

細胞分裂期における分泌停止メカニズムの解明

前田 深春, 齋藤 康太

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

(令和2年4月29日掲載決定)

Secretion from the endoplasmic reticulum is regulated in a cell cycle-dependent manner

Miharu Maeda and Kota Saito

Department of Biological Informatics and Experimental Therapeutics, Graduate School of Medicine, Akita University

Key words : Secretion, ER exit site, Mitosis, TANGO1, Sec16, CK1 δ , PPI

はじめに

「分泌 (secretion)」は、細胞内で合成されたタンパク質が細胞外や細胞表面に出るまでの一連の過程である。インスリンなどのペプチドホルモンや、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスなど、生体内の多くの因子は分泌されて機能する。これらのタンパク質は、小胞体内で合成された後、ゴルジ体へ輸送され、トランスゴルジ網を經由して最終的に細胞膜表面へ到達する。

この分泌システムは、ヒトだけでなく殆ど全ての真核生物に共通する普遍的な生命現象であり、これまで詳細に解析されてきた。同時に、分泌は栄養状態や細胞外環境に応じて調節されることも明らかになってきた。特に、細胞分裂期において分泌が一時的に停止する現象は1980年代から記述されているが¹⁾、細胞周期依存的な分泌の制御メカニズムについては未解明な点が多く残る。

我々は分泌経路の初期段階である小胞体-ゴルジ体間のタンパク質輸送に着目してきた。小胞体からゴルジ体へ分泌タンパク質を輸送するCOPII小胞は、小胞体上の特殊な領域である“ER exit site”で形成される。ER exit siteにはCOPII小胞の被覆因子であるSec23/24複合体、Sec13/31複合体がSec16依存的に集積している²⁾。

我々はこれまで、高等真核生物のER exit siteに局在する新規因子Transport and Golgi organization 1 (TANGO1)の機能解析を行ってきた。TANGO1はショウジョウバエ由来のS2細胞を用いた分泌スクリーニングによって単離された膜貫通型タンパク質である³⁾。脊椎動物では、長鎖(TANGO1L)と短鎖(TANGO1S)の2つのアイソフォームが存在し⁴⁾、TANGO1Lは小胞体内でコラーゲンと相互作用することでコラーゲンの積荷受容体として機能することが明らかになっている⁵⁾。一方、TANGO1の両アイソフォームに共通する細胞質側領域は、Sec16と直接結合し、ER exit siteの場を決定するオーガナイザーとしての役割を有することを明らかにしてきた⁶⁾。

本稿では、新たにCasein Kinase 1 δ (CK1 δ)とProtein Phosphatase 1 (PPI)によってTANGO1のリン酸化状態が制御されていること、TANGO1のリン酸化によってSec16との結合親和性が低下し、ER exit site形成不全と小胞体からの分泌停止が惹起されることを明らかにした。さらに、細胞分裂期においてはPPIの活性減弱によりTANGO1のリン酸化が充進するこ

Corresponding Author : Miharu Maeda
Department of Biological Informatics and Experimental Therapeutics, Graduate School of Medicine, Akita University, 1-1-41 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6067
Fax : 81-18-836-2603
E-mail : mimaeda@med.akita-u.ac.jp
*令和3年2月17日秋田医学会学術奨励賞記念講演 (Web)

