肝線維化に関連する巨大分子分泌機構の解析

秋田大学大学院医学系研究科
教授　齋藤 康太

（共同研究者）
秋田大学大学院医学系研究科　助教　前田 深春
秋田大学大学院医学系研究科　技術専門職員　小松 幸恵

はじめに

生体内のタンパク質の約3割は、細胞表面や細胞外に分泌されて機能する。これらのタンパク質は、小胞体で合成された後「ER exit site（小胞体出芽部位）」と呼ばれる場所からCOPII被覆小胞に積み込まれて分泌される。コラーゲンはヒト生体内で最も多いタンパク質であるが、巨大であるために通常のCOPII被覆小胞には積み込まれず、分泌機構は不明であった。申請者は、巨大分子コラーゲンの分泌に特異的に関与するタンパク質として、ER exit siteに局在化する因子であるTANGO1Lを単離し（Cell 2009: JCB 2014: MBC 2016）、その機能解析を行ってきた。コラーゲンの分泌は、肝の線維化に密接に関与するが、我々の研究と海外の研究結果を考え合わせると、TANGO1Lは肝線維化過程の後期において関与することが考えられている（Hepatology 2017:Sci Rep 2017）。

最近、TANGO1LがそのアイソフォームであるTANGO1Sとともに、Sec16と協調してER exit siteの形成制御にも関与することを明らかにした（JCB 2017）。このことは、巨大分子の分泌に必要なメカニズムが、分泌の出発点であるER exit siteの形成制御と深く関連することを強く示唆している。

一方で分泌は、細胞分裂期に停止する。この際、ゴルジ体は断片化し細胞分裂が完了すると再形成される。ER exit siteも細胞分裂期には崩壊し、細胞分裂が完了すると再形成される。これまでゴルジ体の断片化と再形成の機構に関しては多くの知見が得られてきたが、ER exit siteの崩壊・再形成の分子機構は全くわかっていなかった。今回我々は、TANGO1が細胞分裂期にリン酸化されることでSec16との結合が低下し、結果としてER exit siteが崩壊することを見出した。TANGO1のリン酸化状態はCK1によるリン酸化とPP1による脱リン酸化の平衡にあり、細胞分裂期にPP1の活性が低下することによってTANGO1のリン酸化が亢進していることが明らかとなった。本知見によって、ER exit siteの細胞周期に応じた崩壊と再形成の分子機構が初めて明らかになった（Dev Cell 2020）。

結　果

CK1キナーゼの活性はER exit siteの形態形成に関与する

細胞にCK1を発現させると、ER exit siteに局在化するSec16とSec31の共局在率が有意に低下した。一方でCK1のキナーゼ活性を欠失した変異体においてはこの現象は観察されなかった。

次にCK1を発現抑制したところ、ER exit siteが肥大化することが観察された。CK1のキナーゼ阻害剤であるIC261を添加した細胞においても同様の表現型が観察されたことから、CK1のキナーゼ活性がER exit siteの形態制御に関与することが示唆された。

CK1はTANGO1とSec16の結合に関与する

CK1のキナーゼ活性がER exit siteの形態制御に必要であることから、CK1がER exit siteに局在化する因子をリン酸化する可能性を検証した。TANGO1とSec16の相互作用に対するCK1の添加効果を検証するため、293T細胞にTANGO1、Sec16、およびCK1を過剰発現し、TANGO1とSec16の相互作用に対する効果を検討した。その結果、CK1の野生型を発現させた細胞においては、TANGO1とSec16の結合が顕著に減少した。一方で、CK1のキナーゼ活性欠失変異体を発現させた細胞においては、変化が見られなかった。このことは、CK1がTANGO1あるいはSec16をリン酸化することによって、ER exit siteの形態制御に関与する可能性を強く示唆している。

