

概日リズムによるコラーゲン分泌制御機構の解析

秋田大学大学院医学系研究科

齋藤 康太

Proteins synthesized within the ER is exported via COPII-coated vesicles to the Golgi for secretion. We have found that TANGO1 is not only collagen cargo receptor at ER exit sites but it organizes the formation of ER exit site via interacting with Sec16. In this analysis, we have found that TANGO1 is phosphorylated by casein kinase 1 and dephosphorylated by PP1 in a cell-cycle dependent manner and the phosphorylation regulates the organization of ER exit sites. CK1 activity is involved in the regulation of circadian rhythm, so that our analysis would lead to the future investigation on the regulation of collagen secretion with circadian rhythm.

1. 緒言

受容体の脱感作をはじめ、シグナルによるエンドサイトーシス経路の制御については盛んに研究が行われている。一方で全タンパク質の約3割が関与する小胞体からの分泌に関しては、シグナルによる制御機構はほとんどわかっていない(図1)。分泌は、細胞内で合成されたタンパク質が細胞外や細胞表面に出るまでの一連の過程である。インスリンなどのペプチドホルモンや、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスなど、生体内の多くの因子は分泌されて機能する。これらのタンパク質は、小胞体内で合成された後、ゴルジ体へ輸送され、トランスゴルジ網を經由して最終的に細胞膜表面へ到達する(図1)。

これまでわれわれは、分泌経路の初期段階である小胞体-ゴルジ体間のタンパク質輸送に着目してきた。小胞体からゴルジ体へ分泌タンパク質を輸送するCOPII小胞は、小胞体上の特殊な領域である“ER exit site”で形成される。ER exit siteにはCOPII小胞の被覆因子であるSec23/24複合体、Sec13/31複合体がSec16依存的に集積している¹⁾。われわれはこれまで、高等真核生物のER exit siteに局在する新規因子Transport and Golgi organization 1 (TANGO1)の機能解析を行ってきた。TANGO1はショウジョウバエ由来のS2細胞を用いた分泌スクリーニングによって単離された膜貫通型タンパク質である²⁾。われわれはTANGO1がER exit siteにおいて、コラーゲンの積荷受容体として機能することを見出した³⁾。さらにTANGO1がcTAGE5と共受容体として機能することを

明らかにした⁴⁾。また、cTAGE5に低分子量Gタンパク質Sar1の活性化因子であるSec12が結合することで、ER exit siteにおけるSar1の効率的な活性化を介し、ER exit siteからのコラーゲンの分泌を担っていることを見出した(図2)⁵⁻⁷⁾。続いて脊椎動物においてTANGO1に長鎖

