

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03651

研究課題名（和文）コラーゲン分泌と小胞体出芽ドメインの形成に関与する新規膜複合体の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel membrane complexes involved in collagen secretion and ERES formation

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体上のERESは分泌の出発点である。ERESは細胞分裂期に崩壊し、これが細胞分裂期の分泌停止の要因と考えられてきたがメカニズムは不明であった。我々は、コラーゲンの積荷受容体として当初単離したTANGO1がCK1によるリン酸化とPP1による脱リン酸化によって調節されることで、細胞分裂期のERESの崩壊と再形成を制御してい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

我々は、細胞分裂期においてもERESが崩壊しない状態を作り出すことに成功した。これによって細胞分裂を停止することができれば、新たな抗がん剤の標的となりうる。

研究成果の概要（英文）：How ER exit sites disassemble during mitosis was not well understood. We revealed that TANGO1, a cargo receptor originally identified for collagens, acts as a core for ER exit site disassembly. We revealed that TANGO1 is phosphorylated by Casein Kinase 1 and dephosphorylated by Protein Phosphatase 1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分泌 ER exit site Sec16 TANGO1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは合成された後、小胞体内で巨大な複合体を形成し通常分泌小胞に入りきらない。このためコラーゲンの分泌には特殊な機構が想定されていたが、詳細は不明であった。代表者は巨大分子コラーゲンの小胞体からの分泌を特異的に補助する複合体(TANGO1/cTAGE5/Sec12)を同定し、その機能解析を行ってきた。代表者は、本複合体が Sec16 と協調的に小胞出芽ドメインである ER exit site の局在規定因子としてもはたらくことを見出しているが、その機能的意義は不明であった。

2. 研究の目的

代表者は、当該複合体の機能解析を継続することでコラーゲンの分泌メカニズムを明らかにするのみならず、高等真核生物における ER exit site の形成及び局在規定機構を解明していくことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、主に細胞生物学的な手法および生化学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) TANGO1 の PPS 領域へのリン酸化修飾は、TANGO1 と Sec16 の結合を減弱させ、ER exit site を崩壊させる。

翻訳後修飾データベースである Phosphosite Plus により、TANGO1 の細胞質側にリン酸化報告が多数存在する残基を見出し、この領域を phosphorylation predicted sequences (PPS) と命名した。PPS は Sec16 と TANGO1 の相互作用領域である SIR (Sec16 Interaction Region) に近接している。そこで TANGO1S の PPS 内におけるリン酸化候補残基をアラニンに置換した非リン酸化変異体 (SA 変異体) および、グルタミン酸に置換したリン酸化模倣変異体 (SE 変異体) を作出し Sec16 との結合親和性を検討した。その結果、SE 変異体において Sec16 との結合は野生型 TANGO1S に比べて大幅に減弱していた一方で、SA 変異体は野生型よりも結合量が増加していた。したがって TANGO1 の PPS 領域がリン酸化されることで Sec16 と TANGO1 の結合親和性が減弱する可能性が明らかになった。

次に TANGO1S 各変異体を、内在の TANGO1 を発現抑制した細胞に発現させた際の ER exit site の形成能を評価した。その結果、SA 変異体においては、野生型と同様に ER exit site の形成が回復するが、SE 変異体を発現した細胞においては TANGO1 を発現抑制した際の ER exit site の崩壊は回復できなかった。さらにモデルカーゴである VSVG の輸送を検証した結果、SA 変異体は野生型と同様に分泌が正常におこったが、SE 変異体を発現した細胞においては、VSVG の輸送が遅延した。以上の結果は、TANGO1 の PPS 領域がリン酸化されることで、Sec16 との結合親和性が減弱し、ER exit site の崩壊と分泌の抑制が生じることを示唆している。

(2) CK1δ は TANGO1 を直接リン酸化し、ER exit site を崩壊させる

次に、TANGO1 の PPS 領域をリン酸化するキナーゼを探索した。CK1δ が小胞体-ゴルジ体間のタンパク質輸送に関与することが明らかになっていたため、CK1δ が TANGO1 を直接リン酸化するかを $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP を用いた *in vitro* 評価系で検証した。その結果、TANGO1 の PPS 領域を含む C 末端領域のリコンビナントは CK1δ によってリン酸化されたが、TANGO1 の SA 変異体はほとんどリン酸化されなかった。以上の結果より、CK1δ によって TANGO1 の PPS 領域が直接リン酸化されることが明らかになった。

次に CK1δ が ER exit site の構成や形態に与える影響を評価した。CK1δ を過剰発現させた細胞では Sec16 と Sec31 は解離し、TANGO1 の SE 変異体を発現させた際と同様の表現型が観察さ

れた。一方、キナーゼ活性を有さないCK1 δ K38R 変異体を発現させた細胞では、ER exit site の乖離は認められなかった。さらにCK1の阻害剤であるIC261を添加した細胞において、ER exit siteの肥大化が認められた。以上の結果より、CK1 δ がキナーゼ活性依存的にER exit siteの形態に影響を与えることが明らかになった。