CK1はTANGO1をリン酸化する

CK1がTANGO1をリン酸化することで、TANGO1とSec16の結合を制御している可能性を検証するため、まずTANGO1上のリン酸化修飾候補配列をデータベースによって検索した。その結果、TANGO1のSec16結合領域の近傍にリン酸化候補配列が集積する部位を見出し、PPSと命名した。TANGO1のPPS領域内のセリン及びスレオニンをアラニンに置換した変異体（TANGO1 SA変異体）を作製し、TANGO1がCK1によってリン酸化される可能性を *in vitro* キナーゼアッセイによって検証した。リコンビナントTANGO1にCK1を添加し、^{32}P標識したATPを用いて*in vitro*キナーゼアッセイを行った。その結果、TANGO1はCK1の添加に伴いリン酸化された。

TANGO1のCK1によるリン酸化により細胞分裂期のER exit siteは崩壊する

ER exit siteが細胞分裂期に崩壊することは、細胞分裂期における小胞体からの分泌停止の主要な要因であることが考えられている。しかしながら、分子メカニズムは不明である。TANGO1のCK1によるリン酸化が、細胞分裂期のER exit siteの崩壊に関与している可能性を検討するため、TANGO1あるいはTANGO1 SA変異体を安定的に発現させた細胞のER exit siteの形態を観察した。結果、TANGO1を発現させた細胞においては、通常の

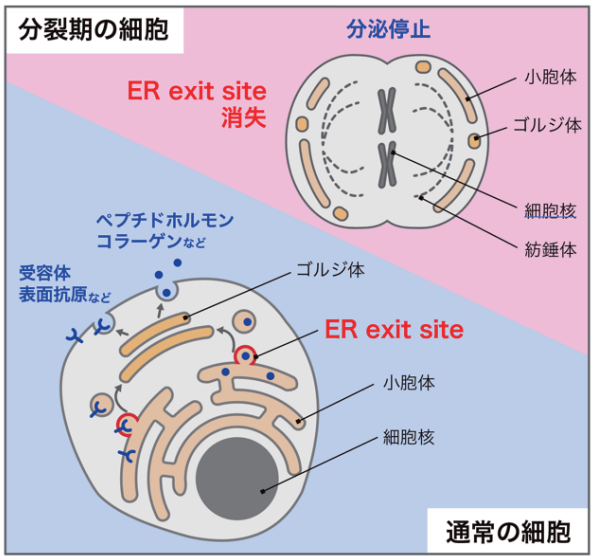
細胞と同様にER exit siteは崩壊し、Sec16とSec31の共局在率は顕著に減少した。一方でTANGO1 SA変異体を発現させた細胞においては、分裂中期においてもSec16とSec31が共局在する様子が観察された。以上の結果は、TANGO1の細胞分裂期のリン酸化が、ER exit siteの崩壊に重要であることを強く示唆している。次に細胞分裂期のER exit site崩壊に対するCK1の役割を検討するため、CK1を発現抑制した細胞において細胞分裂期のER exit siteを観察した。結果、CK1を発現抑制した細胞において、細胞分裂期においても有意にSec16とSec31の共局在率が上昇した。以上の結果によって、CK1によるTANGO1のリン酸化が細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊に重要である可能性が強く示唆された。

PP1はTANGO1の脱リン酸化によってER exit siteの形成に関与する

CK1によるTANGO1のリン酸化が細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊に重要であることが明らかになったが、細胞分裂期のCK1によるリン酸化亢進のメカニズムは不明であった。そこで代表的な脱リン酸化酵素、PP1およびPP2に着目し、両者の阻害剤を添加した細胞のER exit siteを観察した。その結果、PP2阻害剤であるendothallはER exit siteの形態に影響を及ぼさなかったが、PP1およびPP2両者を阻害するオカダ酸を添加した細胞においては、Sec16とSec31の共局在率が低下した。さらにPP1をsiRNAによって発現抑制した細胞においても、同様にSec16とSec31の共局在率の低下が観察された。次にPP1によるER exit site形態の制御が、TANGO1のリン酸化を介しているか検討するため、TANGO1に対するリン酸化状態がオカダ酸によって変化するか検討した。結果、野生型TANGO1はオカダ酸の添加によって有意にリン酸化が亢進したが、TANGO1 SA変異体のリン酸化状態には影響がなかった。

