

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02135

研究課題名（和文）コラーゲン分泌を調節するカルシウム制御ネットワークの解析

研究課題名（英文）A study of a calcium-binding protein-regulated network in collagen secretion

研究代表者

柴田 秀樹（Shibata, Hideki）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30314470

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：コラーゲンはヒトの乾燥重量の25%を占める構造蛋白質であり、小胞体からゴルジ体を経て細胞外へ分泌される。本研究では、カルシウム結合蛋白質ALG-2を中心としたカルシウム応答性制御因子がコラーゲンの小胞体からの搬出制御を司る分子メカニズムの解明を目指し、ALG-2の作用標的となる分子をその結合モチーフによって探索し、また近接依存性標識法を用いた解析から同定した。そして、得られた複数の制御因子候補の相互作用ネットワークと細胞内局在、および生理機能を生化学的、分子細胞生物学的解析により明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分泌蛋白質のほとんどは、小胞体で合成されゴルジ体を経由して細胞外に分泌される。細胞外マトリクスの主要成分である線維性コラーゲンは、その長さが300 nmにもおよび、小胞体からどのように搬出され細胞外まで輸送されるのか不明であった。近年、線維性コラーゲン輸送の制御因子の同定がすすめられ、その中でALG-2はカルシウムに反応する因子である。本研究では、ALG-2の新たな標的蛋白質を同定し、小胞体内腔のカルシウム濃度の恒常性維持に関わる可能性を示した。また、小胞体からの搬出の制御蛋白質候補も新たに同定されており、線維症などコラーゲン分泌の異常が関連する疾患の新奇の創薬標的になることも期待される。

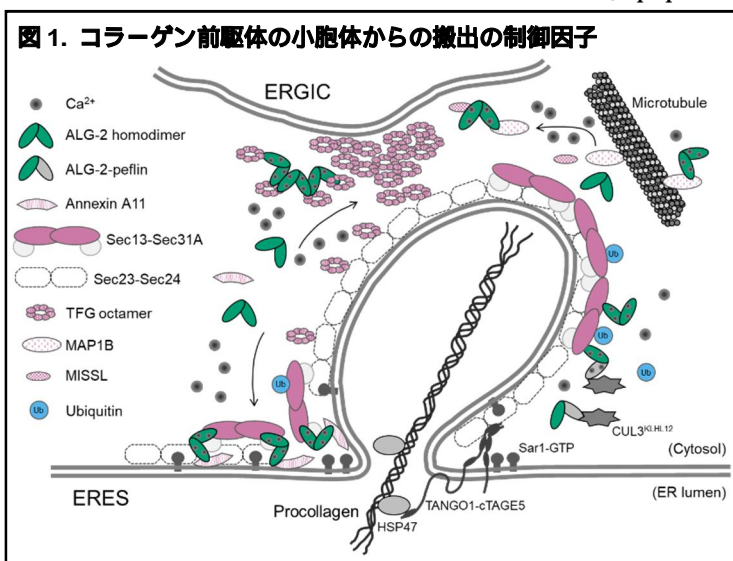
研究成果の概要（英文）：Collagens are structural proteins that constitute approximately 25% of human dry body weight and are secreted from the endoplasmic reticulum to the extracellular space via the Golgi apparatus. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms by which calcium-responsive regulators, mainly the calcium-binding protein ALG-2, control export of collagens from the endoplasmic reticulum, by searching for target molecules of ALG-2 by its binding motifs and by using proximity-dependent labeling methods coupled with mass spectrometry. The protein-protein interaction networks and subcellular localization of multiple candidate regulators and their functions were elucidated by biochemical and molecular cell biological approaches.

