

# 博士論文 (要約)

小胞体からの分泌ドメインである  
ER exit siteの形成機構

前 田 深 春

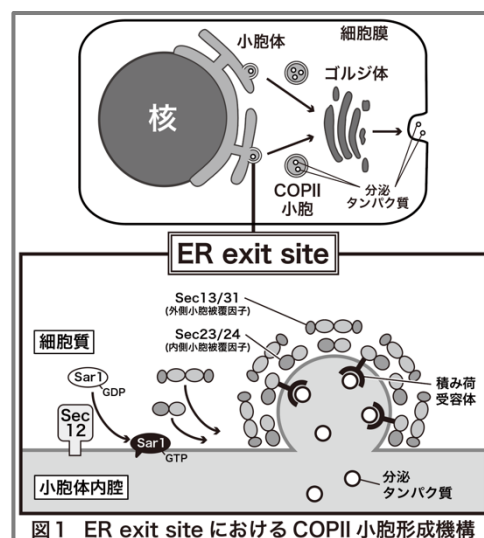
## 【概要】

分泌は小胞体で合成されたタンパク質がゴルジ体を経由し、細胞外へ運ばれる過程であり、細胞分裂期には停止する。この際、分泌の出発点である小胞体上のドメイン「ER exit site」も一時的に崩壊するが、分子メカニズムは不明であった。

私はこれまで、巨大分子コラーゲンの積み荷受容体である TANGO1 に、コラーゲン認識部位をもたない短鎖アイソフォーム TANGO1S が存在することを明らかにしてきた。本研究において私は、TANGO1L の2つのアイソフォームが ER exit site の形成起点として機能することを見出し、TANGO1 がコラーゲン分泌のみならず、小胞体からの輸送全般に関与することを明らかにした。さらに TANGO1 の細胞周期依存的なリン酸化制御によって、細胞分裂期における ER exit site の崩壊と再形成が担われていることを明らかにした。

## 【序論】

小胞体で合成された分泌タンパク質は、被覆に包まれた小胞 (COPII 小胞) に詰め込まれ、ゴルジ体を経由し、細胞外へ輸送される。COPII 小胞は、小胞体上のドメインである「ER exit site」において形成される(図1 上部)。低分子量 G タンパク質 Sar1 が、その活性化因子である Sec12 によって活性化され小胞体膜に結合すると、内側被覆因子 Sec23/Sec24 および外側被覆因子 Sec13/31 が膜上にリクルートされ、COPII 小胞が形成される。この際、分泌タンパク質は積み荷受容体を介して Sec23/Sec24 と結合することで COPII 小胞内に積み込まれる(図1 下部)。



細胞分裂期に小胞体からの分泌が一時的に停止することは、かなり以前から知られていた (Warren et al., JCB, 1983)。ゴルジ体は分裂期に断片化することで、均等に娘細胞に分配されることが明らかになっており、その分子機構は詳細に解析されてきた (Sutterlin et al., Cell, 2002)。ER exit site も分泌停止に伴って構成因子が一時的に解離することが報告されている (Hughes and Stephens, JCS, 2010)。しかし、ER exit site の崩壊に至る分子機構は全くわかっていなかった。

これまで私は、小胞体上のコラーゲン積み荷受容体である TANGO1 の機能解析を行ってきた。TANGO1 は ER exit site に局在する膜タンパク質であり、細胞質側ドメインにおいて Sec23/Sec24 と、小胞体内腔側ドメインにおいてコラーゲンと、それぞれ相互作用することで、コラーゲンを COPII 依存的な機構で分泌することが知られていた (Saito et al., Cell, 2009)。私はこれまで、TANGO1 が cTAGE5 および Sec12 と約 900 kDa にも及ぶ巨大複合体として存在することを明らかにしてきた (Maeda et al., MBoC, 2016) (図2)。

さらに私は、TANGO1 に短鎖アイソフォームである TANGO1S が存在することを見出し、TANGO1S も cTAGE5, Sec12 と共に 700 kDa の複合体として存在することを見出した (Maeda et al., MBoC, 2016) (図 2)。しかし TANGO1S はコラーゲン認識に必要な小胞体内腔ドメインをもたず、TANGO1S の細胞内機能は未知であった。