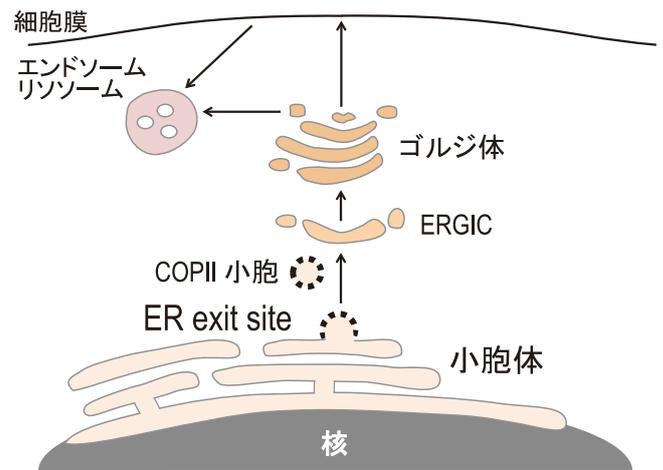


図1 細胞内分泌経路

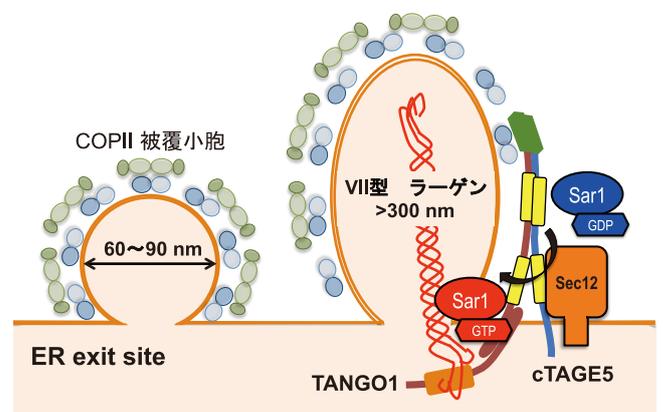


図2 cTAGE5/TANGO1/Sec12複合体によるVII型コラーゲン分泌モデル



Mechanisms of collagen secretion regulated by circadian rhythm

Kota Saito

Akita University, Graduate School of Medicine

(TANGO1L)と短鎖(TANGO1S)の2つのアイソフォームが存在することを明らかにし、両者がSec16と結合することで、協調してER exit siteの場を決定するオーガナイザーとしての役割を有することを明らかにしてきた^{8,9)}。またER exit siteを超解像顕微鏡により観察することにより、ER exit siteの構成因子がドメインを形成して存在することを明らかにした¹⁰⁾。

最近われわれはCK1 δ , ϵ による TANGO1 のリン酸化によって、ER exit site が崩壊することを見出した。CK1 δ , ϵ は概日リズムの制御に関与し、CK1 δ , ϵ を阻害したマウスでは概日リズムが障害されることが明らかになっている。以上のことは、TANGO1によるコラーゲン分泌がCK1 δ , ϵ によって制御されている可能性を強く示唆している。事実、最近コラーゲンの分泌が概日リズムによって制御されている可能性が見出されつつあるが、分子メカニズムの全貌は未解明であった。

2. 方 法

2. 1. 免疫染色

冷メタノール固定した細胞を5% BSA/PBS/0.1% Triton X-100にてブロッキング後、一次抗体およびAlexa Fluor標識した二次抗体によって染色した。核染色には DAPIを用いた。観察は共焦点顕微鏡 LSM700 (Zeiss)によって行った。

2. 2. *in vitro* キナーゼアッセイ

GST-TANGO1 PRDリコンビナントタンパク質にCK1 δ (1-351 aa.)を添加し、20mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、0.1% Triton X-100、2mM MgCl₂、25 mM [γ -32P] ATP 水溶液中で30℃、1時間反応させた。リン酸化反応はLaemmler Sample bufferと混合し加熱することで停止させた。SDS-PAGE後、オートラジオグラフィーにてリン酸化を検出した。

2. 3. 免疫沈降実験およびウエスタンブロット

293T細胞へのトランスフェクションはPEIを用いた。20mM Tris-HCl (pH7.4)、100mM NaCl、1mM EDTA、1% TritonX-100およびプロテアーゼ阻害剤によって破碎した細胞を15,000rpm、15min遠心した上清を細胞抽出液とし、抗FLAG抗体による免疫沈降した。TBS/0.1% TritonX-100で5回洗浄後、0.2mg/ml FLAGペプチドによって溶出した。サンプルはLaemmler Sample bufferと混合し、5分間煮沸後、SDS-PAGEし、PVDF膜に転写後、各抗体によってウエスタンブロットを行った。二次抗体はHRP標識されているものを用い、ルミノール・ペルオキシド基質を用いLAS4000 mini (cytiva)によって検出した。

2. 4. 細胞周期の同調

細胞周期の同調は、ダブルチミジン法あるいはノコダゾール法を適宜用いた。

3. 結 果

3. 1. TANGO1のPPS領域におけるリン酸化修飾はTANGO1とSec16の結合親和性を減弱させ、ER exit siteを崩壊させる

TANGO1の各アミノ酸残基におけるタンパク質修飾について、PhosphositePlusを用いて調べた結果、TANGO1の細胞質側領域の一部にリン酸化報告が多数存在する残基を見出した。この領域(TANGO1L:1651-1750, TANGO1S:529-628 aa.)をphosphorylation predicted sequences(PPS)と命名し、種間保存性を調べた結果、PPS領域内の配列は他の領域に比較して種間保存性が高いことが明らかになった。またPPSはSec16とTANGO1の相互作用領域であるSIR (Sec16 Interaction Region)の近傍に存在した。

次に、TANGO1SのPPS内に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との結合について検討した。その結果、SE変異体においては、野生型TANGO1Sに比べSec16との結合が減弱していた一方で、SA変異体は野生型よりも結合が増強していた。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ことが明らかになった。

次に、内在のTANGO1LおよびTANGO1Sを発現抑制した細胞に、TANGO1S各変異体をそれぞれ発現させER exit siteの形成能を評価した。TANGO1LおよびTANGO1Sを発現抑制した細胞においては、以前報告したようにSec16とSec31が一部乖離して存在するが、野生型TANGO1SやSA変異体を発現した細胞においてはSec16, Sec31の共局在が回復した。一方でSE変異体を発現した細胞においては、Sec16とSec31は一部乖離したままとなった。また、SE変異体を発現する細胞では小胞体からのVSVGの輸送が遅延していた。以上の結果から、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の崩壊と分泌の阻害が生じることを示唆している。