研究分野：応用生物化学

キーワード：カルシウム コラーゲン COP11 分泌経路 小胞体

1. 研究開始当初の背景

分泌経路研究は、出芽酵母 *sec* 変異株の研究と動物培養細胞を用いた生化学的な研究、さらには分子生物学的な手法を取り入れることにより、その分子機構の解析がすすめられてきた。小胞体からの蛋白質搬出を担う COPII (coat protein complex II) は、内被覆を構成する Sec23 と Sec24 のヘテロ二量体と外被覆を構成する Sec13 と Sec31 のヘテロ四量体からなり、小胞体膜で GTP 型となった低分子量 GTPase Sar1 によって、細胞質から小胞体に動員される。これまでに受け入れられている小胞輸送モデルでは、COPII が小胞体の輸送小胞出芽領域 (ERES、endoplasmic reticulum exit site) に動員され、積荷蛋白質の選別と輸送小胞の出芽を担う。生化学的に単離した COPII 小胞の電子顕微鏡を用いた観察や細胞や組織の免疫電子顕微鏡解析から、COPII 小胞の直径は 60-90 nm とされている。細胞外マトリックスの主要成分である線維性コラーゲンは、粗面小胞体で合成され、小胞体からゴルジ体を経て細胞外に分泌されるが、小胞体内腔で長さ約 300 nm にもおよぶ三本鎖らせん構造を形成する。線維性コラーゲンの分泌に COPII が必須であることが示されていたが、COPII が形成する輸送小胞の直径よりも長い線維性コラーゲン分子がどのように小胞体から搬出されるかの分子機構は不明であった。我々の研究グループを含め、研究開始当初までに、COPII に結合し線維性コラーゲン前駆体の小胞体からの搬出を担う分子として、コラーゲン前駆体を識別し作用する TANGO1、cTAGE5、カルシウムイオン結合モチーフである EF-hand をもつカルシウム結合蛋白質 ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) とその相互作用蛋白質 Peflin、TFG (Trk-fused gene)、MISSL (MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein-like)、コビキチン化を担う KLHL12、SYVN1 などが同定されていた (図 1)。しかしこれらの生理作用の関連、および相互作用ネットワークの詳細は不明であった。cTAGE5、TFG、MISSL、SYVN1 は、我々が同定した ALG-2 が結合するモチーフ配列を有することから、ALG-2 がコラーゲン前駆体の小胞体からの搬出において中心的な役割を果たす可能性が考えられた。



2. 研究の目的

本研究では、ALG-2 の相互作用蛋白質および ERES に局在する蛋白質を網羅的に同定し、それらの小胞体からの蛋白質搬出における役割と蛋白質間相互作用ネットワークを解明することで、コラーゲン分泌の制御の分子メカニズムの全容解明を目指してきた。具体的には、ALG-2 の結合蛋白質の結合強度を定量可能な結合実験系を構築し、ALG-2 の結合モチーフをもつ蛋白質との結合の強さを Sec31A と比較、検討した。また、近接依存性ビオチン標識法を用いて ALG-2 および COPII 構成蛋白質の近傍に局在する蛋白質を網羅的に同定した。

3. 研究の方法

(1) ALG-2 の Nluc (nanoluciferase) 融合蛋白質を用いた結合解析

深海エビ由来発光蛋白質 Nluc と ALG-2 の融合蛋白質 (Nluc-ALG-2) を大腸菌にて発現、精製した。ALG-2 結合モチーフをもつ ALG-2 結合蛋白質候補の全長、あるいは ALG-2 結合モチーフを含む領域を GFP (green fluorescent protein) 融合蛋白質として動物細胞に発現させ、その細胞溶解液から抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降産物を SDS-PAGE にて展開し、PVDF 膜に転写後、Nluc-ALG-2 と反応させ、Nluc-ALG-2 の発光により結合を検出した。また、抗 GFP 抗体の沈降産物と Nluc-ALG-2 をカルシウムイオン存在下で反応させ、共沈降される Nluc-ALG-2 量をその発光強度から定量した。

