

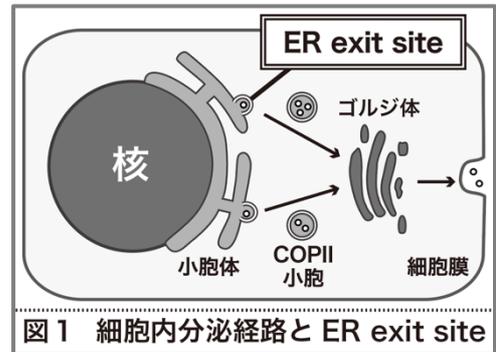
論文の内容の要旨

論文題目 小胞体からの分泌ドメインである ER exit site の形成機構

氏名 前田 深春

【序論】

小胞体で合成された分泌タンパク質は、小胞体上のドメインである「ER exit site」において形成される COPII 小胞によってゴルジ体へ輸送され、最終的に細胞外へ分泌される(図 1)。近年、ER exit site は細胞外環境に応じてその構成因子や形態を変化させることで、小胞体からの分泌を調節することが明らかになった。特に細胞分裂期において、ER exit site は分泌の一時的な停止に伴って崩壊し、分裂終期に再形成される。しかし、ER exit site の形成機構に関しては知見が乏しく、その調節メカニズムも不明だった。



【結果】

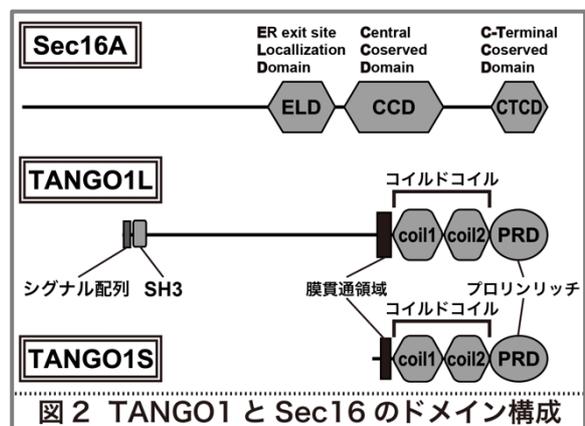
1. TANGO1L/TANGO1S は ER exit site の形成と小胞体からの分泌全般に関与する

TANGO1L は ER exit site に局在する膜貫通型タンパク質である。TANGO1L は小胞体内腔側領域で巨大分子コラーゲンと、細胞質側で COPII 小胞被覆因子とそれぞれ結合することで、コラーゲンの分泌を補助する因子として単離された。その後スプライシングバリエーションとして、小胞体内腔側領域をほとんど有さない短鎖アイソフォーム TANGO1S が発現していることが明らかになった。

これら 2 つの TANGO1 アイソフォームを同時に発現抑制した細胞では、コラーゲンだけでなく一般的な大きさのタンパク質についても分泌遅延が認められた。さらに本来 ER exit site を構成する COPII 小胞被覆因子の局在が解離していた。

2. TANGO1 と Sec16 の結合が ER exit site の形成に必要なものである

COPII 因子の局在には ER exit site における足場タンパク質である Sec16 が関与することが報告されていた。そこで TANGO1 との関係性を検討したところ、Sec16 は TANGO1L および TANGO1S のどちらとも相互作用した。さらに結合ドメインを限定した結果、TANGO1 のプロリンリッチ領域 (PRD) の C 末端 120 アミノ酸と Sec16 の ELD 領域が結合することが明らかになった(図 2)。Sec16 の ELD 領域は Sec16 自身が ER exit site に局在するために必要なドメインとして単離された領域 (ER exit site Localization Domain) である。

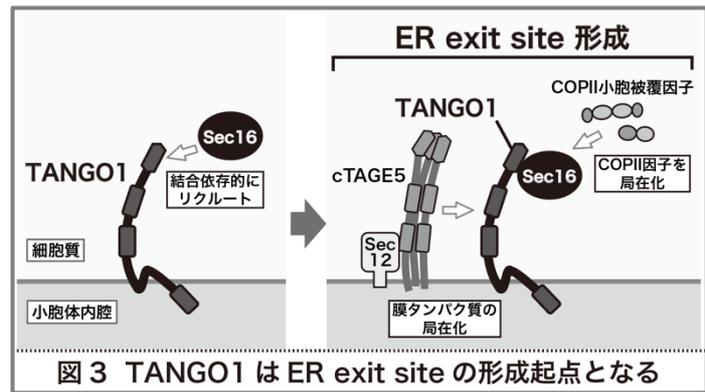


次に内在 TANGO1 を発現抑制した細胞に対して、野生型 TANGO1S、あるいは C 末端 120 アミノ酸を欠く TANGO1S 変異体(Δ 120 変異体)を発現させるレスキュー実験を行った。TANGO1 を発現抑制した細胞では Sec16 と COPII 小胞被覆因子(Sec31)が解離して存在したが、野生型 TANGO1S を発現する細胞では、Sec16 と Sec31 の共局在率が無処理の細胞と同程度に回復した。一方で Δ 120 変異体を発現させた細胞では依然として Sec16 と Sec31 の局在が解離していた。以上の結果は TANGO1 と Sec16 の間の結合が、COPII 被覆因子の ER exit site における局在化に必要であることを示唆している。

