

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440046

研究課題名(和文) コラーゲンを中心とした巨大分子分泌マシナリーの包括的解析

研究課題名(英文) Mechanisms of large cargoes secretion

研究代表者

齋藤 康太 (SAITO, KOTA)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：60549632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、コラーゲン分泌に必要な巨大複合体(cTAGE5/TANGO1L/Sec12, cTAGE5/TANGO1S/Sec12)の組成を明らかにし、これらが低分子量Gタンパク質Sar1の活性を協調的に制御することによってコラーゲン分泌を担っていることを明らかにした。さらに、TANGO1がコラーゲン分泌のみならず、ER exit siteの形成にも関与していることを明らかにした。また肝繊維化時には、COPII小胞被覆因子であるSec23A/Sec24Dが発現上昇すること、この発現を抑制することによって肝星細胞の活性化を抑制できる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of collagen secretion have not been well characterized, because collagens synthesized within the ER are too large to fit into conventional COPII-coated vesicles. We previously characterized TANGO1 as a collagen cargo receptor. In this study, we have characterized that TANGO1 forms macromolecular complexes with cTAGE5 and TANGO1. In addition, we have revealed that TANGO1 acts as a scaffold in corporation with Sec16 and functions as an organizer of ER exit site. We have also identified Sec23a as a protein up-regulated during hepatic stellate cell activation. When Sec23a is depleted, activation of hepatic stellate cells is attenuated.

研究分野：機能生物化学

キーワード：分泌 小胞体 コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体で合成されたタンパク質は小胞に積み込まれ、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因子のうち、特にコラーゲンは小胞体内で巨大な複合体を形成するために通常の輸送小胞には入りきらない。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因子として cTAGE5/TANGO1 複合体を同定した。また本複合体が Sar1 の活性化促進因子である Sec12 と結合しコラーゲン輸送を調節する可能性を見出していた。しかし、いまだコラーゲンの分泌機構の詳細は不明であった。さらに肝繊維化時には cTAGE5/TANGO1 非依存的に I 型コラーゲンが輸送される可能性が見出されたが、解析は不十分であった。

## 2. 研究の目的

本基盤研究(C)は、cTAGE5/TANGO1 複合体による VII 型コラーゲン輸送メカニズムを特に Sar1 の GTPase サイクル制御に関して明らかにする。また肝繊維化時の I 型コラーゲン分泌機構の解析を含め、コラーゲンを中心とした巨大分子分泌機構の包括的解析を行う。

## 3. 研究の方法

本研究は、細胞生物学的解析および生化学的解析を中心として解析を行った。また、Blue-Native PAGE 法、またそれを用いた二次元電気泳動法や、肝灌流法による肝星細胞の単離等、これまでになかった技術についても積極的に習得することにより、幅広い視点から研究を遂行した。

## 4. 研究成果

### 1) 低分子量 G タンパク質 Sar1 のコラーゲン分泌に対する役割

前若手研究(B)および本研究による助成によって、1) cTAGE5 に Sec12 が結合すること、2) この結合が Sec12 の ER exit site への正しい局在化に必須であること、3) Sec12 の ER exit site への正しい局在化がコラーゲンの分泌に必須であることを明らかにした(発表論文 8)。またこの成果を総説として発表した(発表論文 7)。さらに cTAGE5 上の Sec12 との結合部位を、点変異体を用いて絞り込んだ。cTAGE5 をノックダウンした細胞に野生型の cTAGE5 を発現させると阻害されていたコラーゲンの分泌は回復するが、Sec12 と結合できない点変異体を発現した細胞においては、コラーゲン分泌は阻害されたままであった。しかし、この細胞に Sar1 を過剰発現すると、コラーゲンの分泌は回復した。一方、活性化型の Sar1 を発現した細胞においてはコラー

ゲン分泌は回復しなかった、以上のことから、1) Sec12 の ER exit site への集積は低分子量 G タンパク質 Sar1 の活性化を介してコラーゲン分泌に関与すること、2) Sar1 の活性化と不活性化のサイクルがコラーゲン分泌に重要であることが示唆された(発表論文 6)。

### 2) コラーゲン積荷受容体の複合体解析

TANGO1 に小胞体内腔側ドメインを欠失したアイソフォームである TANGO1S が存在することを見出し、TANGO1L と TANGO1S 両者の複合体組成を生化学的に検証した。Blue-Native PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動によって解析したところ、TANGO1L、cTAGE5 多量体、Sec12 多量体からなる 900 kDa の複合体と、TANGO1S、cTAGE5 多量体、Sec12 多量体からなる 700 kDa の複合体の二者がそれぞれ独立して ER exit site に存在することが明らかとなった。さらに、TANGO1L、TANGO1S のそれぞれを発現抑制した細胞のコラーゲン分泌は阻害されたが、TANGO1L、TANGO1S のどちらか一方を発現させることによって、コラーゲン分泌は回復したことから、TANGO1L と TANGO1S、それぞれの複合体は協調的にコラーゲン分泌に関与することが明らかとなった(発表論文 5)。また本複合体がコラーゲン分泌のみならず、オートファジー膜の形成にも関与することを国際的な共同研究として Randy Schekman 博士らとの共同研究により明らかにした(発表論文 3)。