(3) TANGO1はPP1によって脱リン酸化される

続いてTANGO1の脱リン酸化酵素を単離する目的で、各種阻害剤を用いた検討を行った。その結果、PP2A特異的阻害剤であるエンドサールを添加した細胞では、ER exit siteの形態変化はほとんど認められなかったが、PP1とPP2A両者の阻害剤であるオカダ酸を処理した細胞においては、Sec16とSec31の共局在率が有意に低下していた。さらにPP1をsiRNAによって発現抑制した際にも、Sec16とSec31の共局在率が有意に低下した。

次に、PP1がTANGO1のリン酸化状態に与える影響を調べる目的でTANGO1S-FLAGの安定発現株にオカダ酸を添加し、phos-tagを用いてTANGO1Sのリン酸化を定量する解析を行った。その結果、野生型TANGO1Sのリン酸化はオカダ酸存在下で亢進していたが、TANGO1S SA変異体を用いた場合にはオカダ酸添加によるリン酸化の亢進は認められなかった。さらにTANGO1S SA変異体の安定発現株では、オカダ酸添加によるER exit siteの崩壊も抑制されていた。以上の結果は、PP1によるTANGO1のPPS領域の脱リン酸化がER exit siteの形成に必要であることを示している。

(4)細胞分裂期におけるTANGO1のリン酸化亢進によってER exit siteは崩壊する

細胞分裂期には、分泌の停止とともにER exit siteが崩壊することが報告されている。しかし、この一時的なER exit site崩壊の分子メカニズムは不明であった。そこで細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にTANGO1のPPS領域のリン酸化が関与する可能性を考え検証を行った。まず、間期と分裂期それぞれにおけるTANGO1Sのリン酸化量をphos-tagにより定量した。その結果、細胞分裂期に同調させた培養細胞において野生型TANGO1Sのリン酸化量は増加していたが、TANGO1S SA変異体においては細胞分裂期においてもリン酸化量が変化しなかった。したがって、細胞分裂期にはTANGO1のPPS領域においてリン酸化が亢進することが明らかになった。

さらに、野生型TANGO1SあるいはTANGO1S SA変異体を発現する安定発現株を用いて、細胞分裂期におけるER exit siteの形態を観察した。野生型TANGO1Sを発現する細胞においては、分裂中期においてSec16/Sec31の局在が解離していた一方で、TANGO1S SA変異体が発現する細胞では、分裂中期においてもSec16とSec31が共局在する点が多数認められた。この結果は、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にはTANGO1のPPS領域におけるリン酸化が必要であることを意味している。

さらに、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にCK1 δ が関与する可能性を検討するため、CK1 δ/ϵ を発現抑制した細胞でのER exit siteを観察した。その結果、TANGO1S SA変異体安定発現株と同様、CK1 δ/ϵ を発現抑制した細胞においてもSec16とSec31が共局在する点が多数認められた。以上の結果から、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊はCK1 δ によるTANGO1 PPS領域のリン酸化によって生じる可能性が強く示唆された。

(5)まとめ

本研究により、TANGO1のPPS領域をCK1 δ がリン酸化し、PP1が脱リン酸化することが明らか

になった。CK1 δ の活性は細胞周期を通じて一定であるが、PP1 の活性は細胞分裂期に Cdk1-CyclinB1 複合体によってリン酸化されることで減弱する。したがって間期において TANGO1 のリン酸化状態は、CK1 δ によるリン酸化と PP1 による脱リン酸化の平衡状態にあるが、細胞分裂期においては PP1 の脱リン酸化活性のみが低下するために、TANGO1 のリン酸化が亢進すると考えられる (図 1)。ER exit site は細胞外環境や概日リズムに応じてその数や大きさを変化させ、分泌を調節することが報告されている。TANGO1 と Sec16 の結合は ER exit site の形成起点となることから、細胞分裂期以外の ER exit site の適応メカニズムにおいても今回得た知見と同様の制御機構が関与する可能性が考えられる。