3. TANGO1 は ER exit site の形成起点として機能する

さらに TANGO1 と Sec16 の結合の意義を明らかにする目的で FKBP タグを付与した TANGO1 PRD、および FRAP-Tomm20(ミトコンドリア局在タンパク質)を培養細胞に共発現させ、ラパマイシン添加依存的に TANGO1 PRD をミトコンドリア上に異所性局在化させる実験を行った。その結果、内在の Sec16 も TANGO1 PRD に伴ってミトコンドリア上に局在化した。一方で Sec16 と結合しない TANGO1 PRD Δ 120 変異体を用いた場合には、ラパマイシン存在下でも Sec16 はミトコンドリアに局在化しなかった。この結果は、Sec16 が TANGO1 との結合依存的にオルガネラ膜上にリクルートされることを示している。また Sec31 でも同様の結果が得られたことから、COPII 小胞被覆因子は TANGO1 と Sec16 が結合する場に

局在化することが明らかになった。
さらに ER exit site に局在する膜タンパク質である cTAGE5 および Sec12 の局在も TANGO1 によって制御されることが明らかになった。以上の結果は TANGO1 が ER exit site の形成起点となることを示唆している(図 3)。



4. CK1 δ は TANGO1 の PPS 領域をリン酸化し、ER exit site 構成因子を解離させる

カゼインキナーゼ 1 δ (CK1 δ)は小胞体からの輸送制御に関与することが報告されているキナーゼであるが、その詳細な機能は不明であった。タンパク質修飾リソースより、TANGO1 の PRD 近傍に多数のリン酸化が予測される領域 (PPS 領域) を見出したため、この修飾に対する CK1 δ の関与を検討した。その結果 TANGO1 の PPS 領域が CK1 δ によって直接リン酸化されることが明らかになった。

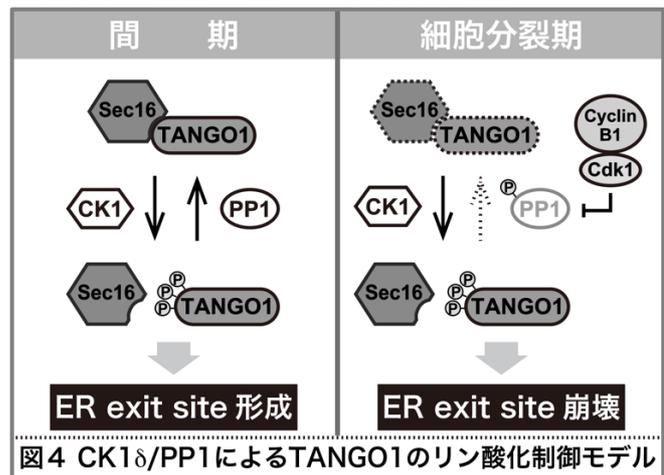
次に TANGO1S の PPS 領域にグルタミン酸を置換したリン酸化模倣変異体(SE 変異体)、およびアラニンを置換した非リン酸化模倣変異体(SA 変異体)を作出し、その表現型を観察した。SE 変異体は、野生型 TANGO1S や SA 変異体と比較して Sec16 との結合親和性が低下していた。また SE 変異体を発現する細胞では、ER exit site の構成因子が解離しており、小胞体からの分泌も遅延していた。これらの結果は CK1 δ が TANGO1 の PPS 領域をリン酸化することで、ER exit site の崩壊と分泌遅延が生じることを示している。

5. CK1δによる TANGO1 のリン酸化は、細胞分裂期における ER exit site の崩壊に必要である

以前より、細胞分裂期に小胞体からの輸送が停止し、同時に ER exit site の構成因子も解離することが知られていた。そこで、細胞分裂期の ER exit site 崩壊に TANGO1 のリン酸化が関与する可能性を検討した。ノコダゾール処理により細胞分裂期に同調させた細胞では、TANGO1 のリン酸化が亢進していた。また TANGO1S SA 変異体を発現する細胞では、細胞分裂期における ER exit site の崩壊が抑制された。同様の表現型は CK1δ を発現抑制した細胞でも認められた。したがって、CK1δ による TANGO1 の PPS 領域のリン酸化が細胞分裂期における ER exit site の解離に必要であることが明らかになった。

