

栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子であるⅦ型コラーゲンの分泌メカニズムの解析

東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室

齋藤 康太

Collagen is synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and secreted to the cell surface via secretory pathway. Collagen is too big to fit into conventional secretory vesicles and the mechanism of collagen exit from the ER has not been elucidated. We have recently identified cTAGE5, a protein localized at the ER exit site, and revealed that it is specifically required for collagen export from the ER. Furthermore, cTAGE5 directly interacts with TANGO1, therefore, we suggest that cTAGE5/TANGO1 complex form a collagen receptor complex within the ER.

1 緒言

小胞体 (Endoplasmic Reticulum ; ER) において合成されたタンパク質は、輸送小胞に積み込まれゴルジ体を経て細胞内の様々な小器官へと運ばれる。この小胞輸送系に着目した研究は、出芽酵母を用いた分泌阻害因子の網羅的なスクリーニングにより数多くの変異体が単離されたことによって飛躍的に進展し、現在までに数多くの構成因子が明らかとなっている。一方で高等真核生物の小胞輸送系は、出芽酵母に比べ分泌するタンパク質が多様であることを反映して、更に多くの制御因子が存在することが考えられる。

申請者は以前、ショウジョウバエ S2 細胞において分泌変異体を単離するため、dsRNA 法を用いた網羅的 RNAi スクリーニングを行なった。その結果、出芽酵母では保存されておらず、高等真核生物においてのみ存在する遺伝子として TANGO1 を単離、同定した (Nature, 2006)。

TANGO1 は小胞体における COPII 被覆小胞出芽ドメインである ER exit site に特異的に局在し、小胞体内腔に配向する SH3 ドメインでⅦ型コラーゲンと、細胞質中に配向するプロリンリッチ領域で COPII 被覆の複合体構成因子の一部である Sec23/24 と結合することが明らかとなった。さらに、TANGO1 を発現抑制した細胞においては、Ⅶ型コラーゲンが小胞体に蓄積し、その分泌が抑制されることを見出した。また、この分泌阻害効果は、Ⅶ型コラーゲンに特異的であり、その他の多くのタンパク質の分泌には大きな影響を及ぼさなかった。以上の結果から、TANGO1 はⅦ型コラーゲンに対する積み荷受容体として機能する可能性が示唆された (Cell, 2009)。

一般に現在までに知られている積み荷受容体は、積み荷と結合し、共に COPII 被覆小胞に取り込まれ出芽することで小胞体からの輸送を制御する。一方で、TANGO1 は出芽することなく、小胞体に留まったままで機能することから、TANGO1 は既存の積み荷受容体とは異なったメカニズムで機能している可能性が考えられた。

コラーゲンはその形成する複合体が巨大であり (Ⅶ型コラーゲンの場合は 400–500nm)、通常の COPII 被覆小胞 (直径 60–90nm) には入りきらないと考えられている。しかし、その分泌の分子メカニズムは解明されていない。そこで、申請者は TANGO1 の制御機構を理解することで、コラーゲン分子分泌の分子機構に迫ることができると考えた。

また、Ⅶ型コラーゲンは栄養障害型表皮水疱症 (DEB) の原因遺伝子である。DEB は難治性疾患に登録されており、未だに根本的治療法は確立されていない。Ⅶ型コラーゲンが小胞体に蓄積し、分泌が阻害されることで、本疾患に罹患する患者の存在も知られていることから、本研究は細胞生物学的知見のみならず、疾患生物学的貢献も期待される。

2 実験

TANGO1 と同様のドメイン構造を有するタンパク質をデータベースから探索し、cTAGE5 を同定した。そこで遺伝子のクローニング、抗体の作製を行ない、細胞内局在をはじめ、細胞内動態の解析を行なった。

さらに cTAGE5 の各種欠失変異体をリコンビナントタンパク質として大腸菌より精製し、生化学的解析を行なうことで結合様式の同定をはかった。また、RNAi 法による発現抑制系を用いることにより、遺伝子の細胞内における機能同定を試みた。

2.1 抗体の作製

抗原部位のペプチドおよび GST-fusion タンパク質を精製し、ウサギに免疫することにより作製した。作製した抗血清はそれぞれ、ペプチド及びタンパク質カラムによりア



The mechanism of collagen VII secretion; Understanding the etiology of dystrophic epidermolysis bullosa (DEB)

Kota Saito

Department of Physiological Chemistry,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
University of Tokyo

フィニティー精製後、実験に用いた。

2. 2 細胞培養及びトランスフェクション

HeLa細胞を始め、各種培養細胞はDMEM, 10%FCSで37℃、5%CO₂で培養した。トランスフェクションはLipofectamine 2000 (Invitrogen) を常法通りに用いた。またsiRNAの導入にはLipofectamine RNAimax (invitrogen) を用いた。

