

小胞体からの分泌制御機構の解明と疾患への応用

秋田大学 大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学講座
前田 深春

【背景】

生体内で翻訳される全タンパク質のうち、およそ3割は小胞体内で翻訳されることが知られている。これらのタンパク質は、小胞体上の特殊な領域である“ERES (ER exit site)”からゴルジ体へと運ばれ、細胞内オルガネラや細胞外へと分泌される。ERES 発見の経緯は古く、1970年代には George Palade による電子顕微鏡を用いた形態学的解析から、分泌タンパク質が集積する小胞体上のドメインとしてその存在が報告された (Palade, *Science*, 1975)。その後、80年代には Randy Schekman らによる出芽酵母を用いた遺伝学的解析から、細胞内分泌経路に関連する一連の因子が単離され、ERES には小胞体からのタンパク質輸送を担う COPII 輸送小胞の形成に関連する因子が集積していることが明らかになった (Novick et al., *Cell*, 1981)。

ERES は小胞体上に点状に分布し、1細胞あたり通常数百個が比較的安定に存在する。最近になって、ERES は細胞の栄養状態や小胞体内のタンパク質量に応じてその大きさや数・局在が変化し、同時に小胞体からの分泌機能も変化することが報告された (Subramanian et al., *Cell*, 2019; Centonze et al., *JCB*, 2019)。また、このような環境に応じた ERES の制御機構の破綻が、神経変性疾患やがんをはじめとする疾患と密接に関連する可能性も示されている。これらの知見は、ERES が分泌タンパク質の通過点であるだけでなく、環境に応じて分泌を積極的に調節する機能を有することを強く示唆している。しかし、ERES 自体の形成機構やその制御の分子メカニズムについては、ほとんど未解明だった。

受領者はこれまで、ERES に局在する膜タンパク質 TANGO1 の機能解析を行ってきた。TANGO1 は当初コラーゲンの積荷受容体として単離されたが、受領者はヒト TANGO1 にはコラーゲンと相互作用する小胞体内腔側領域を有さない短いアイソフォーム TANGO1S が発現していることを明らかにした (Maeda et al., *MBC*, 2016)。また、TANGO1 のすべてのアイソフォームを発現抑制した際に ERES が崩壊することを見出し、ERES の形成には TANGO1 が必要であることを明らかにした。さらに、ERES において COPII 小胞被覆因子の局在を制御する因子である Sec16 が TANGO1 と直接結合することを明らかにし、ERES の形成には TANGO1 と Sec16 の相互作用が必要であることを明らかにしてきた (Maeda et al. *JCB*, 2017)。加えて受領者は、細胞分裂期において TANGO1 のリン酸化が亢進すること、それによって Sec16 との結合親和性が一時的に減弱することが、細胞周期依存的な ERES の崩壊と形成に重要であることを見出している (Maeda et al. *Dev Cell*, 2020)。以上の結果は、TANGO1 と Sec16 の結合が ERES 形成に重要な役割を果たすことを示しているが、ERES の環境応答における役割は不明だった。

本研究において研究代表者は、TANGO1 の相互作用因子である Sec16 の翻訳後修飾に着目し、修飾がどのように制御されるか、また ERES の形態や分泌機能にどのような影響を与えるかを明らかにすることで、ERES の制御メカニズムの解明を目指した。

【結果】

a. Sec16 に対して TANGO1 は Sec13 と競合的に結合する

Sec16 は ERES の足場タンパク質として知られる因子であり、COPII 小胞の被覆因子と結合してその局在を制御することが報告されている。Sec13 は Sec16 の基底結合因子のひとつであり、COPII 小胞の被覆因子である。受領者らは、HEK293T 細胞において Sec13 を過剰発現することにより、Sec16 と共沈降する TANGO1 の量が減少することを見出した。この結果は Sec16 との結合に対して TANGO1 と Sec13 が競合的であることを意味する。

b. Sec13 が結合した Sec16 はリン酸化される

Sec13 を過剰発現した際、ウエスタンブロットで検出される Sec16 のバンドは高分子量側にシフトしていたことから、Sec16 は Sec13 共発現によって何らかの翻訳後修飾を受けることが明らかになった。この高分子量側のバンドは、リン酸化のプロープである phos-tag biotin によって検出することができた。また受領者は、Sec13 過剰発現時の Sec16 を免疫沈降し、 γ [32P]-ATP とともに反応させることで Sec16 が標識されることを確認した。以上の結果から、Sec13 を共発現した際に見られる Sec16 の翻訳後修飾がリン酸化であることが明らかになった。

