

# 巨大分子 VII 型コラーゲンの分泌を制御する 新規小胞体膜蛋白質の機能解析

東京大学大学院 薬学系研究科 生理化学教室  
齋藤 康太

## 1. はじめに

小胞体 (Endo plasmic Reticulum; ER)で合成されたタンパク質は、輸送小胞に積み込まれゴルジ体を経て細胞内の各小器官へと運ばれる。この小胞輸送系の研究は、出芽酵母を用いて分泌変異体が網羅的に単離されたことによって飛躍的に進展し、現在では数多くの構成因子が明らかとなっている。一方で高等真核生物の小胞輸送系は分泌するタンパク質の多様性を反映し、更に多くの制御因子が存在することが考えられる。

申請者は以前、ショウジョウバエ S2 細胞における分泌変異体を単離するため、dsRNA 法を用いた網羅的スクリーニングを行なった。その結果、出芽酵母では保存されておらず、高等真核生物においてのみ存在する遺伝子である TANGO1 を単離、同定した (Nature, 2006)。

TANGO1 は小胞体における COPII 被覆小胞出芽ドメインである ER exit site に特異的に局在し、小胞体内腔に配向する SH3 ドメインで VII 型コラーゲンと、細胞質中に配向するプロリンリッチ領域で COPII 被覆の複合体構成因子の一部である Sec23/24 と結合することが明らかとなった。さらに、TANGO1 を発現抑制した細胞においては、VII 型コラーゲンが小胞体に蓄積し、その分泌が抑制されることを見出した。また、この分泌阻害効果は、VII 型コラーゲンに特異的であり、その他の多くのタンパク質の分泌には大きな影響を及ぼさなかった。以上の結果から、TANGO1 は VII 型コラーゲンに対する積み荷受容体として機能する可能性が示唆された (Cell, 2009)。

コラーゲンはその形成する複合体が巨大であり (VII 型コラーゲンの場合は 400-500 nm)、通常の COPII 被覆小胞 (直径 60-90nm) には入りきらないと考えられている。しかし、その分泌メカニズムは解明されていないことから、申請者は TANGO1 の制御機構を理解することで、コラーゲン分子分泌の分子機構に迫れると考えた。

## 2. 方法

TANGO1 と同様のドメイン構造を C 末端側に有するタンパク質をデータベースから探索し、遺伝子のクローニング、抗体の作製を行ない、細胞内局在をはじめ、細胞内動態の解析を行なった。

さらにリコンビナントタンパク質を大腸菌より、精製し、生化学的解析を行なうことで結合様式の同定をはかった。また、RNAi 法による発現抑制系を用いることにより、遺伝子の細胞内における機能同定を試みた。

### 3. 結果

データベース検索により、TANGO1 と同様のドメイン構造を有するタンパク質を単離した。この因子は、SH3 ドメインを有しておらず、TANGO1 の C 末端側の配列のみと相同性を有していた。新規因子に対する抗体を作製し、内在性タンパク質の局在を検討したところ、ER exit site のマーカーである Sec31A と共局在した。次に、新規因子に結合するタンパク質を探索する目的で、内在性タンパク質の共沈降確分を銀染色およびウエスタンブロット法により検出した。その結果、新規因子に TANGO1 が特異的に結合することが明らかになった。

TANGO1 と新規因子の結合ドメインを調べる目的で、各種欠失変異体どうしの結合実験を行ったところ、TANGO1 と新規因子の結合は、細胞質中に存在する coiled-coil ドメインを介していることが示された。

また TANGO1 と同様に、C 末端に存在するプロリンリッチドメインには、Sec23/24 が結合することが明らかとなった。

最後に新規因子の分泌に対する影響をノックダウン法によって検討した。その結果、ノックダウンは多くのタンパク質の分泌には影響を与えないのに対し、TANGO1 と同様に VII 型コラーゲンの分泌を顕著に阻害することが明らかとなった。

### 4. 考察

以上のように、今回単離した新規因子は ER exit site に局在し、TANGO1 と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、新規因子のノックダウンは TANGO1 のノックダウンと同様に VII 型コラーゲンの分泌を特異的に抑制した。以上の結果から、申請者は、新規因子が TANGO1 と協調して小胞体からの VII 型コラーゲンの分泌を特異的に制御していると考え（図 参照）。

今後、どのような分子メカニズムを介し、TANGO1 と新規因子が VII 型コラーゲンの分泌を担っているのか解明することが課題である。

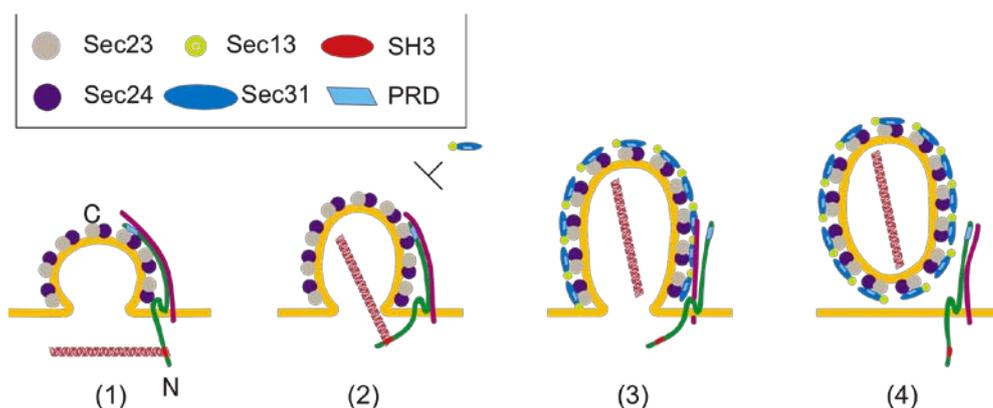


図 TANGO1、新規因子の協調によるVII型コラーゲン詰め込みモデル

## 5. 発表論文、参考文献

Frederic Bard, Laetitia Casano, Arrate Mallabiabarrena, Erin Wallace, **Kota Saito**, Hitoshi Kitayama, Gianni Guizzunti, Yue Hu, Franz Wandler, Ramanuj DasGupta, Norbert Perrimon and Vivek Malhotra (2006) Functional genomics reveals novel components involved in protein secretion and Golgi organization. **Nature**, 439, 604-7.

**Kota Saito**, Mei Chen, Fred Bard, Shenghong Chen, Huilin Zhou, David Woodley, Roman Polischuk, Randy Schekman, Vivek Malhotra (2009) TANGO1 facilitates cargo loading at Endoplasmic Reticulum exit sites. **Cell**, 136, 891-902

Yoko Nagai<sup>1</sup>, Yoichi Asaoka<sup>1</sup>, Misako Namae, Kota Saito, Haruka Momose, Hiroshi Mitani, Makoto Furutani-Seiki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 396, 887-893 (<sup>1</sup>Contributed equally).

Shinya Takahashi, Kyoko Sakurai, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajiho, Kota Saito, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. **Nucleic Acids Res.** in press