2. 3 結合因子の探索

HeLa細胞を20mM Tris-HCl (pH7.4), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100及びプロテアーゼ阻害剤を含む溶液で可溶化し、65000 rpm 30 min 超遠心した。遠心後の上清にプロテインAビーズに結合させた抗体を添加し、免疫沈降した。その後、ビーズをTBS/0.1% Triton X-100で洗浄後、サンプルバッファーを加えボイルし、SDS-PAGEにより分離した。

3 結果

3. 1 クローニング

データベース検索により、TANGO1と同様のドメイン構造を有するタンパク質としてcTAGE5を単離した。この因子は、SH3ドメインを有していないが、TANGO1のC末端側の配列と相同性を有し、コイルドコイルドメイン及びプロリンリッチ領域を有していた。

3. 2 局在の観察

cTAGE5に対する抗体を作製し、内在性タンパク質の局在を検討したところ、ER exit siteのマーカーであるSec31Aと共局在した。また、ERGIC53との局在を比較した結果、一部で共に局在する様子が観察された。一方、COPI被覆複合体の構成因子の一つであるb-COPとの共染色においては局在の一致は観察されなかった。以上の実験結果より、cTAGE5はER exit siteに局在して機能している可能性が考えられた。

3. 3 cTAGE5 結合因子の探索

次に、cTAGE5に結合するタンパク質を探索する目的で、抗体を用いた免疫沈降画分中の共沈降物の有無を検討した。

HeLa細胞から抗体を用いて内在性タンパク質を免疫沈降し、共沈降画分を銀染色法により検出した。その結果、cTAGE5に相当する110kDaのシグナルに加え約250kDaのシグナルが銀染色により認められた。ウェスタンブロット法による解析の結果、250kDa付近のシグナルはTANGO1であることが判明した。よってcTAGE5にTANGO1が特異的に結合することが明らかになった。

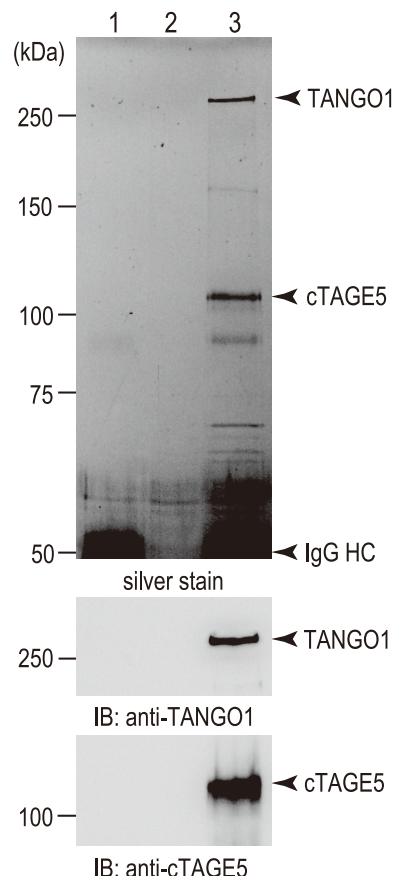


図1 cTAGE5とTANGO1は結合する MBC:22:2301 Protein A ビーズにそれぞれ 1.cTAGE5抗体 2.HeLa lysate 3. cTAGE5抗体 + HeLa lysate を添加し免疫沈降した

3. 4 結合ドメインの同定

TANGO1とcTAGE5の結合ドメインを調べる目的で、各種欠失変異体どうしの結合実験を行なったところ、TANGO1とcTAGE5の結合は、細胞質中に存在するcoiled-coilドメインを介していることが示された。

3. 5 結合因子の同定

またcTAGE5はTANGO1と同様に、C末端にプロリンリッチドメインを有している。TANGO1はプロリンリッチドメインを介してSec23/24と結合することが認められていることから、cTAGE5についても同様の検討を行った。Yeast two hybrid 法を用いた解析の結果、cTAGE5も同様にCOPII被覆複合体の構成因子であるSec23/24と結合する事が明らかとなった。

3. 6 コラーゲン分泌に対する影響

最後にcTAGE5の分泌に対する影響をノックダウン法によって検討した。その結果、ノックダウンは多くのタンパク質の分泌には影響を与えないのに対し、TANGO1と同様にⅦ型コラーゲンの分泌を顕著に阻害することが明らかとなった。