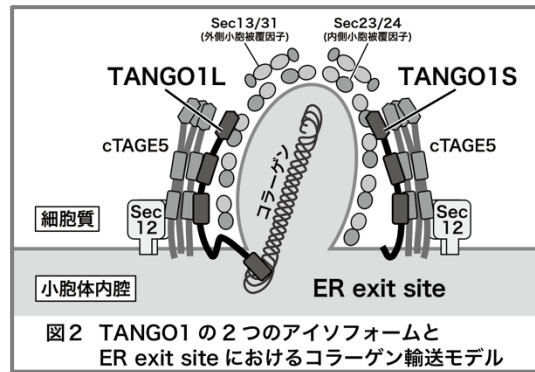


図2 TANGO1 の 2 つのアイソフォームと ER exit site におけるコラーゲン輸送モデル

## 【結果】

### 1. TANGO1 は ER exit site の形成に必要であり、小胞体からの分泌全般に関与する

TANGO1 の両アイソフォームの機能を明らかにする目的で、HeLa 細胞において TANGO1S と TANGO1L (以下、長鎖アイソフォームを TANGO1L とする)の両者を siRNA により発現抑制した。TANGO1 両アイソフォームを発現抑制した細胞では、分泌モデルタンパク質である VSVG ts045-GFP の小胞体からの分泌が遅延していた。さらに本来 ER exit site で機能する COPII タンパク質が、一部解離して存在していた。これらの結果は、TANGO1 が COPII タンパク質を正しく ER exit site に局在化させるために必須であり、TANGO1 がコラーゲンのみならず一般的な積み荷タンパク質の分泌にも関与することを示唆している。

### 2. TANGO1 と Sec16 の結合が ER exit site の形成に必要である

TANGO1 が COPII タンパク質の局在を制御するメカニズムを明らかにするため、ER exit site の構成因子と TANGO1 との結合実験を行った。その結果、TANGO1 の両アイソフォームは Sec16 と相互作用することが明らかになった。Sec16 は ER exit site で様々な COPII タンパク質と結合することで、ER exit site における足場タンパク質として機能することが知られている (Watson et al., Traffic, 2006)。Sec16 と TANGO1 の結合ドメインをそれぞれ検討したところ、TANGO1 の C 末端に存在するプロリンリッチ領域 (PRD) と Sec16 の ELD 領域が両者の結合に関与することが明らかになった (図 3)。興味深いことに、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、先に単離された領域 (ER exit site Localization Domain)であった。さらにリコンビナントタンパク質を用いたプルダウン実験により、TANGO1 PRD の C 末端 120 アミノ酸が Sec16 の ELD と直接結合することが明らかになった。

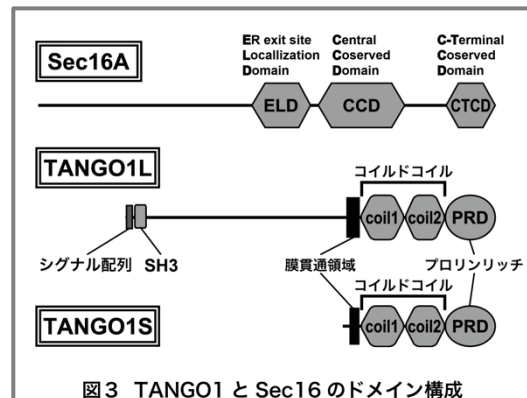


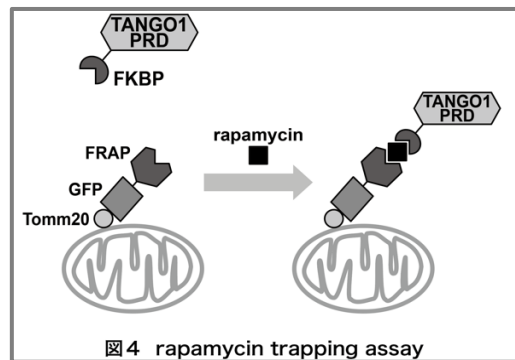
図3 TANGO1 と Sec16 のドメイン構成

次に、TANGO1 と Sec16 の結合の意義を解明するため、TANGO1 の両アイソフォームを発現抑制し、COPII タンパク質が解離して存在する HeLa 細胞に、野生型 TANGO1S および Sec16 との結合領域を欠く TANGO1S 変異体 ( $\Delta 120$  変異体) を発現