3. 2. CK1 δ 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。先行知見としてCK1 δ 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、CK1 δ がTANGO1を直接リン酸化するかを γ -³²P-ATPを用いた*in vitro*の評価系で検証した。TANGO1はPPS領

域を含むC末端 257 アミノ酸領域部分をリコンビナントとして調製し、CK1 δ は自己リン酸化による活性減弱を防ぐため、触媒ドメイン部分のリコンビナントを調製して用いた。結果、TANGO1はCK1 δ 存在下でリン酸化されたが、TANGO1のSA変異を含むリコンビナントにおいて ^{32}P はほとんど検出されなかった。以上の結果より、CK1 δ 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。

さらに、CK1 δ がER exit siteの構成や形態に与える影響を評価した。CK1 δ を過剰発現させた細胞ではSec16とSec31は乖離し、TANGO1S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。また、CK1 δ の阻害剤であるIC261を添加した細胞およびCK1 δ およびCK1 ϵ をノックダウンした細胞において、ER exit siteは肥大化していた(図3)。以上の結果より、CK1 δ がキナーゼ活性によりER exit siteの形態に影響を与え得ることが明らかになった。

3.3. TANGO1はPP1によって脱リン酸化される

H61株の抗酸化作用がどのような生体経路を介するかを調べるために、H61株処理により発現変動する遺伝子群をRNA-seq法で探索した。浮かび上がった遺伝子群を用いてパスウェイ解析を行ったところ、ミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子群の多くが発現亢進していた。検証のために、いくつかのミトコンドリアタンパク質遺伝子に対してqPCR解析を行ったところ、弱いながらもH61株により発現誘導される傾向があることがわかり(図3)、ミトコンドリア生合成が亢進している可能性を示唆された。

3.4. 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

細胞分裂期において、分泌の停止に伴ってER exit siteも崩壊し、Sec16とSec31は分裂前期から後期にかけて局在が乖離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だった。Sec16とSec31の乖離はTANGO1のリン酸化模倣変異体発現時や、CK1 δ の過剰発現時、PP1の活性抑制時においても観察されたこと、PP1は細胞分裂期に一時的に活性低下することから、我々は細胞分裂期においてTANGO1のPPS領域におけるリン酸化が亢進し、Sec16との結合が外れることがER exit siteの崩壊の契機となる仮説を考え、その検証を行った。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、nocodazoleで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、一方でTANGO1S SA変異体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での細胞分裂期におけるER exit siteの様子を観察した。野生型TANGO1Sを発現する細胞では、親株のHeLa細胞と同様に、分裂中期においてSec16/Sec31の局在が乖離していた。一方、TANGO1S SA変異体を発現する細胞では、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。

