

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770120

研究課題名（和文） 低分子量G蛋白質と小胞体膜蛋白質の協調による
巨大分子分泌機構の解明研究課題名（英文） Mechanism of large protein secretion coordinated
by the small GTPase and the ER-resident proteins

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

研究成果の概要（和文）：コラーゲンは小胞体で合成された後、さまざまなシャペロンによって折りたたまれ複合体を形成した後に分泌されるが、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ことが知られている。しかしながら、コラーゲン分泌の分子メカニズムはほとんど解明されていない。我々は先にTANGO1を単離し、これがVII型コラーゲンの小胞体からの分泌に必須な因子であることを報告してきた。本若手研究(B)では、新たにER exit siteに局在する蛋白質としてcTAGE5を見出し、これがTANGO1と複合体を形成することにより協調してVII型コラーゲンの小胞体からの出芽を制御することを見出した。

研究成果の概要（英文）： Collagen synthesized in the ER is too big to fit into conventional transport carriers and the mechanism how collagens export from the ER is still largely unclear. Here we show that cTAGE5 localizes to the ER exit sites and forms a complex with TANGO1, a previously characterized cargo receptor for collagen VII. cTAGE5 as well as TANGO1 is required for collagen VII secretion. We propose that cTAGE5 acts as a co-receptor of TANGO1 for collagen VII export from the ER.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：分泌・コラーゲン・小胞体・COPII・癌

1. 研究開始当初の背景

小胞体で合成された蛋白質は、小胞に詰め込まれ細胞内の様々な小器官あるいは細胞外へ輸送される。この小胞輸送に対する研究は、出芽酵母において分泌変異体が網羅的に単

離され、その機能が解析されるに伴い飛躍的に進展した。しかし高等真核生物における研究は、その多様性を反映して、未だ解明されていない課題をいくつか抱えている。その一点は、巨大分子複合体の分泌メカニズムであ

る。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らないため、独自のメカニズムで運ばれると考えられている。

現在までの研究により、巨大分子の輸送にも通常の輸送小胞と同じく COPII 被覆蛋白質が関与することは示唆されているものの、その分子機構は全く不明であった。我々は小胞体において VII 型コラーゲンの分泌を特異的に補助する因子として TANGO1 を同定した。TANGO1 は巨大分子の分泌に特異的に関与する初めての蛋白質であるが、その輸送補助機構の詳細な分子機序は未だ不明である。

2. 研究の目的

本若手研究(B)は、TANGO1 による VII 型コラーゲン輸送の分子メカニズムをさらに解明することで、巨大分子一般の分泌を担う分子機構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 をはじめとした各種因子を siRNA によりノックダウン、あるいは過剰発現した細胞を調製し、各種アッセイをおこなった。細胞内局在を同定するためには、免疫染色法により染色した細胞を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

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 TANGO1 の結合について評価した。

一般的な細胞の分泌については ³⁵S メチオンinによりパルスラベルした細胞の分泌をオートラジオグラフィにより定量することで測定した。

VII 型コラーゲンの分泌は小胞体に蓄積した VII 型コラーゲン量を免疫染色により評価した。

4. 研究成果

(1) cTAGE5 は ER exit site に局在する新規蛋白質である

cTAGE5 は髄膜腫等の各種がん組織において発現が上昇していることが知られている因子であるが、その細胞内局在や機能については不明であった。われわれは cTAGE5 が TANGO1 の C 末端側と相同性が高く、共通のドメインを有していることから、cTAGE5 のコラーゲン輸送に対する影響を検討すべく、まず cTAGE5 に対する抗体を作製し、その細胞内局在を検討した。その結果、cTAGE5 は ER exit site マーカーである Sec31 や TANGO1 等と共局在し、ER exit site に局在する新たな膜蛋白質であることが示唆された。

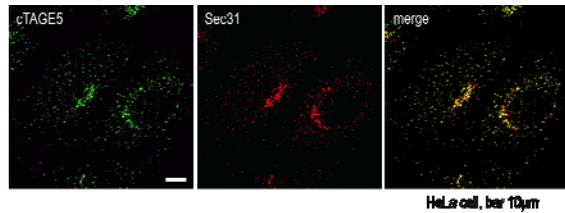


図 1. cTAGE5 は ER exit site に局在する

(2) cTAGE5 は ERGIC およびゴルジ体の構造の維持に必要な蛋白質である

次に cTAGE5 をノックダウンした細胞において、ERGIC およびゴルジ体の各マーカー因子を染色し、各オルガネラの構造に対する影響を観察した。ERGIC-53、GM130 および ManII の染色をおこなったところ、それぞれ未処理の細胞と比べて分散した局在が観察された。よって、cTAGE5 は ERGIC およびゴルジ体の構造維持に必要な蛋白質であり、小胞体からゴルジ体に向けての輸送を担う蛋白質である可能性が示唆された。

(3) cTAGE5 は TANGO1 と結合する

抗 cTAGE5 抗体を用いて HeLa 細胞を免疫沈降した画分を銀染色したところ、cTAGE5 の分子量である約 110kDa の位置に加えて、高分子量側にバンドが検出された。抗 TANGO1 抗体によりウエスタンブロットした結果、これが TANGO1 であることが認められた。また、抗 TANGO1 抗体による免疫沈降画分にも cTAGE5 が存在し、cTAGE5 と TANGO1 は複合体を形成することが示された。次に、cTAGE5 と TANGO1 の結合ドメインを調べるため 293T 細胞に cTAGE5、