させた。野生型 TANGO1S を発現させた細胞においては、Sec16 と Sec31 の共局在率が無処理の細胞と同程度に回復したが、Sec16 と相互作用しない TANGO1S  $\Delta$ 120 変異体を発現させた細胞では共局在率がほとんど回復しなかった。以上の結果より、TANGO1 と Sec16 の間の結合が ER exit site における COII タンパク質の正しい局在化に必要であることが明らかになった。

### 3. TANGO1 は ER exit site の形成起点として機能する

Sec16 は膜貫通領域を持たず、Sec16 がどのようにして ER exit site に局在化するかわからなかった。Sec16 の ELD が TANGO1 と相互作用したことから、Sec16 が TANGO1 との結合を介して小胞体膜上に局在化する可能性が考えられた。この可能性を検討するため、FRAP タグを付与したミトコンドリア局在タンパク質 Tomm20 と、FKBP タグを付与した TANGO1 プロリンリッチ領域を HeLa 細胞に共発現させた。FKBP と FRAP はラパマイシン存在下で結合することから、ラパマイシン添加依存的に TANGO1 PRD をミトコンドリアに局在化させることが可能となる (図4)。ラパマイシンの添加により、通常は ER exit site に局在化する Sec16 および Sec31 が、両者とも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  $\Delta$ 120 変異体を用いた場合には、Sec16 および Sec31 はラパマイシンを添加しても、ミトコンドリアには局在化しなかった。以上の結果は、Sec16 が TANGO1 との結合を介して小胞体膜上に局在化することを示している。



また ER exit site に局在化する膜タンパク質である cTAGE5 および Sec12 は TANGO1 の発現抑制によって、小胞体膜全体に拡散する様子が観察された。この結果は TANGO1 が cTAGE5, Sec12 の局在を制御することを示唆する。

以上の結果から TANGO1 は Sec16 および ER exit site の膜タンパク質を、TANGO1 と Sec16 の結合が COPII タンパク質をそれぞれ集積させることで、協調して ER exit site の形成起点として機能することが明らかになった。

### 4. ER exit site は構成因子が偏局したサブドメインから成る

次に哺乳動物細胞 ER exit site の構成を精査する目的で、ER exit site の各構成因子に対する抗体を用いて HeLa 細胞を免疫染色し、超解像顕微鏡 SCLIM (Super-resolution Con-focal Live Imaging Microscopy) による観察を行った。その結果、TANGO1, cTAGE5 および Sec16 は同じ ER exit site 内で Sec12 に近接した位置に観察されるのに対して、COPII 小胞の外側被覆因子である Sec31 は他の構成因子と比較的離れた位置に観察された。一方で、内側被覆因子である Sec23 はいずれの因子とも同程度の共局在率を示した。以上の観察結果は ER exit site 内が一様ではなく、各構成因子が偏ってサブドメインを形成していることを示唆している。

### 5. カゼインキナーゼ 1 $\delta$ (CK1 $\delta$ ) は ER exit site の崩壊を惹起する

カゼインキナーゼ 1  $\delta$  (CK1  $\delta$ ) 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、その詳細な分子機構は不明であった (Lord et al., Nature, 2011)。私は HeLa 細胞に CK1  $\delta$  を過剰発現することによって、Sec16 と Sec31 の共局在率が低下することを見出した。この共局在率の低下はキナーゼ活性を有さない CK1  $\delta$  変異体 (K38R) および CK1  $\alpha$  の発現では観察されなかった。一方で、CK1  $\delta$  の阻害剤である IC261 処理によって、ER exit site が肥大化することが観察された。以上の結果は、CK1  $\delta$  がキナーゼ活性によって ER exit site 構成因子の解離を調節する可能性を示唆している。

## 6. CK1 $\delta$ 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

CK1  $\delta$  過剰発現による表現型が TANGO1 の発現抑制時と類似していたため、CK1  $\delta$  が TANGO1 の機能を修飾している可能性を考えた。タンパク質修飾リソースである phosphosite plus により TANGO1 を検索したところ、TANGO1L の 1651-1750 アミノ酸領域 (TANGO1S の 529-628 アミノ酸領域) に多数のリン酸化が予測された