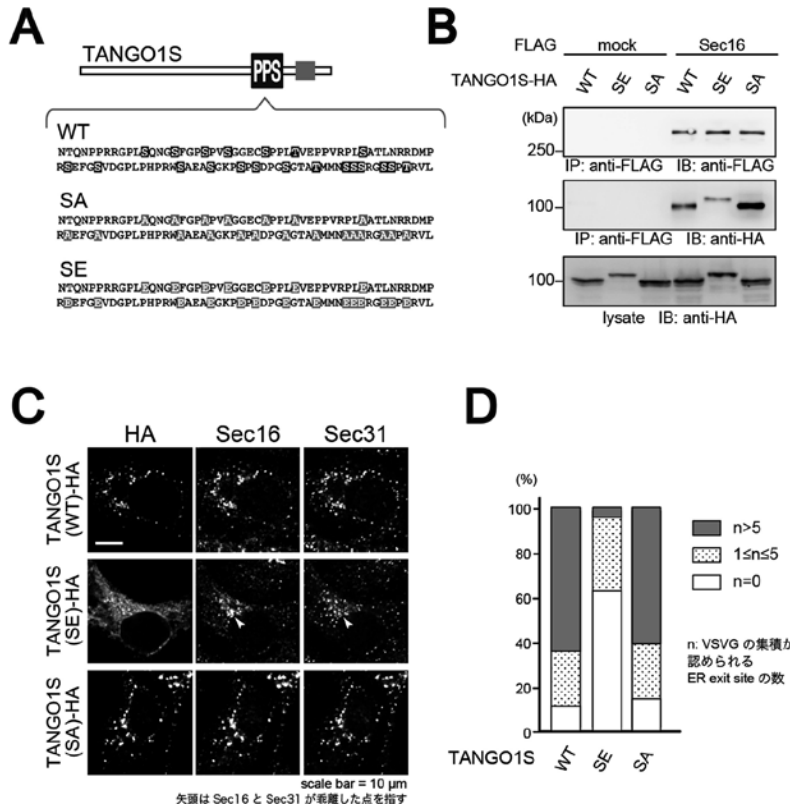


図2. TANGO1 のリン酸化模倣変異体は、Sec16 との結合量が低下し ER exit site を崩壊させる

ジ体間のタンパク質輸送に関与することが明らかになってきたため⁹⁾, CK1 δ が TANGO1 を直接リン酸化するかを γ -³²P-ATP を用いた *in vitro* の評価系で検証した。TANGO1 は PPS 領域を含む C 末端 257 アミノ酸領域部分をリコンビナントとして調製し, CK1 δ は自己リン酸化による活性減弱を防ぐため, 触媒ドメイン部分のリコンビナントを調製して用いた。結果として, TANGO1 は CK1 δ 存在下でリン酸化されたが, TANGO1 の SA 変異を含みリコンビナントにおいて ³²P はほとんど検出されなかった (図 3A)。以上の結果より, CK1 δ によって TANGO1 の PPS 領域が直接リン酸化されることが明らかになった。

さらに, CK1 δ が ER exit site の構成や形態に与える影響を評価した。CK1 δ を過剰発現させた細胞では Sec16 と Sec31 は解離し, TANGO1S の SE 変異体を発現させた際と同様の表現型が観察された。一方, キナーゼ活性を有さない CK1 δ K38R 変異体を発現させ

た細胞では, ER exit site の乖離は認められなかった (図 3B)。また, CK1 δ の阻害剤である IC261 を添加した細胞において, ER exit site は肥大化していた (図 3C)。以上の結果より, CK1 δ がそのキナーゼ活性により ER exit site の形態に影響を与え得ることが明らかになった。

TANGO1 は PP1 によって脱リン酸化される

続いて我々は, TANGO1 の脱リン酸化メカニズムについて, プロテインホスファターゼ (PP) ファミリーを中心に, 各種阻害剤を用いて検討を行った。その結果, PP2A 特異的阻害剤であるエンドサルを添加した細胞では, ER exit site の形態変化はほとんど認められなかったが, PP1 と PP2A 両方の阻害剤であるオカダ酸を処理した細胞では Sec16 と Sec31 の共局在率が有意に低下していた (図 4A)。さらに siRNA により PP1 を発現抑制した際にも, Sec16 と Sec31 の共局在

(4)