6. プロテインホスファターゼ 1 (PP1) が TANGO1 を脱リン酸化する

しかしながら、CK1δ のキナーゼ活性は細胞周期を通して変化しないため、分裂期特異的な TANGO1 のリン酸化は説明できない。そこで TANGO1 の脱リン酸化過程に着目し、種々のホスファターゼ阻害剤を用いて検討を行った。その結果、プロテインホスファターゼ 1 (PP1) およびプロテインホスファターゼ 2A の阻害剤であるオカダ酸を添加した際に、TANGO1 のリン酸化亢進と ER exit site 構成因子の解離を認めた。同じ表現型は PP1 の触媒活性サブユニットの発現抑制でも見られたことから、TANGO1 は PP1 によって脱リン酸化されることが示された。PP1 は細胞分裂期に Cdk1/CyclinB1 複合体によってリン酸化され、活性が低下する。以上の結果は、PP1 と CK1δ が細胞周期依存的に TANGO1 のリン酸化状態を調節することで、細胞分裂期における ER exit site の崩壊と再形成が制御されている可能性を示唆する (図 4)。



【考察】

進化的保存性からみた ER exit site 構成の生理的意義

以上の結果から TANGO1 が ER exit site の形成起点であり、細胞分裂期における ER exit site 崩壊と再形成の主要因子であることが明らかになった。これまで ER exit site の形成には Sec16 が必要であることが報告されていたが、膜貫通領域を有さない Sec16 がどのようにして小胞体膜を認識し、ER exit site の場所を規定するかは不明だった。本研究によりはじめて Sec16 の局在化に膜タンパク質である TANGO1 が必要であることが明らかになった。一方で TANGO1 ファミリーが存在しない出芽酵母では、Sec16 は Sec23 などの COPII 小胞被覆因子依存的に局在化することが報告されており、脊椎動物とは別の機構で ER exit site が形成される可能性が考えられる。

また TANGO1 ファミリーの有無は、各生物種の ER exit site における Sar1 の活性化効率に反映される。Sar1 は COPII 小胞の形成を制御する低分子量 G タンパク質であり、Sec12 によって活性化される。出芽酵母では Sec12 は小胞体膜上に拡散して存在するが、脊椎動物では Sec16 と Sec12 の間に TANGO1, cTAGE5 が介在することで、Sec12 をより効率的に ER exit site に集積させることが可能になる (図 5)。我々は以前に ER exit site 近傍での Sar1 の効率的な活性化がコラーゲンのような巨大分子の輸送に必要であることを見出している。したがって TANGO1 ファミリーを中心とした ER exit site の構成は、脊椎動物が多様なタンパク質を小胞体から輸送するために獲得した機構の一つであると考えられる。

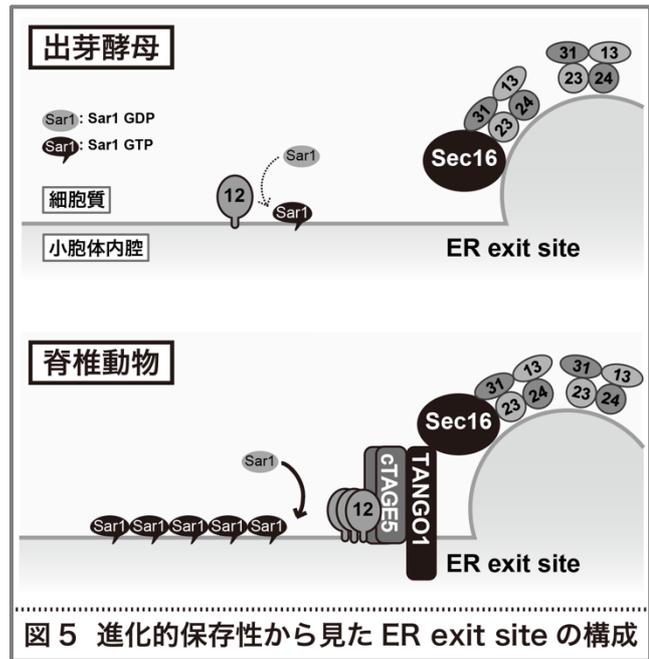


図 5 進化的保存性から見た ER exit site の構成

分泌の調節点としての ER exit site

本研究により、TANGO1 のリン酸化修飾が細胞分裂期における ER exit site の崩壊に必要であることが明らかになった。細胞周期以外にも、ER exit site は小胞体ストレスや栄養飢餓条件下で形態を変化させ、分泌を調節する。今後は、これらの様々なストレスシグナル経路と分泌との関係性についても検討していきたい。