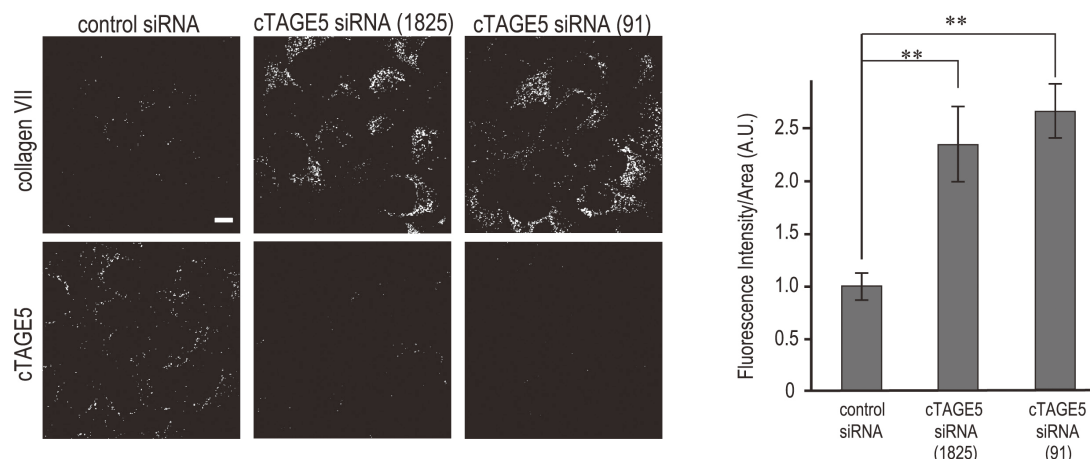


図2 ノックダウン時のⅦ型コラーゲンの小胞体蓄積量
ノックダウンにより、有意にⅦ型コラーゲンが小胞体に蓄積した。 MBC:22:2301

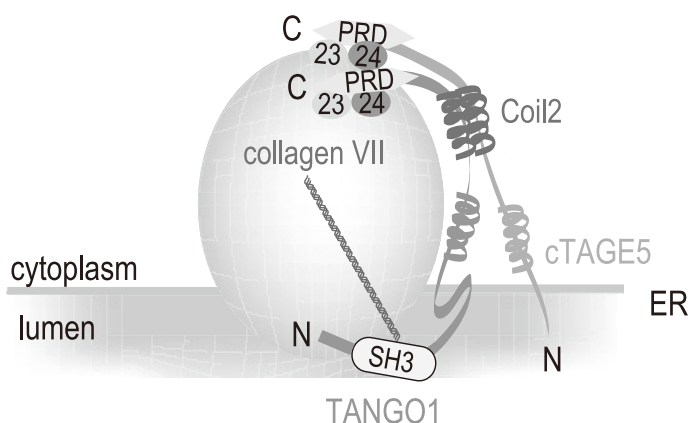


図3 TANGO1,新規因子の協調によるⅦ型コラーゲン詰め込みモデル MBC:22:2301

4 考 察

以上のように、今回単離した新規因子cTAGE5はER exit siteに局在し、TANGO1と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、cTAGE5のノックダウンは、TANGO1のノックダウンと同様にⅦ型コラーゲンの分泌を特異的に抑制した。以上の結果から、申請者は、cTAGE5がTANGO1と協調して小胞体からのⅦ型コラーゲンの分泌を特異的に制御していると考え（図3参照）。cTAGE5は、小胞体内腔側にはほとんど配向しておらず、Ⅶ型コラーゲンとの結合は主にTANGO1によって担われていることが考えられる。つまり、cTAGE5はTANGO1の補助因子あるいは制御因子として働く可能性が考えられる。

今後、どのような分子メカニズムによって、TANGO1とcTAGE5が協調的にⅦ型コラーゲンの分泌を担っているのかを解明していくことが課題である。

5 総 括

本研究により、コラーゲン分子の積み荷受容体として新たにTANGO1とcTAGE5が協調的に作用することが見出された。

現在のコスメトロジーにおいては、コラーゲンは化粧品構成要素として注目されている。本研究をさらに発展させ、コラーゲン分子の分泌機構を明らかにすることができれば、コラーゲン分泌を制御することが可能になると考える。これにより、内在するコラーゲンの分泌を促進するような化粧品あるいは薬剤の作成に将来的に寄与できると考える。

謝 辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助賜りましたことを深く感謝申し上げます。

(発表論文、参考文献)

- 1) Frederic Bard, Laetitia Casano, Arrate Mallabiarrena, Erin Wallace, Kota Saito, Hitoshi Kitayama, Gianni Guizzunti, Yue Hu, Franz Wendler, Ramanuj DasGupta, Norbert Perrimon and Vivek Malhotra (2006) Functional genomics reveals novel components involved in protein secretion and Golgi organization. *Nature*, 439, 604-7.
- 2) Kota Saito, Mei Chen, Fred Bard, Shenghong Chen, Huilin Zhou, David Woodley, Roman Polischuk, Randy Schekman, Vivek Malhotra (2009) TANGO1 facilitates cargo loading at Endoplasmic Reticulum exit sites. *Cell*, 136, 891-902
- 3) Yoko Nagail, Yoichi Asaoka, Misako Namae, Kota Saito, Haruka Momose, Hiroshi Mitani, Makoto Furutani-Seiki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 887-893 (IContributed equally).
- 4) Shinya Takahashi, Kyoko Sakurai, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajiho, Kota Saito, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res.* Apr;39(8):3446-57.
- 5) Kota Saito, Koh Yamashiro, Yuki Ichikawa, Patrik Erkmann, Kenji Kontani, Vivek Malhotra and Toshiaki Katada (2011) cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* Jul 1;22(13):2301-8