, Katada Toshiaki, Nakano Akihiko, Saito Kota	4. 巻 9
2. 論文標題 COPII proteins exhibit distinct subdomains within each ER exit site for executing their functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43813-3	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Maeda, M., Komatsu, Y., Saito, K.
2. 発表標題 Mitotic ER exit site dissociation and reassembly are regulated by phosphorylation status of TANGO1
3. 学会等名 Gordon Research Conferences, Molecular Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maeda, M., Sasaki, N., Shiraiwa, M., Yorimitsu, T., Sato, K., Katada, T., Saito, K.
2. 発表標題 cTAGE5 acts as a Sar1 GTPase regulator for collagen export
3. 学会等名 Gordon Research Conferences, Molecular Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 細胞周期に応じたリン酸化による分泌調節機構
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miharu Maeda, Kota Saito
2. 発表標題 Regulation of the Sar1 GTPase cycle is necessary for collagen secretion from the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 American Society for Matrix Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田 深春、堅田 利明、齋藤 康太
2. 発表標題 Phosphorylation of TANGO1 regulates localization and function of ER exit sites
3. 学会等名 第70回 日本細胞生物学会 第51回 日本発生生物学会 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 康太、前田 深春、小松 幸恵
2. 発表標題 小胞体出芽ドメイン形成の種間保存性と相違性について
3. 学会等名 第69回 薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田 深春、齋藤 康太
2. 発表標題 TANGO1はSec16と協調的にER exit siteの形成制御機構に関与する
3. 学会等名 第17回 生命科学研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
<https://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=yakuri>

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