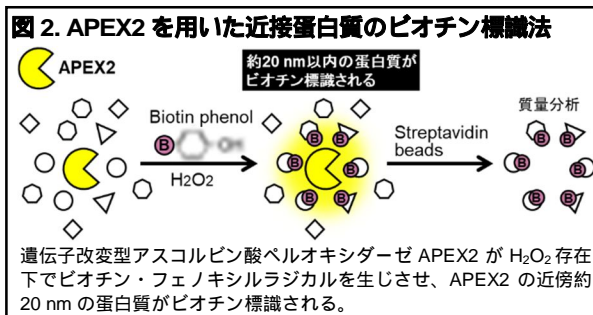
(2) APEX2 融合蛋白質を用いた近接依存性ビオチン標識法

ALG-2 および COPII 構成蛋白質、既知の ERES 局在蛋白質と APEX2 の融合蛋白質を恒常発現する種々の細胞株を作製し、融合蛋白質の局在を免疫染色法により解析した。APEX2 融合蛋白質が ERES 局在を示し、かつ ERES 局在蛋白質 Sec16A とシスゴルジ体局在蛋白質 GM130 の細胞内分布に、APEX2 融合蛋白質の恒常発現による影響のない細胞株を選抜し、細胞培養液にビオチンフェノールと過酸化水素を添加し、ビオチン標識をした (図 2)。ビオチン標識され

た蛋白質をストレプトアビジン・セファロースビーズで濃縮し、濃縮された蛋白質を質量分析により同定した。

(3) I 型コラーゲン前駆体の小胞体からの搬出の追跡

ヒト線維芽細胞 IMR-90 を 40 で培養し、新規に合成されるコラーゲン前駆体を小胞体に留めた。その後、32 で培養することで小胞体からの搬出を開始させた。32 の培養後、経時的に細胞を固定し、抗 I 型コラーゲン抗体と抗 GM130 抗体を用いた間接蛍光抗体法により免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡により蛍光画像を取得した。



(4) 蛋白質間相互作用解析と局在解析

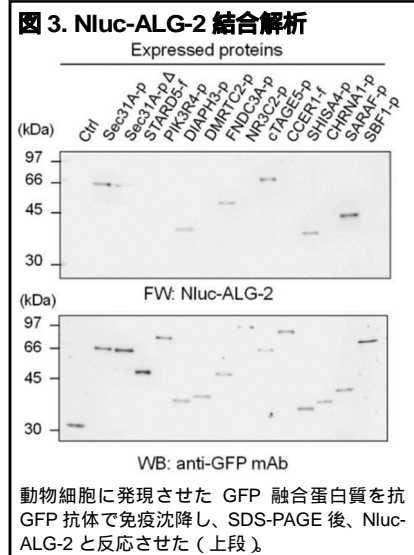
PRRC1 と COPII 構成蛋白質との相互作用は、培養細胞に GFP 融合 PRRC1 と Myc タグを付加した COPII 構成蛋白質を発現させ、抗 GFP 抗体により免疫沈降し、免疫沈降産物中に Myc タグを付加した COPII 構成蛋白質が共沈降されているかを検討した。また、市販の抗 PRRC1 抗体は免疫染色に使用できなかったため、GFP あるいは Myc タグを付加した PRRC1 の局在を観察した。

(5) FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 解析

Sec23A および Sec31A の GFP 融合蛋白質を恒常発現する細胞を用いて、制御蛋白質候補の発現抑制が Sec23A-GFP および Sec31A-GFP の ERES 局在に及ぼす影響について FRAP を用いて速度論的に解析した。

