

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07340

研究課題名（和文）遺伝学とプロテオミクスを組み合わせた炎症を制御する選別輸送機構の解明

研究課題名（英文）Combining genetics and proteomics to elucidate selective transport systems that regulate inflammation.

研究代表者

茂谷 康（MOTANI, Kou）

徳島大学・先端酵素学研究所・准教授

研究者番号：70609049

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞質DNAを異物として認識した細胞は、小胞体膜タンパク質STINGを活性化し、ゴルジ体へ運ぶことによって自然免疫・炎症応答を誘導する。しかし、STINGの小胞体からゴルジ体への輸送機構は不明な点が多く残されている。本研究では、遺伝学的なゲノムワイドノックアウトスクリーニング、近接ビオチン標識法によるプロテオーム解析、超解像イメージングなどの技術を駆使し、STINGの輸送を制御する分子としてCOPII輸送小胞の構成タンパク質であるSce24Cやオルガネラコンタクトに関わるゴルジ体タンパク質ACBD3を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STING経路による自然免疫・炎症応答は、ウイルス感染時の感染防御に必要であるだけでなく、この経路の制御機構が破綻して暴走すると、がんや神経変性疾患などのさまざまな病気の進行につながる。したがって、STING経路のシグナル伝達を厳密に制御するためには、STINGの小胞体からゴルジ体への輸送機構を理解することが重要である。本研究ではSTINGの輸送がCOPIIを介した小胞輸送やACBD3を介したオルガネラコンタクトによって制御される可能性が示唆されたため、これらの分子機能を操作することでSTINGの活性を制御できれば、STING関連疾患に対する治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Upon recognizing DNA in cytoplasm, cells activate the endoplasmic reticulum (ER) membrane protein STING and transport it from the ER to the Golgi apparatus, thereby inducing innate immune and inflammatory responses. However, the mechanism of STING transport from the ER to the Golgi remains largely unknown. In this study, we performed genetic genome-wide knockout screening, proteome analysis using proximity biotin labeling, and super-resolution imaging to search molecules that regulate STING transport. As a result, we identified Sce24C and ACBD3 proteins involved in COPII vesicle transport and ER-Golgi organelle contact, respectively.

研究分野：細胞生物学

キーワード：STING COPII ACBD3 ERES 小胞輸送 オルガネラコンタクト 自然免疫 炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体膜タンパク質 STING はウイルスや自己由来の細胞質 DNA に対する自然免疫・炎症応答に必須のシグナルを伝達分子である。すなわち、細胞質 DNA を認識した DNA センサータンパク質 cGAS によって cyclic GMP-AMP (cGAMP) が生成されると、cGAMP と結合して活性化した STING が小胞体からゴルジ体へ移動し、I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生を誘導する。近年、パーキンソン病や神経変性疾患、老化やがんなどにおいて自身の核やミトコンドリアから DNA が細胞質に漏出する現象が見出され、STING の異常な活性化が病態形成に関与することが報告されている。したがって、STING 経路のシグナル伝達機構の全貌を明らかにすることは医学的に重要な課題である。これまでの研究によって STING のゴルジ体移行後のシグナル伝達機構については詳細が明らかにされており、下流のキナーゼ TBK1 や転写因子 IRF3 のリン酸化を介して I 型インターフェロンの遺伝子発現を誘導することがわかっている。しかしながら、リガンド結合して活性化した STING がどのようにして選別されて小胞体からゴルジ体へ運ばれるのか、その仕組みについてはほとんどわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、STING が小胞体から脱出してゴルジ体へ移行するまでの選別輸送機構を解明し、STING 関連炎症性疾患の制御法の開発につなげることを目指した。そのため、STING を選択的に輸送する分子を (1) CRISPR-Cas9 を利用したゲノムワイドノックアウトスクリーニングと (2) 低温輸送阻害法と近接ビオチン標識法を組み合わせたプロテオミクスの二つのアプローチによって同定し、さらにその分子の機能を生化学的・分子生物学的な解析によって明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) CRISPR-Cas9 を利用したゲノムワイドノックアウトスクリーニング