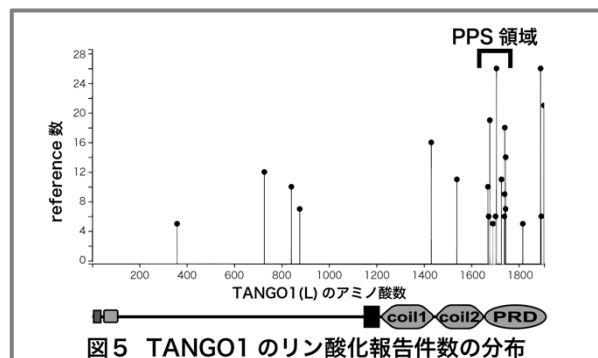


図5 TANGO1 のリン酸化報告件数の分布

(図5)。そこで、この領域を PPS (Phosphorylation Predicted Sequences) 領域と命名し、TANGO1 の PPS 領域が CK1  $\delta$  によってリン酸化される可能性を検討した。in vitro キナーゼアッセイの結果、野生型の TANGO1 リコンビナントは CK1  $\delta$  によってリン酸化されたが、PPS 領域のリン酸化候補部位をアラニンに置換した SA 変異体は、ほとんどリン酸化されなかった。よって TANGO1 の PPS 領域が CK1  $\delta$  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、CK1  $\delta$  による TANGO1 のリン酸化が Sec16 との結合親和性に与える影響を検討した。HEK293T 細胞に Sec16, TANGO1S, CK1  $\delta$  の三者を共発現し、免疫沈降を行った結果、CK1  $\delta$  を加えることで TANGO1S と Sec16 の結合親和性が減弱していた。一方で TANGO1S SA 変異体は、CK1  $\delta$  の有無によらず Sec16 との結合量が変化しなかった。

さらに、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 変異体を作成し、HeLa 細胞に発現させた。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 変異体を発現させた細胞では、ER exit site の構成因子が解離しており、VSVG ts045-GFP の輸送も遅延していた。以上の結果は、CK1  $\delta$  が TANGO1 の PPS 領域をリン酸化することで、ER exit site が崩壊することを示唆している。

## 7. CK1 $\delta$ 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

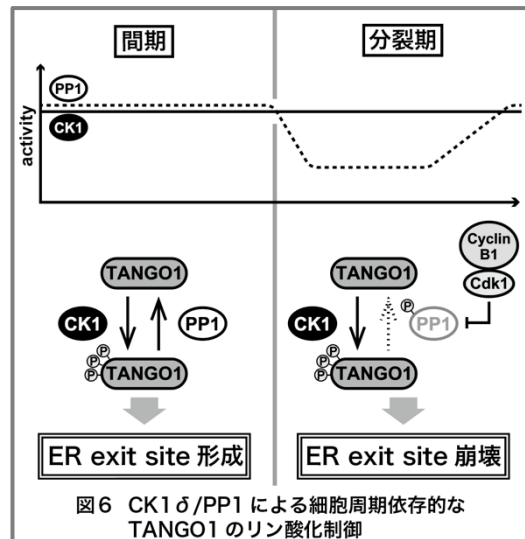
以前より、細胞分裂期に小胞体からの輸送が停止し、同時に ER exit site の構成因子も解離することが知られていた (Hughes and Stephens, JCS, 2010)。そこで、細胞分

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、細胞分裂期にもかかわらず ER exit site の構成因子が共局在する点が多数認められた。同様の表現型は CK1  $\delta$  および  $\epsilon$  を発現抑制した細胞でも認められた。以上の結果より、CK1  $\delta$  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可能性が示唆された。

## 8. Protein Phosphatase 1(PP1)が TANGO1 を脱リン酸化する

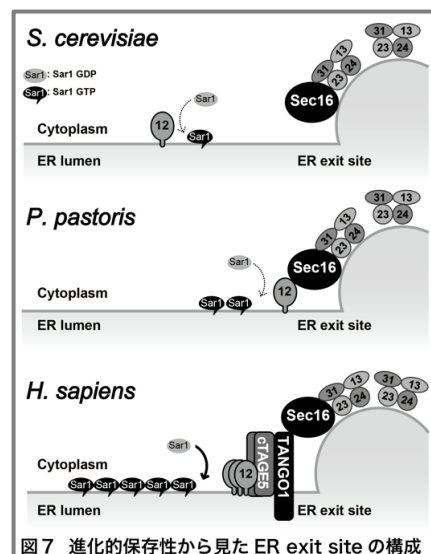
しかしながら、CK1  $\delta$  のキナーゼ活性は細胞周期を通して変化しないため、分裂期特異的な TANGO1 のリン酸化は説明できない。そこで TANGO1 の脱リン酸化過程に着目し、種々のホスファターゼ阻害剤を用いて ER exit site の形態を観察した。その結果、プロテインホスファターゼ 1(PP1)およびプロテインホスファターゼ 2A の阻害剤であるオカダ酸を添加した際に、TANGO1 のリン酸化亢進と ER exit site 構成因子の解離を認めた。同じ表現型は PP1 の触媒活性サブユニットの発現抑制でも見られたことから、TANGO1 は PP1 によって脱リン酸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、活性が低下することが知られている。以上の結果は、PP1 と CK1  $\delta$  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6)。



