

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03203

研究課題名(和文)小胞体からの巨大分子分泌と外界シグナルによる分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of large cargo secretion and regulated secretion from external stimuli

研究代表者

齋藤 康太 (Saito, Kota)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60549632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体で合成された分泌タンパク質は、小胞体上のERESより出芽しゴルジ体を経て、細胞外へ分泌される。ERESは分泌の出発点であるが、その構成と制御メカニズムはよくわかっていない。我々は、コラーゲンの積み荷受容体として単離されたTANGO1がSec16と協調してERESの形成に関与することを見出した。さらに、TANGO1が細胞分裂期にCK1によってリン酸化されることで、細胞分裂期のERESの崩壊が担われることを明らかにした。さらに、Sec16もCK1によるリン酸化制御を受けることによって、液-液相分離によってERESへの結合活性を調節していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞からの分泌機構が明らかになれば、分泌が異常になったことによる疾患に対する治療法の開発等に貢献することができる。特に、TANGO1やSec16は分泌の出発点を制御する因子であり、その機能が明らかになれば、広範な分泌現象に対する制御方法の開発にもつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Secretory proteins synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) bud off from the ER exit sites (ERES) and are transported to the Golgi apparatus before being secreted outside the cells. ERES is the starting point of secretion, but its composition and regulatory mechanisms are not well understood. We discovered that TANGO1, isolated as a cargo receptor for collagen, cooperates with Sec16 to facilitate the formation of ERES. Additionally, we found that phosphorylation of TANGO1 by CK1 during mitosis leads to the disassembly of ERES during cell division. Furthermore, we revealed that Sec16 also undergoes CK1-mediated phosphorylation, which regulates its binding activity to ERES through liquid-liquid phase separation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分泌 小胞体 ER exit site TANGO1 Sec16

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体において合成された分泌タンパク質は、小胞体上の特殊なドメインである ER exit site より出芽し、ゴルジ体を経由して、細胞外へと輸送される。ER exit site は分泌の出発点であるが、その形成メカニズムや制御機構には不明な点が多い。代表者は、巨大分子コラーゲンの小胞体からの分泌を制御する因子として TANGO1 を見出し、その機能解析を行ってきた。さらに TANGO1 にはコラーゲン認識部位をもたない TANGO1S が存在することを明らかにし、TANGO1、TANGO1S が Sec16 と協調することにより ER exit site の局在規定因子として機能することを見出した。さらに細胞分裂期における CK1 による TANGO1 のリン酸化によって ER exit site の崩壊がおこること、またその後、PP1 によって TANGO1 が脱リン酸化されることで ER exit site の再形成が担われることを見出していた。一方で、Sec16 もリン酸化によって制御される可能性が考えられたが、その詳細は不明であった。

### 2. 研究の目的

TANGO1 と Sec16 によって形成される ER exit site は、外界からのさまざまな刺激に応答して、その数や局在、大きさ等を変化させ、分泌機能を調節していると考えられるが、その詳細な分子機構は不明である。本研究では特に Sec16 側の制御機構に着目して ER exit site が外界シグナルによってどのように分泌機構を制御しているのかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、主に細胞生物学的手法および生化学的手法を用いて解析を行った。

#### 1) Sec16 結合因子、特にリン酸化制御因子の探索

Sec16 の結合因子を探索するため、FLAG タグを付与した Sec16 全長を安定的に発現する細胞株を HeLa 細胞で樹立した。さらに FLAG タグを付与した Sec16 の欠失変異体、FLAG-Sec16(1101-1820aa)および FLAG-Sec16(1101-1890aa)を安定的に発現する細胞株を HeLa 細胞で樹立した。さらに Sec16 に対するモノクローナル抗体を作成した。

#### 2) Sec16 のチロシン脱リン酸化酵素との結合

293T 細胞に Sec16 およびチロシン脱リン酸化酵素の基質と強固に結合する変異体を過剰発現し、それぞれの結合を検証した。

#### 3) Sec16 のチロシンリン酸化酵素の同定

HA タグを付与したチロシンキナーゼライブラリーを Sec16 とともに 293T 細胞に過剰発現し、Sec16 のリン酸化を亢進するチロシンキナーゼの同定を試みた。

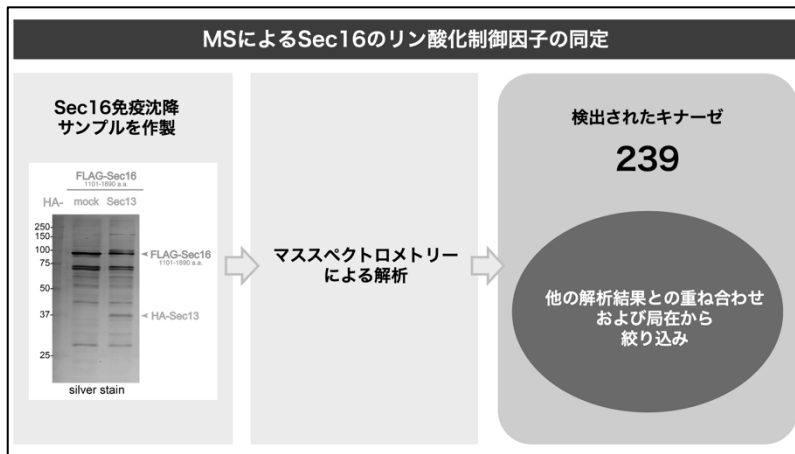
#### 4) Sec16 をセリン/スレオニンリン酸化するキナーゼの同定

マスマスペクトロメトリーで検出されたセリン・スレオニンキナーゼ候補を Sec16 と共に 293T 細胞に過剰発現させ、Sec16 をリン酸化するキナーゼ候補の同定を試みた。

