

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770119

研究課題名(和文)新規小胞体膜複合体によるG蛋白質の活性調節を介した巨大分子分泌機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of large protein secretion regulated by small GTPase and complex localized at the ER

研究代表者

齋藤 康太 (Saito, Kota)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60549632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンは小胞体で合成されるが、形成する複合体が巨大であるため、通常の被覆小胞を介して分泌することができない。我々は先にcTAGE5/TANGO1複合体を単離・同定し、VII型コラーゲンの積み荷受容体として機能することを報告してきた。本若手研究(B)では、新たにcTAGE5の結合因子として見いだした、低分子量G蛋白質 Sar1のグアニンヌクレオチド交換因子であるSec12が、cTAGE5との結合に依存して、その局在をER exit siteに規定していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Collagen synthesized in the ER is too big to fit into conventional transport COPII carriers. How collagen exports from the ER is still unclear. We have previously identified cTAGE5/TANGO1 complex as a cargo receptor for collagen VII at ER exit sites. Here we show that cTAGE5 interacts with Sec12, a guanine-nucleotide exchange factor of Sar1 at ER exit sites. Upon cTAGE5 depletion, Sec12 delocalize from the ER exit sites. These results imply that collagen VII secretion from the ER is regulated not only by cTAGE5/TANGO1 complex but with the activity of Sar1 small GTPase.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：コラーゲン 分泌 小胞体 COPII 低分子量G蛋白質

1. 研究開始当初の背景

小胞体で合成された分泌蛋白質は、小胞により細胞内の様々な小器官あるいは細胞外へと輸送される。高等真核生物が分泌する多種多様な因子のうち、コラーゲンやキロミクロンは小胞体内で巨大な複合体を形成し通常の輸送小胞に入りきれないために独自のメカニズムによって運ばれると考えられている。我々は先に小胞体においてVII型コラーゲンの分泌を特異的に補助する複合体としてcTAGE5/TANGO1を同定した。本複合体はCOPII被覆因子であるSec23/24と結合し、VII型コラーゲンの積み荷受容体として機能するが、その制御機構は不明であった。

2. 研究の目的

本若手研究(B)は、cTAGE5/TANGO1複合体によるVII型コラーゲン輸送のメカニズムをさらに解明し、巨大分子の分泌に対して先駆的な知見を得ることを目的として実験を遂行する。

3. 研究の方法

cTAGE5, Sec12等、各種因子のsiRNAによるノックダウンにはLipofectamine RNAi max (Life technologies)を用いた。各種因子の過剰発現にはLipofectamine 2000あるいはPEIを用いた。細胞内局在の観察には冷メタノールあるいはパラホルムアルデヒドにより固定した細胞した細胞を免疫染色法により染色した。細胞は、共焦点顕微鏡(Carl Zeiss LSM700)を用いて観察した。

免疫沈降法あるいはリコンビナント蛋白質のプルダウン法により調整したサンプルをウエスタンブロットすることによって、cTAGE5およびSec12の結合について評価した。またSar1のGDP乖離速度の検討にはトリチウムラベルしたGDPを用い、Sar1に結合しているGDPの量を定量した。

4. 研究成果

1) cTAGE5免疫沈降による結合因子の探索

cTAGE5抗体を結合させたprotein Gビーズを用いてHeLa細胞抽出液から免疫沈降した。免疫沈降したサンプルを銀染色したところ、約45kDa付近に新規結合因子が認められた。よって、マスペクトロメトリーを用いて解析をおこなった結果、Sec12が同定された。

次に、Sec12に対するモノクローナル抗体を作成し、cTAGE5免疫沈降画分に対しウエスタンブロットを行なったところ、約45kDa付近にSec12のシグナルが検出された。またcTAGE5をsiRNAにより発現抑制した細胞からcTAGE5抗体による免疫沈降を行なったところ、結合するSec12の量は顕著に減少した。さらにSec12抗体を用いてHeLa細胞

抽出液より、免疫沈降した結果、cTAGE5が検出された。よってcTAGE5とSec12は相互作用することが明らかとなった。

2) Sec12の細胞内局在の検出

次にSec12の細胞内局在を検討する目的で、HeLa細胞を冷メタノールあるいはパラホルムアルデヒドにより固定した後、抗体を用いてcTAGE5あるいはSec16とともに免疫染色した。結果、Sec12はcTAGE5あるいはSec16と部分的に共局在することが観察された。さらにBrefeldin Aにより処理した細胞においても両者の共局在は観察された。よってSec12はcTAGE5とER exit siteにおいて相互作用することが明らかとなった。

3) Sec12とcTAGE5の相互作用様式の検討

次にSec12とcTAGE5の相互作用ドメインを明らかにする目的で、cTAGE5の各種欠失変異体を作成した。cTAGE5はN末端より、シグナルアンカーモチーフ、コイルドコイルドメイン(CC1)、コイルドコイルドメイン(CC2)、プロリンリッチモチーフを有している。そこで各ドメインの欠失体を293T細胞に過剰発現させ、同様に過剰発現させたSec12との結合を免疫沈降法により確認した。その結果、Sec12はcTAGE5のコイルドコイルドメイン(CC1)で結合することが明らかとなった。次に、この結合が直接的であるか確かめる目的で、cTAGE5のコイルドコイルドメイン(CC1)およびSec12のリコンビナント蛋白質を大腸菌およびバキュロウイルスを感染させたSf9細胞より調整した。プルダウン法により、両者の結合を検討した結果、Sec12とcTAGE5はcTAGE5のイルドコイルドメイン(CC1)を介して直接結合することが明らかとなった。

