

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15740

研究課題名（和文）細胞分裂期に小胞体からの分泌が停止するメカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of secretion arrest from the Endoplasmic Reticulum during mitosis.

研究代表者

前田 深春（Maeda, Miharuru）

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、研究代表者はTANGO1のリン酸化がカゼインキナーゼ1（CK1）およびプロテインホスファターゼ1（PP1）によって細胞周期依存的に制御されていることを明らかにした。また、細胞分裂期におけるER exit site（ERES）の崩壊がTANGO1のリン酸化によって生じ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

細胞分裂期には、小胞体やゴルジ体などの細胞内オルガネラの形態変化に伴って分泌も停止することが知られていたが、そのメカニズムには不明な点が多く残っていた。本研究において研究代表者は、細胞周期依存的なTANGO1のリン酸化制御がER exit site（ERES）の形成と崩壊を介して分泌を制御することを明らかにした。この結果は、細胞周期と分泌との関係性において、その分子機構の一端を担うものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed that TANGO1 phosphorylation is regulated by casein kinase 1 and protein phosphatase 1 in a cell cycle-dependent manner. We also showed that ER exit site（ERES）disassembly during mitosis is caused by the phosphorylation of TANGO1.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ER exit site（ERES） TANGO1 Sec16 分泌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

「分泌」は小胞体で合成されたタンパク質がゴルジ体を経由し、細胞外へ輸送される一連の過程である。小胞体で合成されたタンパク質は、小胞体上の特殊ドメインである「小胞体出芽部位 (ER exit site: ERES)」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。通常1細胞あたり数百個存在するERESは、細胞外環境に応じてその数や形態を変化させ、分泌を調節する機能を有することが明らかになりつつある。特に、細胞分裂期には小胞体からの分泌は停止し、同時にERESの構成因子も一時的に解離することが知られている(Farmaki et al., *JCS*, 1999)。しかし「細胞分裂期にERESがどのようなメカニズムで崩壊し分泌停止に至るのか」「なぜ分泌が停止する必要があるのか」については全くわかっていなかった。

研究代表者はこれまで、ERESに局在する膜タンパク質「TANGO1」の機能解析を行ってきた。TANGO1は当初、コラーゲンの小胞体からの輸送を補助する積み荷受容体として同定された因子であるが (Saito et al., *Cell*, 2009)、研究代表者は小胞体内腔側ドメインを持たない短鎖アイソフォームTANGO1Sが存在することを見出し (Maeda et al., *MBC*, 2016)、TANGO1の2つのアイソフォームがコラーゲンの分泌のみならず、小胞体からの分泌全般に関与することを明らかにした (Maeda et al., *JCB*, 2017)。さらなる機能解析の結果、TANGO1がSec16と結合することを新たに見出し、2者の結合がERESの形成に必要なことを見出した (Maeda et al., *JCB*, 2017)。

また研究代表者は、TANGO1のSec16結合ドメインの近傍にリン酸化の報告が多数存在する残基を複数見出し、これらの残基を含む領域を”PPS (Predicted Phosphorylation Sequence)”とした。PPS領域内のセリンにグルタミン酸を置換したリン酸化模倣型TANGO1変異体はSec16との結合親和性が低下し、ERESの崩壊を生じさせた。さらに、研究代表者はPPS領域のリン酸化修飾に関連する酵素として、カゼインキナーゼ16 (CK16) およびプロテインホスファターゼ1 (PP1)を同定した。しかし、TANGO1のPPS領域におけるリン酸化の意義は不明だった。

## 2. 研究の目的

本研究は、TANGO1のリン酸化と細胞分裂との関連性を明らかにすることで、細胞周期依存的なERESの崩壊・形成の制御メカニズムを解明することを目的として解析を行った。

## 3. 研究の方法

培養細胞の細胞周期同調に際してはダブルチミジンブロック法あるいはノコダゾールブロック法を用いた (Maeda et al., *Dev. Cell*, 2020)。TANGO1のリン酸化定量は、FLAGタグを付与したTANGO1SのHeLa安定発現株より、TANGO1Sを免疫沈降した後、ウェスタンブロットを行うとともにPhos-tag Biotinを用いてリン酸化TANGO1Sを検出することにより行った (Kinoshita et al., *Mol. Cell. Proteomics*, 2006)。各タンパク質の細胞内局在は、免疫染色後、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞分裂期においてTANGO1のPPS領域におけるリン酸化が亢進する

間期と分裂期におけるTANGO1のリン酸化量を比較するため、ノコダゾールブロック法により細胞分裂期に同調させたHeLa細胞株におけるTANGO1Sのリン酸化定量を行った。その結果、間期と分裂期でTANGO1Sの発現量にほとんど差が認められなかった一方、Phos-tagで検出されるリン酸化TANGO1Sは細胞分裂期において増加していた(図1)。また、PPS領域内のセリンにアラニンを置換した非リン酸化型TANGO1S変異体を用いた際には、間期・分裂期ともにリン酸化はほぼ検出されなかった(図1)。以上の結果は、TANGO1のPPS領域におけるリン酸化が細胞分裂期に亢進することを強く示唆している。