### 4. 研究成果

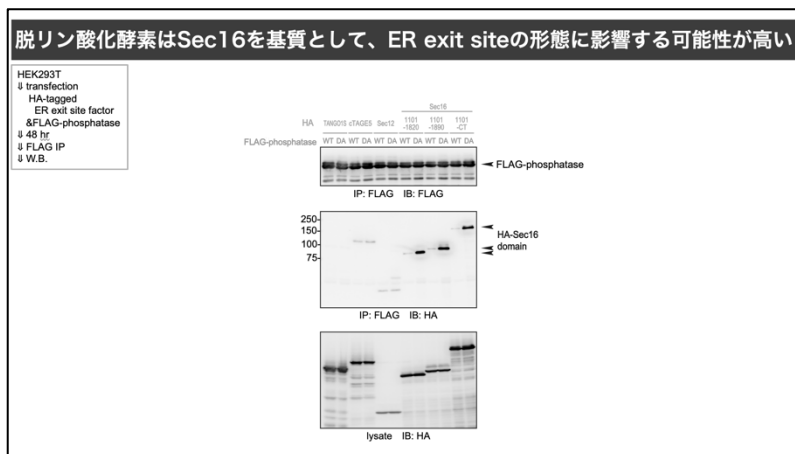
#### 1) Sec16 結合因子、特にリン酸化制御因子の探索

各種 Sec16 の安定発現株より Sec16 を免疫沈降し、免疫沈降画分に存在するタンパク質の同定を共同研究によって、マスマスペクトロメトリーで解析した。Sec16 全長および欠失変異体を用いた免疫沈降のいずれにおいても、結合が確認できている因子を結合因子の候補とした。さらに、既存のデータベース上でも結合が報告されているものから、優先順位をつけて解析を行っていくことにした。



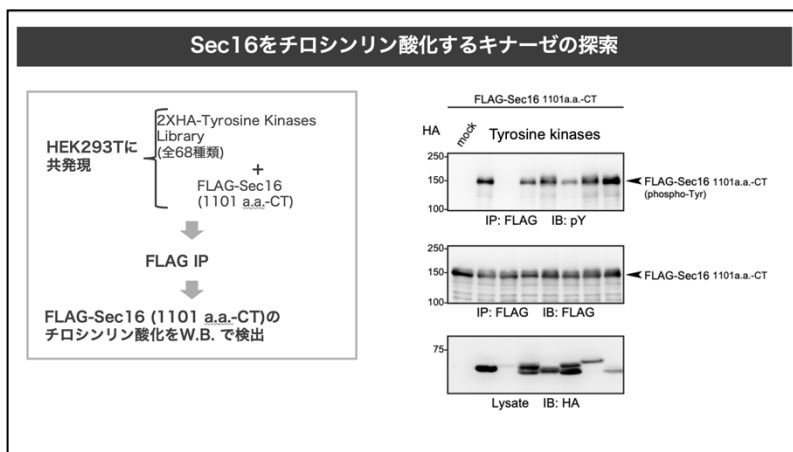
2) Sec16 のチロシン脱リン酸化酵素との結合

Sec16 に結合した因子のなかからチロシン脱リン酸化酵素に着目した。本酵素の基質と強固に結合する変異体と種々の COPII 因子との結合を検討したところ、Sec16 が有意にチロシン脱リン酸化酵素と結合することが明らかになった。



3) Sec16 のチロシンリン酸化酵素の同定

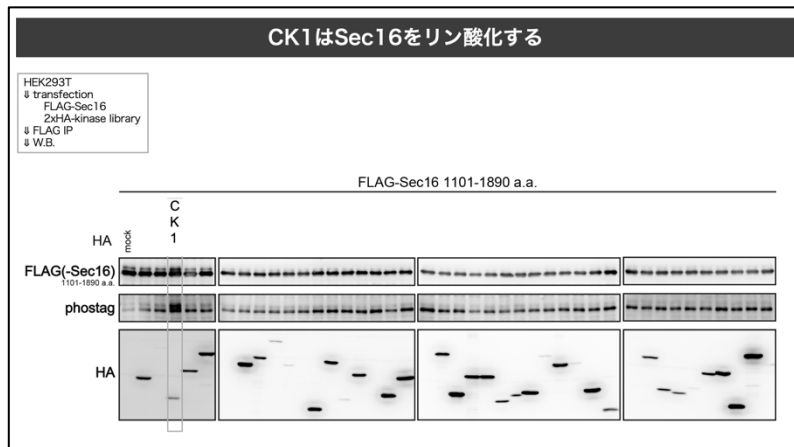
Sec16 のチロシンリン酸化を担うチロシンキナーゼを同定するため、Sec16 とキナーゼを 293T 細胞に共発現させ、Sec16 をチロシンリン酸化する候補キナーゼを複数同定することに成功した。