4) Sec12の活性に対するcTAGE5結合の影響

Sec12は低分子量G蛋白質Sar1のグアニヌクレオチド交換因子(GEF)である。よってcTAGE5との相互作用がSec12のSar1に対するGEF活性に影響があるか調べる目的で、Sec12, Sar1, cTAGE5およびTANGO1の細胞質側領域をそれぞれ、バキュロウイルスを感染したSf9細胞より調整した。Sec12の添加によりSar1のGDPの乖離速度は顕著に上昇し、Sec12がGEFとして作用していることが確認された。しかしながら、さらにcTAGE5あるいはcTAGE5およびTANGO1の細胞質領域を添加しても、Sar1のGDPの乖離速度に変化は与えなかった。以上のことから、cTAGE5とSec12の結合はSec12のSar1に対するGEF活性には影響を与えないことが明らかとなった。

5) Sec12の局在に対するcTAGE5の影響

cTAGE5 を発現抑制した細胞における Sec12 の局在を免疫染色法により確認した。メタノール固定をした細胞、パラホルムアルデヒドにより固定した細胞の両者とも、cTAGE5 の発現抑制により Sec12 の ER exit site におけるシグナルが減弱した。

6)まとめ

本研究により、Sec12 は cTAGE5 との結合を介して ER exit site に局在化すること、またこの局在化が VII 型コラーゲンの小胞体からの分泌に必須である可能性を明らかにした。Sec12 が ER exit site に局所的に存在することにより、ER exit site 近傍における活性化した Sar1 が増加する可能性が考えられる。本研究の成果は、低分子量 G 蛋白質の局所的な活性化がコラーゲン分泌に必要な可能性を提示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

【査読あり】

- 1) Sasaki A, Nakae I, Nagasawa M, Hashimoto K, Abe F, Saito K, Fukuyama M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Katada T, Kontani K. Arl8/ARL-8 functions in apoptotic cell removal by mediating phagolysosome formation in *C. elegans*. *Mol. Biol. Cell* **24** (10): 1584-1592 (2013) [doi: 10.1091/mbc.E12-08-0628]

【学会発表】(計 12 件)

- 1) Saito, K., Yamashiro, K., Shimazu, N., Tanabe, T. and Katada, T. The tight regulation of Sar1 GTPase cycle is necessary for collagen secretion. Gordon Research Conferences, Molecular Membrane Biology. *Poster Presentation*, 2013 年 7 月 16 日 / アメリカ合衆国
- 2) 齋藤康太, 山城 昂, 嶋津 典子, 田辺 共哉, 堅田 利明. 低分子量 G タンパク質 Sar1 の活性制御に着目したコラーゲン輸送機構の解明. (口頭発表)[第 65 回日本細胞生物学会大会; 2013 年 6 月 19 日 / 名古屋]
- 3) 齋藤康太, 堅田利明. コラーゲン輸送における低分子量 G タンパク質制御機構の解明 (口頭発表)[第 12 回生命科学研究会; 2013 年 6 月 28 日 / 浅虫温泉]
- 4) Shinohara K, Saito K, Katada T. Mechanisms of collagen secretion regulated by the small GTPase Sar1 (ポスター発表・口頭発表)

[第 86 回日本生化学会大会; 2013 年 9 月 12-13 日 / 横浜]

- 5) 田辺共哉, 嶋津典子, 齋藤康太, 堅田利明. cTAGE5 は低分子量 G タンパク質 Sar1 の活性化を制御することでコラーゲン分泌に関与する(口頭発表)[第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2013; 2013 年 9 月 15 日 / 東京大学本郷キャンパス]
- 6) 齋藤康太, 堅田利明. 小胞体からのコラーゲン分泌機構の解明. (ポスター発表)[細胞内ロジスティクス・シンポジウム; 2013 年 9 月 17 日 / 淡路島]
- 7) 齋藤康太, 福島禎一, 堅田利明. 肝線維化時のコラーゲン分泌機構の解析(口頭発表)[第 20 回肝細胞研究会; 2013 年 9 月 27 日 / 大阪]
- 8) 齋藤 康太, 山城 昂, 市川 由希, 嶋津 典子, 堅田 利明. cTAGE5 は TANGO1 と協調してコラーゲンの分泌を補助する(口頭発表)[グローバル COE; 2012 年 2 月 4 日 / 大磯]
- 9) 齋藤 康太, 山城 昂, 市川 由希, 嶋津 典子, 堅田 利明. 表皮水疱症及び肝線維化の病態理解に向けたコラーゲン分泌機構の解明(口頭発表)[新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」第 4 回班会議; 2012 年 6 月 13 日 / 仙台]
- 10) 市川 由希, 山城 昂, 堅田 利明, 齋藤 康太. 組織特異的に分泌に関与する新規 cTAGE5 アイソフォームの機能解析(ポスター発表)[新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」第 4 回班会議; 2012 年 6 月 13 日 / 仙台]
- 11) 嶋津 典子, 山城 昂, 堅田 利明, 齋藤 康太. cTAGE5 は低分子量 G タンパク質 Sar1 の活性化因子 Sec12 と協調してコラーゲン分泌に関与する(ポスター発表)[新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」第 4 回班会議; 2012 年 6 月 14 日 / 仙台]
- 12) 齋藤 康太, 山城 昂, 市川 由希, 嶋津 典子, 堅田 利明. 低分子量 G 蛋白質 Sar1 の活性制御によるコラーゲン分泌機構の解明(口頭発表)[第 11 回生命科学研究会; 2012 年 6 月 30 日 / 秋田]

【図書】(計 0 件)

【産業財産権】
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri>

6．研究組織

(1)研究代表者

齋藤 康太 (SAITO KOTA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号： 60549632