GFP と STING の融合タンパク質を発現するレポーター細胞を樹立した後に、CRISPR-Cas9 ライブラリーを用いて各細胞にランダムな遺伝子変異を誘導し、1 億個のゲノム編集レポーター細胞を準備した。活性化した STING が小胞体を脱出した場合にゴルジ体を經由して最終的にリソソームで分解される性質を利用し、STING を活性化させた後も GFP の蛍光が保たれる (STING の輸送が阻害されたと考えられる) 変異細胞をセルソーターで分取した。得られた変異細胞からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー Miseq を用いてゲノムに挿入された gRNA 標的配列を同定した。コントロール細胞と比較して変異細胞のサンプルにおいてリード数が増えている配列を調べ、候補遺伝子の絞り込みを行った。候補遺伝子の個々のノックアウト細胞を作製し、STING の小胞体からの脱出に異常が生じるかを免疫染色実験によって確認した。

#### (2) 低温輸送阻害法と近接ビオチン標識法を組み合わせたプロテオミクス

小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送は、細胞を 10 °C の低温で培養することによって阻害され、積荷タンパク質は ER exit sites (ERES) と呼ばれる小胞体出口部位に留まることが知られている。そこで、10 °C の低温培養によって STING のゴルジ体への移行をブロックしつつ、膜孔形成毒素によって細胞膜に一過的に微小な孔を空けてリガンドを効率的に細胞内に導入する系を構築し、リガンド結合の STING の局在変化を解析した。さらにこの実験系を近接ビオチン標識法と組み合わせ、小胞体から脱出する際に STING と相互作用する輸送分子の同定を試みた。具体的には、APEX2-STING 融合タンパク質を細胞に発現させ、ビオチンフェノールと過酸化水素水を添加することによって STING の近傍タンパク質をビオチン標識し、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズで精製した後に質量分析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) CRISPR-Cas9 を利用したゲノムワイドノックアウトスクリーニング

##### STING の輸送を制御する因子の同定

STING の分解が抑制された目的の変異細胞のゲノムを調べた結果、STING の分解に関わると考えられるオートファジー関連遺伝子や ESCRT 関連遺伝子に加え、Sec23B や Sec24C などの COPII 輸送関連遺伝子に対する gRNA 配列がコントロール細胞に比べて優位に濃縮されていた (図 1)。そこで Sec23B および Sec24C のノックアウト細胞を作製して解析した結果、STING の小胞体からゴルジ体への輸送が阻害されることが明らかとなった。

##### In vitro 輸送小胞再構成系を用いた STING 小胞形成機構の解析

Sec23B や Sec24C は COPII 輸送小胞の形成に必要な分子である。STING が COPII 輸送小胞に包まれて出芽する可能性を調べるため、セミンタクト細胞と細胞質画分を混合して輸送小胞を生成・単離する in vitro 再構成系を構築した。その結果、STING は cGAMP 依存的に輸送小胞画分に移動することがわかった。この in vitro 再構成実験において、COPII 小胞の形成に必要な Sar1 のドミナントネガティブ変異タンパク質を加える、あるいは Sec24C をノックアウトした細

胞質画分を使用すると、STING の輸送小胞への移動が阻害された。これらの結果から、リガンド結合した STING は COPII 輸送小胞に包まれてゴルジ体へ移動する可能性が示唆された。