4) Sec16 をセリン/スレオニンリン酸化するキナーゼの同定

マスマスペクトロメトリーで検出されたセリン・スレオニンキナーゼ候補を Sec16 と共に 293T 細胞に過剰発現させ、Sec16 をリン酸化するキナーゼ候補の同定を試みた。その結果、

CK1 が Sec16 をリン酸化することを新たに見出した。また、Sec16 のリン酸化は TANG01 との結合に対しては影響を与えないが、Sec16 どちらの相互作用を担う液-液相分離による Sec16 の凝集化に関与していることを見出した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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<br>Saegusa Keiko, Matsunaga Kohichi, Maeda Miharuru, Saito Kota, Izumi Tetsuro, Sato Ken                  | 4. 巻<br>5                       |
| 2. 論文標題<br>Cargo receptor Surf4 regulates endoplasmic reticulum export of proinsulin in pancreatic cells         | 5. 発行年<br>2022年                 |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>458               |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s42003-022-03417-6   | 査読の有無<br>有                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |
| 1. 著者名<br>Maeda Miharuru, Komatsu Yukie, Saito Kota  | 4. 巻<br>55                      |
| 2. 論文標題<br>Mitotic ER Exit Site Disassembly and Reassembly Are Regulated by the Phosphorylation Status of TANGO1 | 5. 発行年<br>2020年                 |
| 3. 雑誌名<br>Developmental Cell   | 6. 最初と最後の頁<br>237 ~ 250.e5      |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.devcel.2020.07.017   | 査読の有無<br>有                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |
| 1. 著者名<br>Maeda Miharuru, Komatsu Yukie, Saito Kota  | 4. 巻<br>7                       |
| 2. 論文標題<br>Mitotic ER exit site dynamics: insights into blockade of secretion from the ER during mitosis         | 5. 発行年<br>2020年                 |
| 3. 雑誌名<br>Molecular and Cellular Oncology  | 6. 最初と最後の頁<br>1832420 ~ 1832420 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/23723556.2020.1832420  | 査読の有無<br>無                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |
| 1. 著者名<br>Saito Kota, Maeda Miharuru   | 4. 巻<br>223                     |
| 2. 論文標題<br>p24 family Tango(1) at the endoplasmic reticulum exit site to organize cargo exit                     | 5. 発行年<br>2024年                 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>e202403016        |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1083/jcb.202403016  | 査読の有無<br>無                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太             |
| 2. 発表標題<br>Sec16のリン酸化による小胞体出芽部位ERESの制御機構 |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会東北支部 第88回例会・シンポジウム      |
| 4. 発表年<br>2022年                          |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太        |
| 2. 発表標題<br>小胞体出芽部位ERESの形成制御メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名<br>第19回 生命科学研究会             |
| 4. 発表年<br>2022年                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太               |
| 2. 発表標題<br>Sec16のリン酸化による小胞体出芽部位ERESの形成制御機構 |
| 3. 学会等名<br>第73回 薬理学会北部会                    |
| 4. 発表年<br>2022年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>齋藤 康太   |
| 2. 発表標題<br>細胞分裂期のER exit siteの崩壊と再形成はTANGO1のリン酸化状態により制御される |
| 3. 学会等名<br>新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」online班会議（オンライン）              |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>齋藤 康太                        |
| 2. 発表標題<br>小胞体上の分泌ゾーンERESの局在決定機構        |
| 3. 学会等名<br>新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」班会議（オンライン） |
| 4. 発表年<br>2020年                         |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太     |
| 2. 発表標題<br>細胞分裂期における分泌停止メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名<br>第94回日本薬理学会年会          |
| 4. 発表年<br>2021年                  |

〔図書〕 計2件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>G. M. Cooper、須藤 和夫、堅田 利明、榎森 康文、足立 博之、富重 道雄、齋藤 康太 | 4. 発行年<br>2022年 |
| 2. 出版社<br>東京化学同人   | 5. 総ページ数<br>568 |
| 3. 書名<br>クーパー分子細胞生物学 第8版                                   |                 |

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 著者名<br>LODISH BERK KAISER BRETSCHER PLOEGH MARTIN YAFFE AMON 訳 堅田利明 須藤和夫 山本圭壱 岩井佳子<br>上村慎治 北川大樹 齋藤康太 坪井貴司 富田泰輔 名黒功 仁科博史 宮澤恵二 若林憲一 | 4. 発行年<br>2023年  |
| 2. 出版社<br>東京化学同人   | 5. 総ページ数<br>1074 |
| 3. 書名<br>分子生物学 第9版   |                  |

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza/yakuri.html>

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|