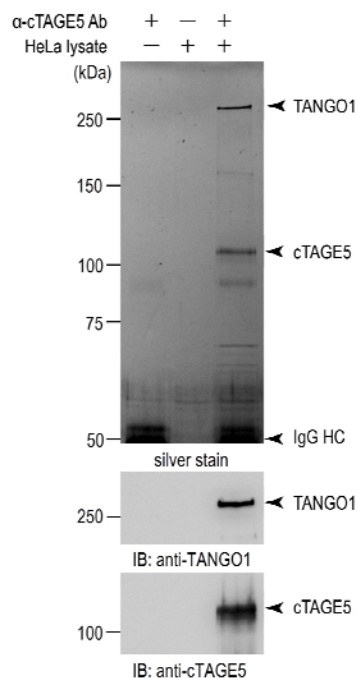


図 2 cTAGE5 と TANGO1 は結合する

TANGO1 両者の各種欠失変異体を発現し、共沈降実験をおこなったところ、cTAGE5、TANGO1 共にコイルドコイル領域で結合することが認められた。さらにリコンビナント蛋白質を用いて結合実験をおこなったところ、同じくコイルドコイル領域で結合したことから、cTAGE5 と TANGO1 はコイルドコイル領域を介して直接結合することが認められた。

(4)cTAGE5 は、VII 型コラーゲンの輸送に必要であるが、通常の蛋白質の分泌には必要ない。

cTAGE5 の分泌に対する関与を検討する目的で、細胞をメチオンパルスラベルし、分泌するタンパク質全体を検出することで評価した。その結果、cTAGE5 のノックダウンによってもほとんどのタンパク質の分泌は変化しなかった。一方、cTAGE5 のノックダウンにより VII 型コラーゲンが小胞体に顕著に蓄積することが観察された。以上のことから、cTAGE5 は 分泌全般には関与しないが、VII 型コラーゲンの小胞体からの輸送に必須であると考えられた。

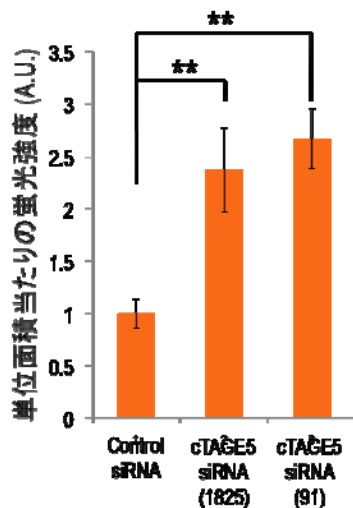


図3 cTAGE5 のノックダウンにより、VII 型コラーゲンが小胞体に蓄積する

(5)まとめ

以上の結果から、ER exit site に局在する蛋白質である cTAGE5 は、TANGO1 とコイルドコイル領域を介して直接結合して複合体を形成する。また cTAGE5/TANGO1 複合体は協調して VII 型コラーゲンの輸送を担っている可能性が示唆された。よって cTAGE5/TANGO1 複合体は VII 型コラーゲンの積み荷受容体として機能する可能性が示唆された。

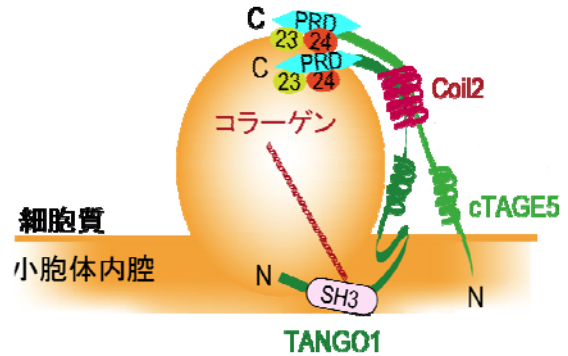


図4 cTAGE5/TANGO1 を介した VII 型コラーゲン分泌モデル

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 2 件)

1. Saito K, Yamashiro K, Ichikawa Y, Erlmann P, Kontani K, Malhotra V, Katada T. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell.* **22**: 2301-2308 (2011)
2. Takahashi S, Sakurai K, Ebihara A, Kajihō H, Saito K, Kontani K, Nishina H, Katada T. RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **39**: 3446-3457 (2011)

[学会発表] (計 6 件)

1. Saito K, Yamashiro K, Ichikawa Y, Erlmann P, Malhotra V, Katada T. cTAGE5 is involved in the endoplasmic reticulum to golgi trafficking in mammalian cells. ASBMB (American Society for Biochemistry and Molecular Biology) Special Symposia, Biochemistry of Membrane Traffic: Secretory and Endocytic Pathways. 口頭発表, 2010 年 10 月 29 日/Tahoe City, USA
2. Kota Saito, Koh Yamashiro, Yuki Ichikawa, Noriko Shimazu, and Toshiaki Katada cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. グローバル COE,口頭発表, 2012 年 2 月 4 日/大磯
3. 齋藤 康太, 山城 昂, 市川 由希, 嶋津 典子, 堅田 利明, 小胞体からのコラーゲン分泌に関与する cTAGE5/TANGO1 複合体の機能解析, ポスター発表, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 日/京都
4. 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「細胞内ロジスティクス」班会議、2011年6月3日／鳥羽

5. 山城 昂、市川 由希、嶋津 典子、堅田 利明、齋藤 康太 cTAGE5 は ER exit site において TANGO1 と協調して VII 型コラーゲンの輸送を補助する ポスター発表、新学術領域「細胞内ロジスティクス」班会議、2011年6月3日／鳥羽

6. 山城 昂、市川 由希、齋藤 康太、堅田 利明. cTAGE5 は ER exit site において TANGO1 と協調して VII 型コラーゲンの輸送を補助する (ポスター発表) 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会;2010年12月7日／神戸

[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