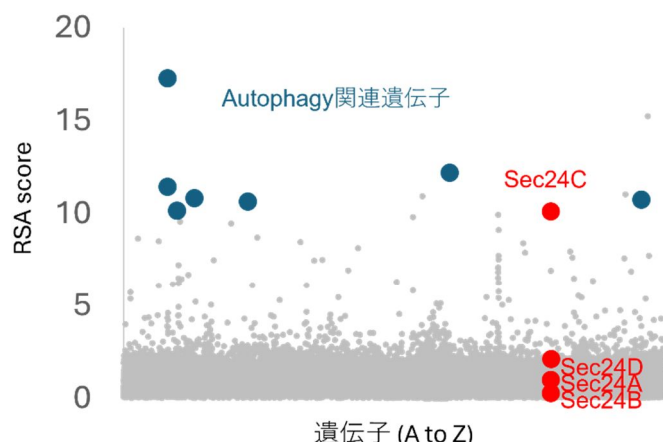


図1 CRISPR-Cas9を利用したゲノムワイドノックアウトスクリーニング RSA scoreによってどの遺伝子に対するgRNA配列が多く挿入されたかをスコア化した。

## (2) 低温輸送阻害法と近接バイオチン標識法を組み合わせたプロテオミクス

### STING と近接する相互作用タンパク質の同定

上記の結果から、STING は COPII 輸送小胞が出芽する部位である ERES からゴルジ体へ移動すると考えられた。ところが予想外のことに、10 の低温培養によって一般的な積荷タンパク質は ERES に蓄積したのに対し、STING は ERES とは異なる小胞体脱出領域に集積することがわかった。そこで STING を特異的な小胞体脱出領域に集積させるための分子が存在すると考え、APEX2 を用いた近接バイオチン標識法によって同定を試みた。リガンド刺激前後のサンプルで STING の近接タンパク質を比較した結果、ゴルジ体局在タンパク質 ACBD3 を同定することに成功した(図2)。ACBD3 を siRNA でノックダウンすると、STING の小胞体脱出領域における集積は著しく阻害された。また、STING および ACBD3 に対する抗体を用いて内在レベルでの共局在実験を行い、両者が同じ場所で集積する様子が観察された。

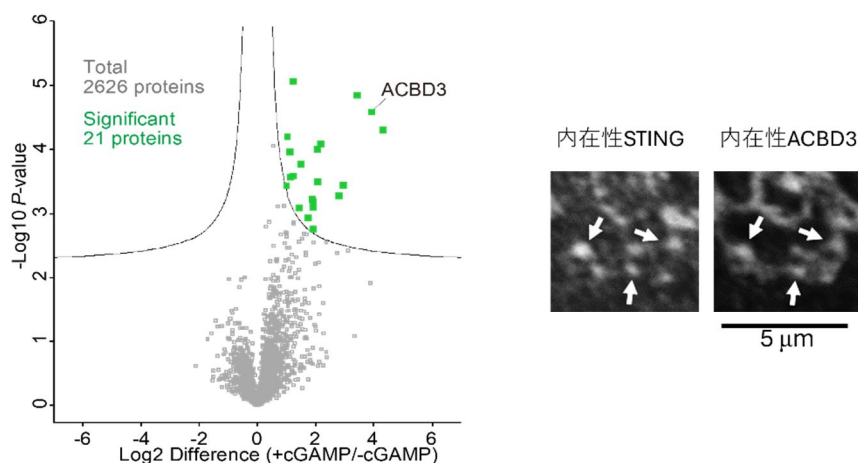


図2 APEX2近接標識プロテオミクスによる新規STING相互作用因子ACBD3の同定 (左図) 右上の枠内はcGAMP(STINGリガンド) 依存的に有意にバイオチン化された21個のタンパク質。(右写真) 共焦点画像。活性化STINGはゴルジ体タンパク質ACBD3と共に集積する。