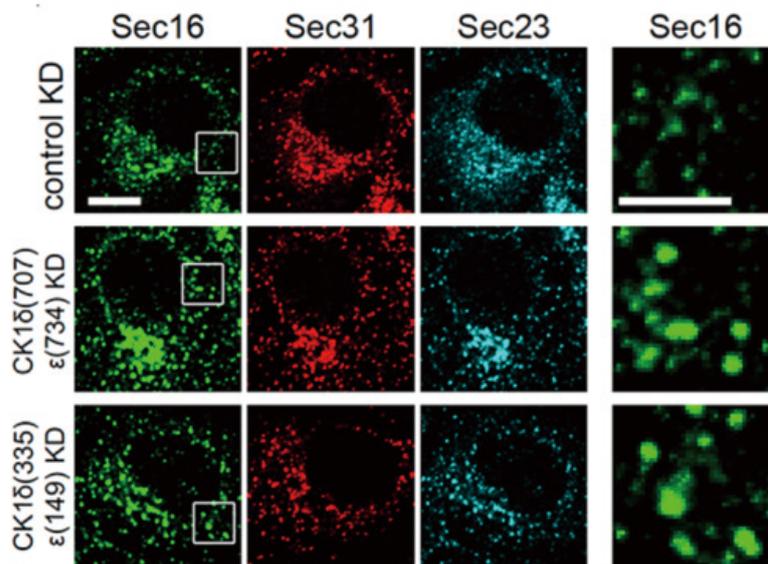


図3 CK1 δ/ϵ のノックダウンによりER exit siteが肥大化する

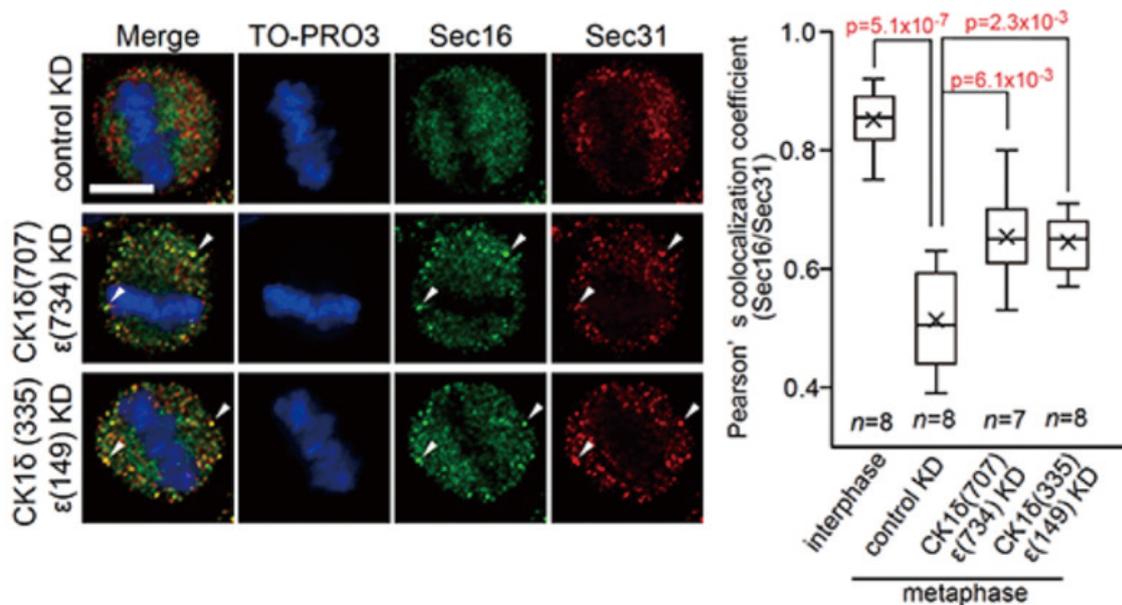


図4 CK1δ,εは細胞分裂中期におけるER exit siteの崩壊に重要である
CK1δおよびCK1εをノックダウンした細胞をダブルチミジン法により同調させた後、細胞分裂期の細胞を免疫染色した(スケールバー:10μm)。箱ひげ図はSec16/Sec31の細胞ごとの共局在率を示す。

さらに、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にCK1δが関与する可能性を検討するため、CK1δ/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、CK1δ/εを発現抑制した細胞においてはSec16とSec31が共局在する点が認められた(図4)。以上の結果から、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊はCK1δ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。

4. 考察

本研究により、TANGO1のPPS領域をCK1δ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。CK1δ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、CK1δ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^{11,12)}。

また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。特にCK1δ, εは概日リズムの制御に関与し、CK1δ, εを阻害したマウスでは概日リズムが障害されることが明らかになっている。よって概日

リズムに応じたTANGO1のリン酸化状態等を検証していくことにより、今後、さらにER exit siteのシグナルによる形成制御機構を明らかにすることができると考える。

(引用文献)

- 1) Saito, K.* and Katada, T. Mechanisms for exporting large-sized cargoes from the endoplasmic reticulum. *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (19), 3709-20. (2015)
- 2) Bard, F., Casano, L., Mallabiabarrena, A., Wallace, E., Saito, K., Kitayama, H., Guizzunti, G., Hu, Y., Wendler, F., Dasgupta, R., Perrimon, N. and Malhotra, V. Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization. *Nature*, 439, 604-7. (2006)
- 3) Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S., Zhou, H., Woodley, D., Polischuk, R., Schekman, R. and Malhotra, V. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell*, 136, 891-902. (2009)
- 4) Saito, K., Yamashiro, K., Ichikawa, Y., Erlmann, P., Kontani, K., Malhotra, V. and Katada, T. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell*, 22, 2301-8. (2011)
- 5) 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)
- 6) Tanabe, T., Maeda, M., Saito, K., and Katada, T.