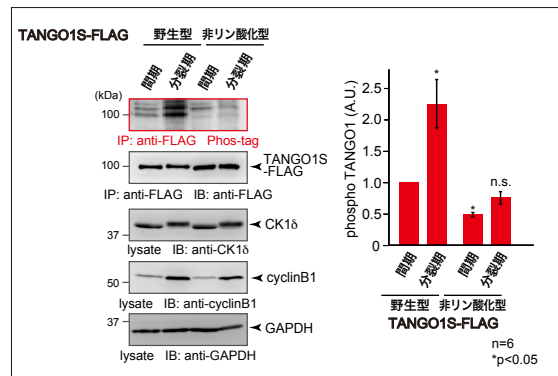


図1. 細胞分裂期においてTANGO1のリン酸化は亢進する

##### (2) 細胞分裂期におけるERESの崩壊にはTANGO1のPPS領域におけるリン酸化が必要である

次に、野生型TANGO1あるいは非リン酸化型TANGO1S変異体を発現するHeLa細胞株に対して、ダブルチミジン法によりそれぞれ細胞周期を同調させ、分裂中期におけるERESを観察した。野生型TANGO1を発現する細胞では、先行知見と同様にSec16とSec31の乖離が認められたが、非リン酸化型TANGO1S変異体を発現する

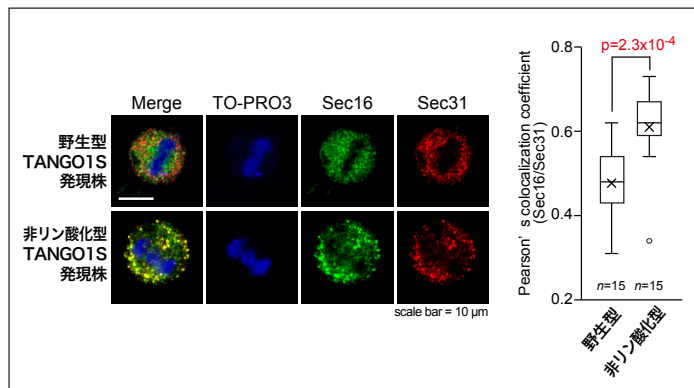


図2. 非リン酸化型TANGO1発現によりERESの崩壊が抑制される

細胞では、分裂期においてもSec16とSec31が共局在する点が多数存在し、細胞全体での共局在率も野生型と比較して増加していた(図2)。この結果から、細胞分裂期におけるERESの崩壊にはTANGO1のPPS領域のリン酸化が必要であることが明らかになった。

##### (3) 細胞分裂期におけるTANGO1のリン酸化とER exit siteの崩壊にはCK1δ/εが関与する

さらに細胞分裂期におけるTANGO1のリン酸化とERESの崩壊にCK1δが関与するかを調べる目的で、CK1δとその類似ファミリーメンバーであるCK1εを発現抑制したHeLa細胞におけるTANGO1のリン酸化定量とERESの観察を行った。その結果、CK1δ/εを発現抑制した細胞では、Phos-tagで検出されるリン酸化TANGO1Sのシグナルが減弱しており、細胞分裂期のERES崩壊も一部阻害されていた。

CK1δ/εは細胞周期に依らず機能するが、以前に研究代表者らが見出したTANGO1の脱リン酸化酵素であるPP1は、細胞分裂期にCyclinB1/Cdk1によってリン酸化されることで一時的に酵素活性が低下することが知られている(Dohadwala et al., *PNAS*, 1994; Kwon et al., *PNAS*, 1997)。したがって、細胞周期依存的なTANGO1のリン酸化制御は、分裂期におけるPP1の機能低下によるTANGO1の脱リン酸化抑制によって説明できると考えられる。

以上の結果から、TANGO1は細胞分裂期においてPPS領域のリン酸化が亢進することで、Sec16との結合が乖離し、その結果ERESの崩壊を生じさせることが明らかになった。また細胞周期依存的なTANGO1のリン酸化にはCK1δ/εおよびPP1が関与することが明らかになった。TANGO1のリン酸化模倣変異体発現時にはERESの崩壊とともに、VSVGの小胞体からの分泌遅延が認められていたことから、分裂期におけるTANGO1のリン酸化とERES崩壊によって、一時的な小胞体からの分泌停止が生じていると考えられる。このことは、長らく不明だった細胞周期と分泌との関係性において、その分子メカニズムの一端を担うものであると考えられる。今後は細胞分裂期に分泌が停止することの生物学的意義についても解析を進めたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Miharu Maeda, Kota Saito	4. 巻 48
2. 論文標題 Secretion from the endoplasmic reticulum is regulated in a cell cycle-dependent manner.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 秋田医学 (Akita Journal of Medicine.)	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20569/00005734	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Maeda Miharu, Komatsu Yukie, Saito Kota	4. 巻 55
2. 論文標題 Mitotic ER Exit Site Disassembly and Reassembly Are Regulated by the Phosphorylation Status of TANGO1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 237 ~ 250.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.07.017	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 -

1. 著者名 Maeda Miharu, Komatsu Yukie, Saito Kota	4. 巻 7
2. 論文標題 Mitotic ER exit site dynamics: insights into blockade of secretion from the ER during mitosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 1832420 ~ 1832420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23723556.2020.1832420	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 細胞周期依存的なTANGO1のリン酸化による分泌制御機構
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第87回 例会・シンポジウム
4. 発表年 2021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 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.med.akiita-u.ac.jp/departement/gs/kenkyu-org/kouza/yakuri.html">http://www.med.akiita-u.ac.jp/departement/gs/kenkyu-org/kouza/yakuri.html</a>
---

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
---------	---------