### 【考察】

#### 進化的保存性から見た ER exit site 構成の生理的意義

本研究によって Sec16 と TANGO1 との結合が ER exit site の形成に必要であることが明らかになった。Sec16 や COPII 小胞被覆因子を含む Sec 因子群は出芽酵母の遺伝学的スクリーニングによって単離された因子であり(Novick et al., Cell, 1980)、高等真核生物に至るまで高度に保存されている。一方で、TANGO1 ファミリーは後生生物で発見された因子であり、TANGO1S、cTAGE5 は脊椎動物においてのみ存在が報告されている。この進化的保存性は、各生物種の ER exit site の構成、特に Sec12 の局在化機構に反映されている(図7)。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、Sec12 は小胞体膜上に拡散して存在し、ER



exit site に特に集積しているわけではない(Okamoto et al., JCS, 2012)。一方で、メタノール発酵酵母 *Pichia pastoris* では Sec12 が Sec16 と直接結合することが知られており、この結合依存的に Sec12 が ER exit site に局在化する(Montegna et al., PLoS One, 2012)。脊椎動物では Sec16 と Sec12 の間に TANGO1 および cTAGE5 多量体が介在することで、ER exit site 近傍に複数の Sec12 をより効率的に集積させることが可能になる。Sec12 は COPII 小胞の形成を制御する低分子量 G タンパク質 Sar1 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) であり、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 (Tanabe et al., MBoC, 2016)。したがって TANGO1 複合体によって Sec12 が効率的に ER exit site に集積される機構は、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。

一方で、TANGO1L の小胞体内腔側ドメインはコラーゲンのシャペロンである HSP47 と相互作用すること(Ishikawa et al., PNAS, 2016)、TANGO1L ノックアウトマウスは骨形成不全を呈し、小胞体内にコラーゲンが蓄積すること(Wilson et al., JCB, 2011)から、TANGO1L がコラーゲンの分泌において特異的な機能を有することは強く示唆されてきた。最近、TANGO1L を発現抑制したショウジョウバエの細胞においても ER exit site の形成不全と分泌の抑制が報告されているが(Liu et al., JCB, 2017)、ショウジョウバエでは TANGO1S の存在は報告されておらず、TANGO1L がコラーゲン分泌と ER exit site 形成の両方の機能を有している可能性が考えられる。またショウジョウバエには cTAGE5 も存在せず、TANGO1L が脊椎動物とは異なる方法で ER exit site を形成している可能性も考えられる。

しかしながら、Sec23 や Sec31 などの COPII 小胞被覆因子が ER exit site に局在化するメカニズムは、TANGO1 と Sec16 の結合が必要であることが示されたものの、依然として解明されていない。今後は COPII 小胞被覆因子の局在化機構を含め、ER exit site 形成の分子メカニズム全貌の解明を目指したい。

### **分泌の調節点としての ER exit site**

今回私は、リン酸化修飾による TANGO1 と Sec16 との結合親和性制御が、細胞分裂期における ER exit site の崩壊に必要であることを明らかにした。細胞分裂期以外にも、ER exit site は細胞外環境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(Farhan et al., 2008, EMBO; Farhan et al., JCB, 2010; Margarita et al., EMBO, 2011; Advait et al., Cell, 2019; Federica et al., JCB, 2019)。TANGO1 と Sec16 の結合が ER exit site の形成起点となることから、ER exit site の形成制御と環境適応にも同様の機構が関与する可能性が考えられる。今後は、様々なシグナル経路と ER exit site の形態制御メカニズムとの関連についても検討していきたい。