さらに、受領者は Sec16 がリン酸化される領域を絞り込み、マスマスペクトロメトリーによって Sec16 のリン酸化候補残基を特定した。その結果、Sec16 のリン酸化残基は Sec13 との結合領域の近傍に位置しており、しかも Sec16 が ERES に局在するために必要なドメイン内に存在することがわかった。

c. CK1 α は Sec13 依存的に Sec16 をリン酸化する

Sec13 はキナーゼ活性を有さないタンパク質であるため、次に Sec16 のリン酸化を担うキナーゼの探索を行った。Sec16 の免疫沈降サンプルをマスマスペクトロメトリーで解析し、その中に含まれていたキナーゼを Sec13、Sec16 とともに共発現することで Sec16 をリン酸化する酵素を絞り込んだ結果、カゼインキナーゼ 1 α (CK1 α)が Sec16 のキナーゼ候補として挙げられた。実際に CK1 α を過剰発現させると Sec16 のリン酸化が亢進していた。また、CK1 α とともに Sec13 も過剰発現させることで、Sec16 のリン酸化はより亢進していたことから、CK1 α は Sec13 依存的に Sec16 をリン酸化することが明らかになった。

d. Sec16 のリン酸化は液-液相分離 (LLPS)による Sec16 の凝集体形成を制御する

Sec16 は半分以上の配列が天然変性領域(IDR)であり、LLPS によって液滴を形成する可能性が示されている。実際、ERES に局在する Sec16 は LLPS の阻害剤である 1,6-ヘキサンジオール添加によって拡散するが、Sec16 のリン酸化候補残基に変異を導入した非リン酸化型の Sec16 は 1,6-ヘキサンジオール耐性の強固な凝集体を形成していた。また、非リン酸化型の Sec16 は光褪色後蛍光回復法(FRAP)において蛍光の回復が抑制されていたことから、液滴の流動性が低下していることがわかる。同様の表現型は CK1 α の発現抑制時にも観察された。以上より、CK1 α による Sec13 依存的な Sec16 のリン酸化は Sec16 が形成する液滴の流動性維持に必要であることが明らかになった。さらに我々は、CK1 α の阻害剤を添加した際、小胞体からのタンパク質分泌に遅延が生じていることを明らかにした。この結果は、リン酸化によって保たれる Sec16 の流動性が ERES におけるタンパク質の分泌においても重要であることを示している。

【考察】

以上の結果より、Sec16はTANGO1と結合してERESにリクルートされた後に、COPII小胞被覆因子のひとつであるSec13およびCK1 α と結合することによってリン酸化修飾を受けること、このリン酸化によってSec16がERESにおいて形成する液滴の流動性が保たれることが明らかになった。また、Sec16の液滴の流動性は小胞体からの分泌に必要であることが示された。COPII小胞の形成に関与する因子の多くはSec16依存的にERESに局在化することから、Sec16はLLPSによってこれらの因子をERESに動員しながら、その流動性を保つことで分泌という動的な機能を制御していると考えられる。

また、栄養飢餓時にERESが肥大化すること、それに伴ってSec16の翻訳後修飾が変化することはすでに報告されている(Farhan et al., JCB, 2010)。また液滴形成に関連するDYRK3キナーゼもSec16を基質として認識することが明らかとなっている(Gallo et al., Dev. Cell, 2023)。したがって、Sec16はSec13およびCK1 α だけでなく、複数のキナーゼによって、様々なシグナル経路に応答してリン酸化状態が調節され、それによってERESが様々な環境に応答して分泌を調節することを可能にしていると考えられる。今後はCK1 α によるSec16のリン酸化がどのような局面で亢進あるいは抑制されるか、それがどのような生理的意義を有するかを明らかにすることで、本現象が疾患とどのように関連するかについても解明していきたい。