4. 研究成果

(1) I 型コラーゲン前駆体の小胞体からの搬出に必要なカルシウム結合蛋白質 ALG-2 の相互作用ネットワークを明らかにするため、Sec31A の ALG-2 との相互作用解析から同定した ALG-2 結合モチーフに着目し、同様のモチーフをもつ複数の蛋白質について ALG-2 との結合能を検討した。検討した蛋白質の中には、コラーゲン前駆体の小胞体での積荷受容体として TANGO1 と協調して機能する cTAGE5、小胞体およびゴルジ体への局在が報告されている FNDC3A、SARAF が含まれる。ALG-2 の組換え体を深海エビ由来発光酵素 Nanoluciferase (Nluc) の融合蛋白質として大腸菌にて発現、精製しプローブとして用いた。ALG-2 との結合が見込まれる候補蛋白質の全長、あるいは ALG-2 結合モチーフを含む領域を GFP 融合蛋白質として培養細胞に発現し、抗 GFP 抗体で免疫沈降した産物を SDS-PAGE にて展開後、PVDF 膜に転写し Nluc-ALG-2 によりプロットした (FW、Far-Western)。その結果、上記の 3 つの蛋白質との結合が確認された (図 3)。さらに、それらとの結合強度を検討するため、抗 GFP 抗体の免疫沈降産物と Nluc-ALG-2 をカルシウムイオン存在下で混合し、共沈降される Nluc-ALG-2 量をその発光強度によって定量化した。その結果、SARAF は Sec31A と同等の結合強度であったが、cTAGE5 と FNDC3A との結合は Sec31A の 10 分の 1 以下であった。FW 解析では免疫沈降産物が SDS-PAGE によって変性するため、十分な結合が検出されたと考えられた。これらの結果を受けて、ALG-2 の新たな標的分子として SARAF に焦点を絞って解析し、ALG-2 が SARAF の細胞質領域のオリゴマー化を促進し、ユビキチン修飾を阻害していることを明らかにした。



(2) ダイズ由来アスコルビン酸ペルオキシダーゼの変異体酵素 APEX2 を用いた近接蛋白質のビオチン標識手法を用いて、ALG-2 の近傍で小胞体からの蛋白質搬出を担う蛋白質の同定を試みた。また、COPII 構成蛋白質 Sec23A および Sec31A の近傍蛋白質についても探索した。ALG-2 近傍蛋白質は主に 3 つのグループに大別された。1 つ目は、ALG-2 結合蛋白質である Sec31A と TFG をはじめとした小胞体の輸送小胞出芽部位 ERES で機能する蛋白質および積荷蛋白質の受容体であり、Sec31A、TFG 以外に Sec13、Sec23A、Sec24B、Sec24C などの COPII 構成蛋白質、Sec23 に結合する p125/Sec23IP、初期分泌経路のオルガネラ間を循環する YIF1A、YIPF5、BET1、シスゴルジ体蛋白質 GM130 などが含まれる。2 つ目は、ALG-2 結合蛋白質である TSG101、VPS37C、IST1 を含む ESCRT (endosomal complex required for transport) 関連蛋白質である。3 つ目は ALG-2 と協調して機能すると考えられるカルシウム結合蛋白質 Peflin、Sorcin、アネキシン A7 などである (図 4)。一方、COPII 構成蛋白質 Sec23A の近傍蛋白質として、COPII 構成蛋白質とともに既知の結合蛋白質である ALG-2、Peflin、TFG、

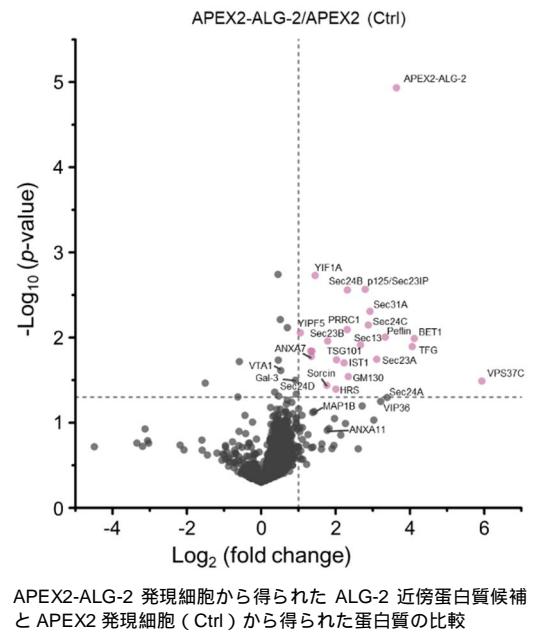
p125/Sec23IP、TANGO1、MIA2、Sec16A が同定された。これらの解析から、ERES 近傍でカルシウムイオンの小胞体からの漏出を担う蛋白質の同定が期待されたが、それは得られなかった。一方、ALG-2 と COPII 構成蛋白質に共通する近傍蛋白質として機能未知であった PRRC1 (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 1) が得られた。