### 超解像顕微鏡を用いた STING の微細局在解析

10 の低温培養では、STING はゴルジ体へ移動しない。それにもかかわらず、STING がゴルジ体タンパク質 ACBD3 と共局在するのは何故だろうか？この疑問に答えるため、免疫染色実験を行い、構造化照明顕微鏡 Elyra7 を用いて STING の微細局在を解析した。10 の低温培養では細胞内の微細構造が崩れてしまうため、ここでは細胞を 37 で培養し、リガンド刺激後の早いタイミングで細胞を急速に固定して観察した。その結果、リガンド刺激によって活性化した STING は、小胞体マーカータンパク質であるカルネキシンと ACBD3 が接触した領域において集積する像が観察された。すなわち、STING は小胞体 - ゴルジ体コンタクトサイトに集められ、この特殊な領域から小胞体を脱出する可能性が示唆された。

### (3) 輸送小胞とオルガネラコンタクトによる協調的な輸送機構の検討

上記(1)ゲノムワイドスクリーニングと(2)プロテオミクスの二つの解析から、COPII 輸送小胞分子 Sec24C とオルガネラコンタクト分子 ACBD3 の異なる役割を持った分子が STING の輸送を制御することが明らかとなった。そこで、これらの二つの遺伝子を同時にノックダウンした場合、相加的に STING の輸送が阻害されるのか否かを解析した。Sec24C または ACBD3 をそれぞれ単独でノックダウンすると、STING の小胞体からゴルジ体への移行や I 型インターフェロンの遺伝子発現が抑制された。そして両者を同時にノックダウンすると、これらの抑制効果がさらに増加された。以上の結果から、STING の小胞体からゴルジ体への輸送には、COPII による小胞輸送と、ACBD3 によるオルガネラコンタクトを介した輸送の二つの経路が関与しているのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Motani K, Saito-Tarashima N, Nishino K, Yamauchi S, Minakawa N, Kosako H	4. 巻 41
2. 論文標題 The Golgi-resident protein ACBD3 concentrates STING at ER-Golgi contact sites to drive export from the ER	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111868	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 Nishino K, Yoshikawa H, Motani K, Kosako H	4. 巻 21
2. 論文標題 Optimized workflow for enrichment and identification of biotinylated peptides using Tamavidin 2-REV for BioID and cell surface proteomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Proteome Res	6. 最初と最後の頁 2094-2103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jproteome.2c00130	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 Pradipta A, Sasai M, Motani K, Ma JS, Lee Y, Kosako H, Yamamoto M	4. 巻 4
2. 論文標題 Cell-autonomous Toxoplasma killing program requires Irgm2 but not its microbe vacuolar localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000960	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 Motani K and Kosako H	4. 巻 295
2. 論文標題 BioID screening of biotinylation sites using the avidin-like protein Tamavidin 2-REV identifies global interactors of stimulator of interferon genes (STING)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 11174-11183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.014323.	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 Kido K, Yamanaka S, Nakano S, Motani K, Shinohara S, Nozawa A, Kosako H, Ito S and Sawasaki T	4. 巻 9
2. 論文標題 AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.54983	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 茂谷 康、田良島 典子、西野 耕平、山内 駿弥、南川 典昭、小迫 英尊
2. 発表標題 自然免疫分子STINGのオルガネラ間移行を駆動する小胞体 - ゴルジ体コンタクトサイト形成因子の同定
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motani K, Saito-Tarashima N, Nishino K, Yamauchi S, Minakawa N, Kosako H
2. 発表標題 ACBD3 forms specialized ER-Golgi contact sites to drive the ER exit of STING
3. 学会等名 The 17th International Symposium of the Institute Network
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内 駿弥、田良島 典子、茂谷 康、小迫 英尊、南川 典昭
2. 発表標題 膜透過型STINGアゴニストとしてのbis-pivSATE-2'-F-c-di-dAMPの創製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂谷 康
2. 発表標題 細胞質DNAによって活性化されるシグナル伝達機構
3. 学会等名 第70回日本電気泳動学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞情報学分野/徳島大学先端酵素学研究所 <a href="http://www.iams.tokushima-u.ac.jp/lab/kosako/">http://www.iams.tokushima-u.ac.jp/lab/kosako/</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
---------	---------