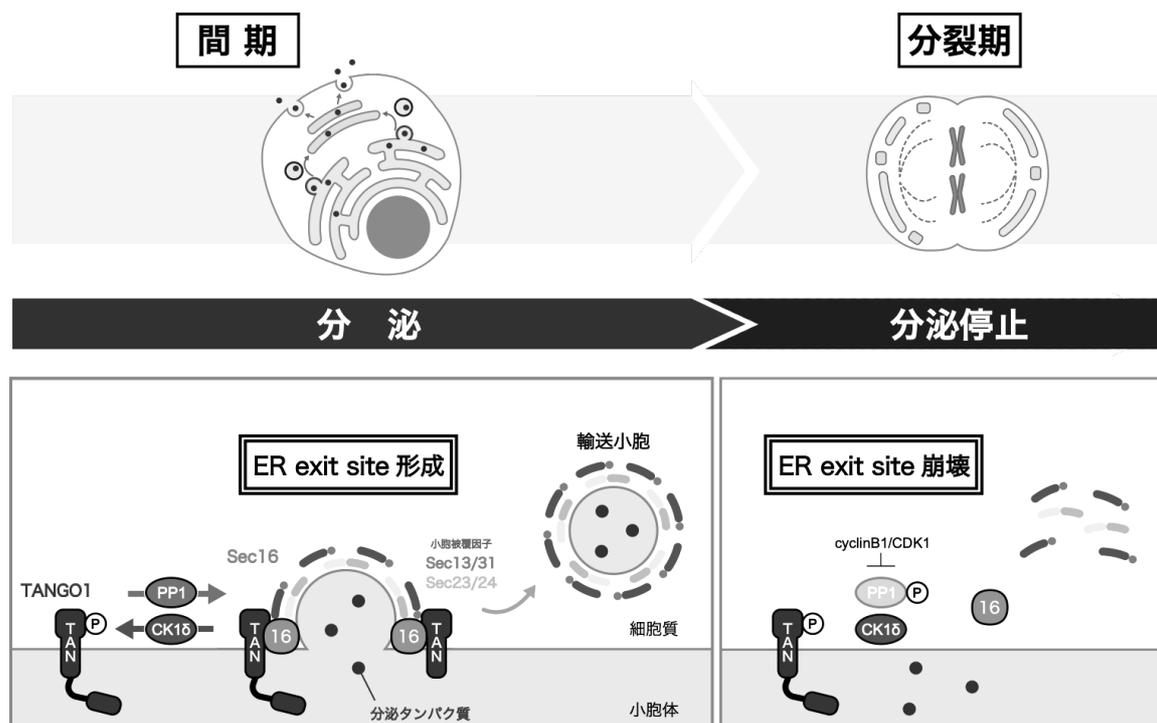


図 1 細胞周期依存的な ER exit site の形成・崩壊は TANGO1 のリン酸化状態によって制御される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

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 -

1. 著者名 Centonze Federica G., Reiterer Veronika, Nalbach Karsten, Saito Kota, Pawlowski Krzysztof, Behrends Christian, Farhan Hesso	4. 巻 218
2. 論文標題 LTK is an ER-resident receptor tyrosine kinase that regulates secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 2470 ~ 2480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201903068	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 該当する

1. 著者名 Saito Kota, Maeda Miharu	4. 巻 166
2. 論文標題 Not just a cargo receptor for large cargoes; an emerging role of TANGO1 as an organizer of ER exit sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz036	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 Maeda Miharū, Kurokawa Kazuo, Katada Toshiaki, Nakano Akihiko, Saito Kota	4. 巻 9
2. 論文標題 COP11 proteins exhibit distinct subdomains within each ER exit site for executing their functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43813-3	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 Ogawa Emari, Mukai Kojiro, Saito Kota, Arai Hiroyuki, Taguchi Tomohiko	4. 巻 503
2. 論文標題 The binding of TBK1 to STING requires exocytic membrane traffic from the ER	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 138 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.199	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14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4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

1. 発表者名 Maeda, M., Komatsu, Y., Saito, K.
2. 発表標題 Mitotic ER exit site dissociation and reassembly are regulated by phosphorylation status of TANGO1
3. 学会等名 Gordon Research Conferences, Molecular Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maeda, M., Sasaki, N., Shiraiwa, M., Yorimitsu, T., Sato, K., Katada, T., Saito, K.
2. 発表標題 cTAGE5 acts as a Sar1 GTPase regulator for collagen export
3. 学会等名 Gordon Research Conferences, Molecular Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 巨大分子の分泌機構
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会・第17回アジア先天代謝異常症シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 細胞周期に応じたリン酸化による分泌調節機構
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 細胞周期に応じた小胞体出芽ゾーン「ERES」の崩壊と再形成の分子機構
3. 学会等名 第3回オルガネラ・ゾーン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 Evolutionary Perspective on the ER exit sites structure
3. 学会等名 第70回 日本細胞生物学会 第51回 日本発生生物学会 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田 深春、堅田 利明、齋藤 康太
2. 発表標題 Phosphorylation of TANGO1 regulates localization and function of ER exit sites
3. 学会等名 第70回 日本細胞生物学会 第51回 日本発生生物学会 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 巨大分子の分泌機構
3. 学会等名 2018年度 日本生化学会関東支部例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田 深春、齋藤 康太
2. 発表標題 TANGO1はSec16と協調的にER exit siteの形成制御機構に関与する
3. 学会等名 第17回 生命科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 康太、前田 深春、小松 幸恵
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第69回 薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kota Saito
2. 発表標題 Mechanisms of Secretion in Fibrosis
3. 学会等名 American Society for Matrix Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miharu Maeda, Kota Saito
2. 発表標題 Regulation of the Sar1 GTPase cycle is necessary for collagen secretion from the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 American Society for Matrix Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 小胞体出芽部位(ER exit site)構造の進化的保存性と多様性について
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

秋田大学大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学講座
<https://www.med.akiita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=yakuri>

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			
ノルウェー	University of Oslo			
ドイツ	Ludwig-Maximilians- Universitat			
ポーランド	Warsaw University of Life Sciences			
スウェーデン	Lund University			
ノルウェー	University of Oslo			
ドイツ	Ludwig-Maximilians- Universitat			
ポーランド	Warsaw University of Life Sciences			