(3) PRRC1 の小胞体とゴルジ体間の蛋白質輸送における機能解明を目的として、まず PRRC1 の GFP との融合蛋白質の局在を観察した。その結果、GFP-PRRC1 のほとんどは、GM130 が局在するシスゴルジ体に分布し、一部、Sec31A 陽性の ERES にも局在が観察された。PRRC1 の各種領域欠損変異体を作製し、その GFP 融合蛋白質の局在を観察し、シスゴルジ体局在に必要な領域を同定した。次に、PRRC1 と COPII 構成蛋白質との結合を解析し、PRRC1 が COPII 内被覆を構成する Sec23A/B と結合することを明らかにした。また、その結合領域はシスゴルジ体局在を担う領域と異なることを見出した。

さらに、PRRC1 の発現抑制が COPII 構成蛋白質の ERES 局在に及ぼす影響を解析した結果、PRRC1 が COPII の ERES 局在を負に制御することが判明した。さらに、PRRC1 のコラーゲン輸送における役割の解明を目指し、線維芽細胞における PRRC1 の発現抑制が I 型コラーゲンの小胞体からの搬出に与える影響を検討したが、有意な差は得られなかった。PRRC1 が十分に発現抑制されていない可能性が考えられたため、CRISPR/Cas9 システムを用いた PRRC1 のノックアウト細胞の樹立を試みたが、単離した細胞株からは PRRC1 がノックアウトされた細胞は得られなかった。コラーゲン輸送における PRRC1 の役割については、今後の解析課題である。

(4) 創傷した組織の修復過程では、線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化し、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの産生および分泌が増加する。線維芽細胞と筋線維芽細胞の初期分泌経路蛋白質の発現量と I 型コラーゲン前駆体の輸送を比較、検討した。その結果、ERES 及びゴルジ体局在蛋白質の一部は、筋線維芽細胞において発現量が有意に増加していた。一方、I 型コラーゲン前駆体の小胞体からゴルジ体への輸送速度は同等であった。I 型コラーゲンの細胞外分泌量は増加していることから、筋線維芽細胞では分泌経路の制御蛋白質の発現量を亢進させることで、その輸送量を増加させていると考えられた。