細胞分裂期における分泌停止メカニズムの解明

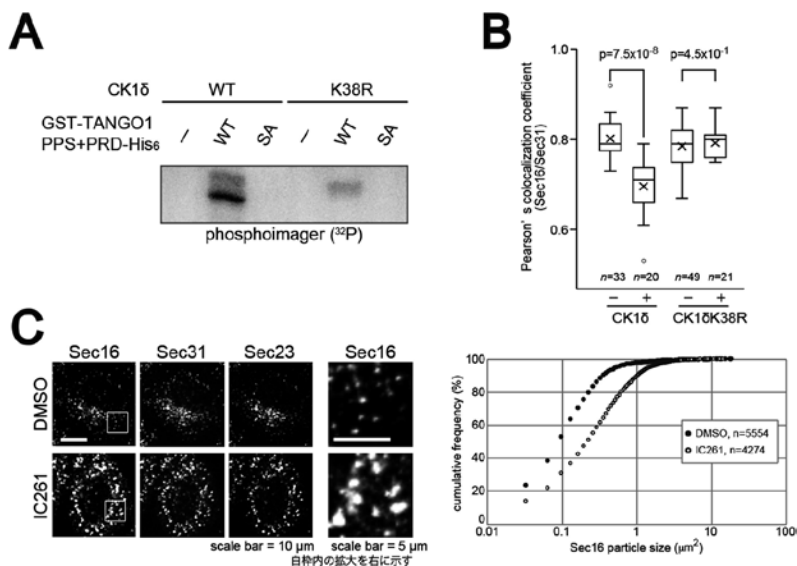


図3. CK1δはTANGO1を直接リン酸化し、ER exit siteを崩壊させる

率が有意に低下していた(図4B)。

次に、PP1がTANGO1のリン酸化状態にどのような影響を与えるか調べる目的でTANGO1S-FLAGの安定発現株にオカダ酸を添加し、phos-tagを用いてTANGO1Sのリン酸化を定量する解析を行った¹⁰⁾。その結果、野生型TANGO1Sのリン酸化はオカダ酸存在下で亢進していたが、一方でTANGO1S SA変異体を用いた場合にはオカダ酸添加時にもリン酸化の亢進は認められなかった(図4C)。またTANGO1S SA変異体の安定発現株では、オカダ酸添加によるER exit siteの崩壊も抑制されていた(図4D)。以上の結果は、PP1によるTANGO1のPPS領域の脱リン酸化がER exit siteの形成に必要であることを示している。

細胞分裂期におけるTANGO1のリン酸化亢進によってER exit siteは崩壊する

細胞分裂期において、分泌の停止に伴ってER exit siteも崩壊し、Sec16とSec31は分裂前期から後期にかけて局在が解離することが報告されている^{11,12)}。しかし、この一時的なER exit site崩壊の分子メカニズムは不明だった。Sec16とSec31の解離はTANGO1のリン酸化模倣変異体発現時や、CK1δの過剰発現時、PP1の活性抑制時においても観察されたこと、PP1は細胞分裂期に一時的に活性低下することから、我々は

細胞分裂期においてTANGO1のPPS領域におけるリン酸化が亢進し、Sec16との結合が外れることがER exit siteの崩壊の契機となる仮説を考え、その検証を行った。まず、間期と分裂期それぞれにおけるTANGO1Sのリン酸化量をphos-tagにより定量した。その結果、nocodazoleで細胞分裂期に同調させた培養細胞において野生型TANGO1Sのリン酸化量は増加していたが、一方でTANGO1S SA変異体は細胞分裂期においてもリン酸化量が変化しなかった(図5A)。したがって、細胞分裂期にはTANGO1のPPS領域においてリン酸化が亢進することが明らかになった。

さらに、野生型TANGO1SあるいはTANGO1S SA変異体を発現する安定発現株での細胞分裂期におけるER exit siteの様子を観察した。野生型TANGO1Sを発現する細胞では、親株のHeLa細胞と同様に、分裂中期においてSec16/Sec31の局在が解離していた。一方、TANGO1S SA変異体を発現する細胞では、分裂中期においてもSec16とSec31が共局在する点が多数認められた(図5B)。この結果は、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にはTANGO1のPPS領域におけるリン酸化が必要であることを意味している。

さらに、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にCK1δが関与する可能性を検討するため、CK1δ/eを発現抑制した細胞でのER exit siteを観察した。その結果、TANGO1S SA変異体安定発現株と同様、CK1δ/e