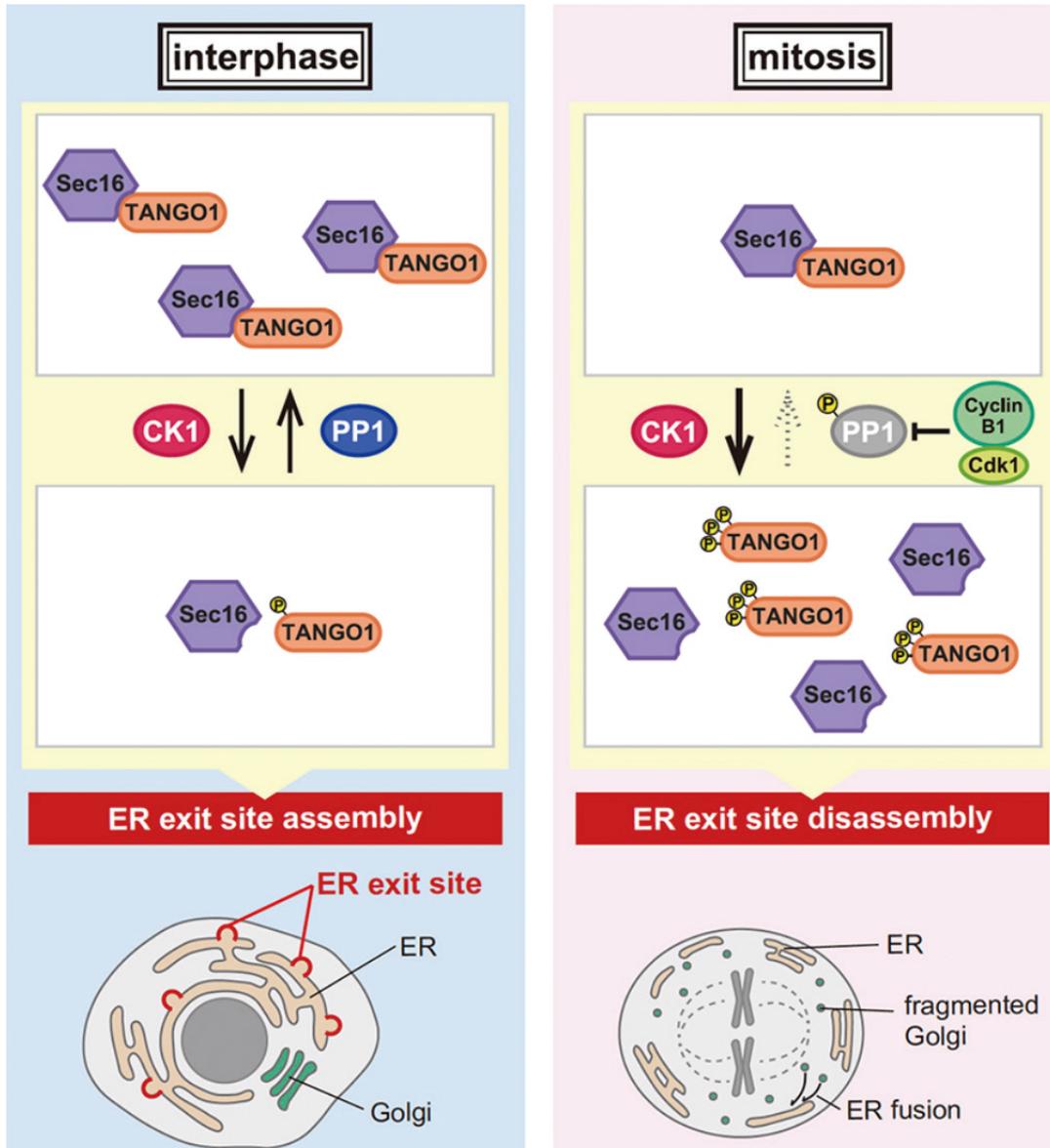


図5 細胞分裂期における ER exit site の形成と崩壊の分子メカニズム

- Dual function of cTAGE5 in collagen export from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, 27, 2008-13 (2016)
- 7) [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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) Maeda, M., Kurokawa, K., Katada, T., Nakano, A. and [Saito, K.*](#) COPII proteins exhibit distinct subdomains within each ER exit site for executing their functions. *Sci. Rep.*, 9, 7346 (2019)
- 11) [Maeda M.](#), Komatsu Y. and Saito K. "Mitotic ER exit site dynamics: Insights into blockade of secretion from the ER during mitosis." *Mol. Cell. Oncol.*, 7 (6), 1832420 (2020)
- 12) [Maeda M.](#), Komatsu, Y. and [Saito, K.](#) Mitotic ER Exit Site Disassembly and Reassembly Are Regulated by the Phosphorylation Status of TANGO1. *Dev. Cell*, 55, 237-250, 1731-43 (2020)