図 4. ALG-2 近傍蛋白質の同定



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Amemiya Yuna, Nakamura Nao, Ikeda Nao, Sugiyama Risa, Ishii Chiaki, Maki Masatoshi, Shibata Hideki, Takahara Terunao	4. 巻 22
2. 論文標題 Amino Acid-Mediated Intracellular Ca ²⁺ Rise Modulates mTORC1 by Regulating the TSC2-Rheb Axis through Ca ²⁺ /Calmodulin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6897 (pp 1~19)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22136897	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 Inukai Ryuta, Mori Kanako, Kuwata Keiko, Suzuki Chihiro, Maki Masatoshi, Takahara Terunao, Shibata Hideki	4. 巻 22
2. 論文標題 The Novel ALG-2 Target Protein CDIP1 Promotes Cell Death by Interacting with ESCRT-I and VAPA/B	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1175 (pp 1~27)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031175	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 Takahara Terunao, Amemiya Yuna, Sugiyama Risa, Maki Masatoshi, Shibata Hideki	4. 巻 27
2. 論文標題 Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Science	6. 最初と最後の頁 87 (pp 1-16)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12929-020-00679-2	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 Zhang Wei, Muramatsu Ayaka, Matsuo Rina, Teranishi Naoki, Kahara Yui, Takahara Terunao, Shibata Hideki, Maki Masatoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 The Penta-EF-Hand ALG-2 Protein Interacts with the Cytosolic Domain of the SOCE Regulator SARAF and Interferes with Ubiquitination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6315 (pp 1~21)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176315	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 Zhang Wei、Matsuo Rina、Takahara Terunao、Shibata Hideki、Maki Masatoshi	4. 巻 1929
2. 論文標題 High Sensitive Quantitative Binding Assays Using a Nanoluciferase-Fused Probe for Analysis of ALG-2-Interacting Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 501 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9030-6_31	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 Zhang Wei、Takahara Terunao、Achiha Takuya、Shibata Hideki、Maki Masatoshi	4. 巻 1929
2. 論文標題 Cellular Ca ²⁺ -Responding Nanoluciferase Reporter Gene System Directed by Tandemly Repeated Pseudo-palindromic NFAT-Response Elements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9030-6_7	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 Shibata Hideki	4. 巻 83
2. 論文標題 Adaptor functions of the Ca ²⁺ -binding protein ALG-2 in protein transport from the endoplasmic reticulum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 20 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1525274	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 牧 正敏、高原 照直、柴田 秀樹	4. 巻 91
2. 論文標題 カルシウム依存的相互作用因子から探るpenta-EF-handファミリーの機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 191 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910191	査読の有無 無
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 柴田秀樹、高原照直、京卓志、牧正敏	4. 巻 50
2. 論文標題 小胞体からの分子輸送におけるALG-2の役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 441 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤駿、松下明理、桑田啓子、鄭光傑、高原照直、柴田秀樹
2. 発表標題 近接依存性標識法を用いた初期分泌経路制御タンパク質の探索
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原由衣、高原照直、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 ストア作動性カルシウム流入制御因子SARAFの二量体形成におけるALG-2の役割
3. 学会等名 第187回日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下明理、高原照直、桑田啓子、牧正敏、柴田秀樹
2. 発表標題 近接依存性標識法を用いた小胞体の輸送小胞出芽部位に局在するタンパク質の網羅的探索
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同神戸大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田秀樹
2. 発表標題 Ca ²⁺ 結合蛋白質ALG-2の多彩な機能：生体膜を引き込む装置と押し出す装置の調節を中心に
3. 学会等名 農芸化学会中四国支部第29回若手シンポジウム（第11回農芸化学の未来開拓セミナー）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿知波卓也，張維，高原照直，柴田秀樹，牧正敏
2. 発表標題 カルシウム応答性NFATレポーター測定によるTRPチャンネルの機能評価
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下明理，柴田秀樹，桑田啓子，高原照直，牧正敏
2. 発表標題 近接ラベリング手法を用いたコラーゲン分泌制御因子の網羅的探索
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori Kanako, Inukai Ryuta, Takahara Terunao, Maki Masatoshi, Shibata Hideki
2. 発表標題 Adaptor function of a calcium-binding protein ALG-2 in doxorubicin-induced apoptosis
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 犬飼隆太、森可奈子、高原照直、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 DNA傷害誘発性アポトーシスにおけるカルシウムイオン結合タンパク質ALG-2のアポトーシス促進性機能の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺西直樹、村松彩夏、張維、高原照直、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 SARAFとNedd4 ファミリーE3ユビキチンリガーゼとの相互作用解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村松彩夏、張維、寺西直樹、河原由衣、高原照直、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 SARAFのユビキチン修飾におけるALG-2の役割とPPxY配列の関与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院生命農学研究科分子細胞制御学研究室ホームページ
<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~mcr/>

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
研究協力者	牧 正敏 (MAKI Masatoshi)		
研究協力者	高原 照直 (TAKAHARA Terunao)		
研究協力者	桑田 啓子 (KUWATA Keiko)		
研究協力者	張 維 (ZHANG Wei)		
研究協力者	犬飼 隆太 (INUKAI Ryuta)		

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