考　察

本研究により、TANGO1はCK1によってリン酸化されること、リン酸化されたTANGO1はSec16との結合活性を低下させることによってER exit siteの崩壊を促すことが明らかとなった。一方で、脱リン酸化酵素であるPP1は間期に比べて分裂期にその活性が低下することが知られている。間期の細胞においては、CK1によってリン酸化されたTANGO1はPP1による脱リン酸化と平衡状態にあり、結果TANGO1とSec16との結合は安定的に保たれている。一方で、分裂期の細胞においてはPP1の活性が低下することで、相対的にCK1によるTANGO1のリン酸化が亢進し、その結



果ER exit siteの崩壊が促される可能性が明らかになった。本研究によって、細胞分裂期にER exit siteが崩壊するメカニズムが初めて分子レベルで明らかになった。

要　約

細胞分裂期におけるゴルジ体の断片化とER exit siteの崩壊は小胞体からの分泌が停止する主な要因であると考えられている。ゴルジ体の断片化の分子機構はよく解析されている一方で、細胞分裂期のER exit siteの崩壊機構についてはよくわかっていない。我々は、これまで巨大分子コラーゲンの分泌に関与する因子としてTANGO1を単離し、TANGO1がSec16と協調することで、ER exit siteの形成制御にも関与することを報告してきた。TANGO1は肝線維化にも関与する因子であるが、今回我々はTANGO1が細胞分裂期にリン酸化されることでER exit siteが崩壊することを新たに見出した。TANGO1はCK1によってリン酸化を受け、PP1 によって脱リン酸化されるが、細胞分裂期にはPP1の活性が低下するため、TANGO1のリン酸化は亢進し、ER exit siteが崩壊することが明らかとなった。

文　献

1. Maeda, M., Komatsu, Y. and Saito, K. Mitotic ER exit site disassembly and reassembly are regulated by the phosphorylation status of TANGO1. Dev. *Cell in press*. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.07.017（2020）
2. Maeda M, Katada T, Saito K. TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion. J Cell Biol. Jun 5;216（6）:1731-1743. doi: 10.1083/jcb.201703084. Epub 2017 Apr 25. PMID:28442536（2017）
3. Tomoishi, S.[1], Fukushima, S.[1], Shinohara, K., Katada, T. and Saito, K CREB3L2-mediated expression of Sec23A/Sec24D is involved in hepatic stellate cell activation through ER-Golgi transport.（[1]Contributed equally）*Sci. Rep*., 7, 7992（2017）
4. Maiers, J. L. *et al*. The unfolded protein response mediates fibrogenesis and collagen I secretion through regulating TANGO1 in mice. *Hepatology* **65**, 983–998,（2017）.
5. Maeda M, Saito K, Katada T. Distinct isoform-specific complexes of TANGO1 cooperatively facilitate collagen secretion from the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell. Sep 1;27（17）:2688-96. doi: 10.1091/mbc.E16-03-0196. Epub 2016 Jul 13. PMID:27413011（2016）
6. Saito K, Yamashiro K, Shimazu N, Tanabe T, Kontani K, Katada T. Concentration of Sec12 at ER exit sites via interaction with cTAGE5 is required for collagen export. J Cell Biol. Sep 15;206（6）:751-62. doi: 10.1083/jcb.201312062. Epub 2014 Sep 8. PMID:25202031（2014）
7. Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, Woodley D, Polischuk R, Schekman R, Malhotra V. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. Cell. Mar 6;136（5）:891-902. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.025. PMID:19269366（2009）