### 3) TANGO1 による ER exit site 形成機構の解析

TANGO1L と TANGO1S を両者発現抑制した細胞においては、通常は ER exit site に局在化する Sec16 と Sec31 が乖離することを見出した。さらに、TANGO1 両アイソフォームのノックダウン細胞においては、コラーゲンのみならず、通常分泌タンパク質の分泌も遅延していることを見出した。さらなる解析の結果、TANGO1L および TANGO1S には Sec16 が直接結合すること、またこの結合は正しい ER exit site の形成に必須であることを見出した。以上の結果から、TANGO1 は Sec16 と協調して ER exit site の形成に関与することが明らかとなった(発表論文 4)。また、これまでの成果を総説として発表した(発表論文 1)。

### 4) 肝星細胞活性化過程における分泌経路の役割

肝繊維化は肝星細胞がコラーゲンを分泌する筋繊維芽細胞様に分化することが主要因であるが治療法は確立されていない。ラット肝より肝灌流法によって単離した肝星細胞を *in vitro* で分化させる系を用いて、肝星細胞の活性化前後における分泌関連遺伝子の発現量を解析した。その結果、小胞体からの分泌小胞の被覆因子 Sec23A/Sec24D がアイ

ソフォーム特異的に発現上昇することを見出した。さらに、これらの発現上昇は転写因子 BBF2H7 依存的であること、3)Sec23A/Sec24D を発現抑制すると肝線維化マーカーの発現を抑制できることを明らかにした(発表論文2)。

#### 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8件)

1. Saito, K., Maeda, M. and Katada, T. Regulation of the Sar1 GTPase Cycle Is Necessary for Large Cargo Secretion from the Endoplasmic Reticulum. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 75 (2017) [doi: 10.3389/fcell.2017.00075.]
2. Tomoishi, S.<sup>1</sup>, Fukushima, S.<sup>1</sup>, Shinohara, K., Katada, T. and Saito, K. CREB3L2-mediated expression of Sec23A/Sec24D is involved in hepatic stellate cell activation through ER-Golgi transport. (<sup>1</sup>Contributed equally) *Sci. Rep.*, 7, 7992 (2017) [doi: 10.1038/s41598-017-08703-6.]
3. Ge, L., Zhang, M., Kenny, S., Liu, D., Maeda, M., Saito, K., Mathur, A., Xu, K. and Schekman, R. Remodeling of ER-exit sites initiates a membrane supply pathway for autophagosome biogenesis. *EMBO Rep.*, 18,1586-1603 (2017) [doi: 10.15252/embr.201744559.]
4. Maeda, M., Katada, T. and Saito, K. TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion. *J. Cell Biol.*, 216 (6), 1731-43 (2017) [doi: 10.1083/jcb.201703084.]
5. Maeda, M., Saito, K., and Katada, T. Distinct isoform-specific complexes of TANGO1 cooperatively facilitate collagen secretion from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, 27, 2688-96 (2016) [doi: 10.1091/mbc.E16-03-0196.]
6. Tanabe, T., Maeda, M., Saito, K., and Katada, T. Dual function of cTAGE5 in collagen export from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, 27, 2008-13 (2016) [doi: 10.1091/mbc.E16-03-0180.]
7. Saito, K. and Katada, T. Mechanisms for exporting large-sized cargoes from the endoplasmic reticulum. *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (19), 3709-20. (2015) [doi: 10.1007/s00018-015-1952-9.]
8. Saito, K., Yamashiro, K., Shimazu, N., Tanabe, T., Kontani, K. and Katada, T. Concentration of Sec12 at ER exit sites via

interaction with cTAGE5 is required for collagen export.

*J. Cell. Biol.*, 206 (6), 751-62. (2014) [doi: 10.1083/jcb.201312062.]

[学会発表](計20件)

1. 齋藤康太, 高等真核生物に特有な分泌機構全般の解明、[ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会合同大会] 2017年12月8日神戸ポートアイランド 兵庫県・神戸市
2. 前田 深春、堅田 利明、齋藤 康太 ”TANGO1はSec16をER exit siteにリクルートし、小胞体からの効率的なタンパク質分泌を可能にする” [ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会合同大会] 2017年12月8日 神戸ポートアイランド 兵庫県・神戸市
3. Kota Saito. Mechanisms of secretion by ER-resident macromolecular complex. 1st International Symposium on Cell Logistics at GIST, 光州(大韓民国)、2017年10月
4. Miharu Maeda, Toshiaki Katada, Kota Saito “TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion.” [Gordon Research Conferences, Molecular Membrane Biology] 2017年7月16-21日 Andover, USA (一般演題ポスター)
5. 齋藤康太、前田深春、佐々木紀人、友石章太郎、堅田利明、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、[第16回生命科学研究会] 2017年6月30日 KKRホテル 石川県・金沢市
6. 齋藤 康太、前田 深春、篠原 健太郎、佐々木 紀人、友石 章太郎、堅田 利明 ”小胞体からのコラーゲン分泌機構の解析” [第68回日本細胞生物学会大会] 2016年6月16日 京都テルサ 京都府・京都市 (ワークショップ)
7. Kota Saito. Mechanisms of collagen secretion from the endoplasmic reticulum. [第31回国際生物学賞シンポジウム] 2015年12月5日 京都国際会館 京都府・京都市
8. Miharu Maeda, Kota Saito, Toshiaki Katada “Molecular Characterization of collagen VII cargo receptor complex within the endoplasmic reticulum.” [第31回国際生物学賞シンポジウム] 2015年12月5日 京都国際会館 京都府・京都市 (一般演題ポスター)
9. 齋藤 康太、前田 深春、篠原 健太郎、堅田 利明 ”生理的および肝線維化時におけるコラーゲン分泌機構の解析” [BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会]

- 2015年12月3日 神戸ポートアイランド  
兵庫県・神戸市 (ワークショップ)
10. 前田 深春、齋藤 康太、堅田 利明 ”小胞体上のVII型コラーゲン積み荷受容体の性状解析” [BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会] 2015年12月3日 神戸ポートアイランド 兵庫県・神戸市 (一般演題ポスター)
  11. Kota Saito. Mechanisms of collagen secretion from the endoplasmic reticulum. Peking University、北京 (中華人民共和国)、2015
  12. Kota Saito. Mechanisms of collagen secretion from the endoplasmic reticulum. Chinese Academy of Sciences、北京 (中華人民共和国)、2015
  13. Kota Saito, Tomoya Tanabe, Toshiaki Katada. Dual function of cTAGE5 in collagen export from the ER. Gordon Research Conferences, Molecular membrane biology, Andover (アメリカ合衆国)、2015年7月15日
  14. 前田 深春、齋藤 康太、堅田 利明 ”小胞体上のVII型コラーゲン積み荷受容体の性状解析” [第14回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2015] 2015年9月12日 千葉大学 千葉県・千葉市 (一般演題)
  15. 齋藤 康太、田辺 共哉、篠原 健太郎、前田 深春、佐々木 紀人、堅田 利明 “コラーゲン分泌に対しcTAGE5は2種の異なる機能を有する” [第67回日本細胞生物学会] 2015年7月1日タワーホール船堀 東京都・江戸川区 (ワークショップ)
  16. 齋藤康太、篠原健太郎、前田深春、佐々木紀人、友石章太郎、堅田利明、小胞体からのコラーゲン分泌機構の機能解析、第14回生命科学研究会、三浦、2015
  17. 福島 慎一、前田 深春、齋藤 康太、堅田 利明. 肝線維化におけるコラーゲン分泌機構の解析 (口頭発表) [第87回日本生化学会大会] 2014年10月18日 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)
  18. 齋藤 康太、福島 慎一、前田 深春、堅田 利明. 肝星細胞活性化に伴う分泌動態変化の解析 (口頭発表) [第22回肝細胞研究会] 2014年6月28日 東京医科歯科大学 (東京都・文京区)
  19. 齋藤 康太、福島 慎一、篠原 健太郎、田辺 共哉、平塚 允乃、前田 深春、堅田 利明. 生理的および肝線維化時におけるコラーゲン分泌機構の解析(口頭発表) [第66回日本細胞生物学会大会] 2014年6月11日 奈良新公会堂、東大寺総合文化センター(奈良県・奈良市)
  20. 堅田 利明、齋藤 康太. 新奇Gサイク

ルの起動制御に関わる構造生物学的解析(口頭発表) [新学術領域研究「構造細胞生物学」班会議] 2014年6月14日 ルスツリゾートホテル(北海道・虻田郡留寿都村)

〔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〕

ホームページ等

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

## 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

### (3) 連携研究者

堅田 利明 (KATADA TOSHIAKI)

武蔵野大学・薬学部・教授

研究者番号: 10088859