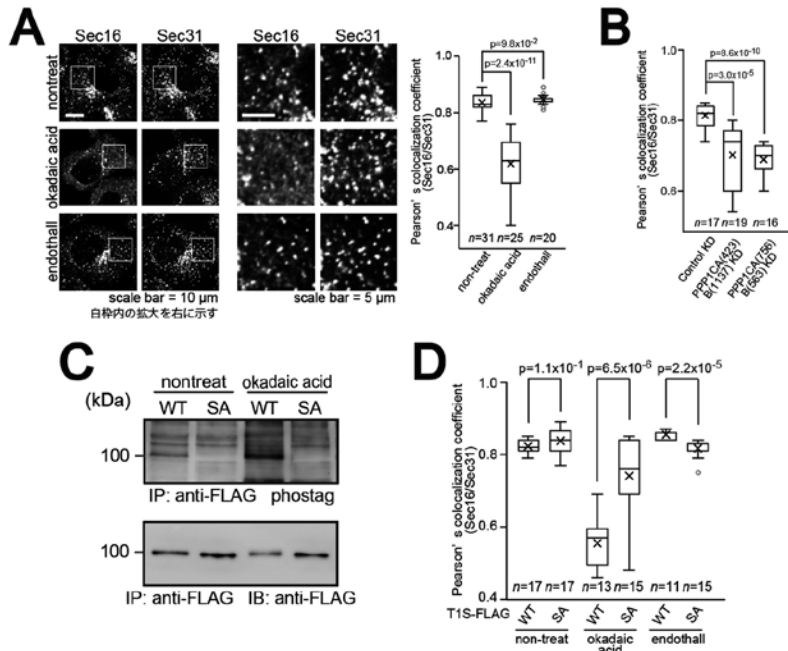


図4. PP1によるTANGO1の脱リン酸化によってER exit siteが形成される

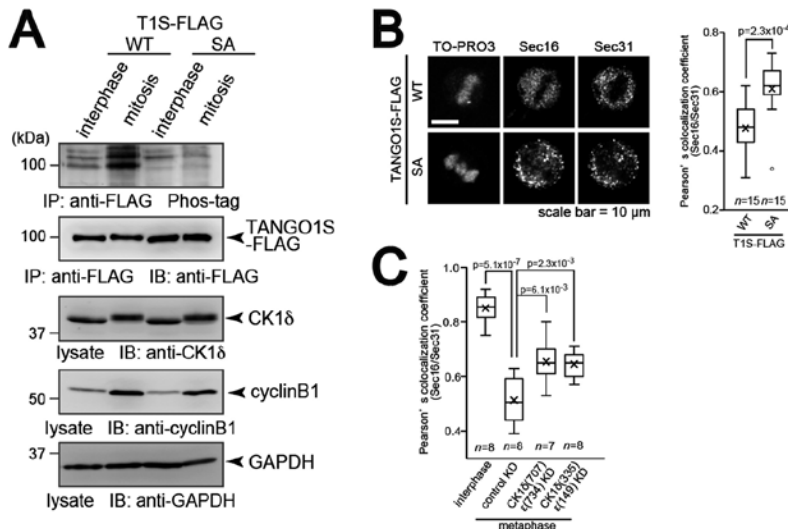


図5. 細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にはCK1δによるTANGO1のリン酸化が必要である

を発現抑制した細胞においてはSec16とSec31の共局在率が有意に増加していた(図5C)。以上の結果から、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊はCK1δによ

るTANGO1 PPS領域のリン酸化によって生じる可能性が強く示唆された。

- ly facilitate collagen secretion from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, **27**(17), 2688-2696. (In eng). DOI: 10.1091/mbc.E16-03-0196.
- 5) Saito, K., Chen, M., Bard, F., *et al.* (2017) TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell*, **136**(5), 891-902. (In eng). DOI: 10.1016/j.cell.2008.12.025.
 - 6) Maeda, M., Katada, T. and Saito, K. (2017) TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion. *J. Cell Biol.*, **216**(6), 1731-1743. (In eng). DOI: 10.1083/jcb.201703084.
 - 7) Hornbeck, P.V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham, V. and Skrzypek, E. (2015) PhosphoSitePlus, 2014 : mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.*, **43**(Database issue), D512-520. (In eng). DOI: 10.1093/nar/gku1267.
 - 8) Maeda, M., Katada, T. and Saito, K. (2017) TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion. *J. Cell Biol.*, **216**(6) : 1731-1743. DOI: 10.1083/jcb.201703084.
 - 9) Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., *et al.* (2011) Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature*, **473**(7346), 181-186. DOI: 10.1038/nature09969.
 - 10) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. and Koike, T. (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**(4), 749-757. (In eng). DOI: 10.1074/mcp.T500024-MCP200.
 - 11) Farmaki, T., Ponnambalam, S., Prescott, A.R., *et al.* (1999) Forward and retrograde trafficking in mitotic animal cells. ER-Golgi transport arrest restricts protein export from the ER into COPII-coated structures. *J. Cell Sci.*, **112**(Pt 5), 589-600. (In eng).
 - 12) Hughes, H. and Stephens, D.J. (2010) Sec16A defines the site for vesicle budding from the endoplasmic reticulum on exit from mitosis. *J. Cell Sci.*, **123**(23), 4032-4038. DOI: 10.1242/jcs.076000.
 - 13) Dohadwala, M., da Cruz e Silva, E.F., Hall, F.L., *et al.* (1994) Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**(14), 6408-6412. (In eng). DOI: 10.1073/pnas.91.14.6408.
 - 14) Maeda, M., Komatsu, Y. and Saito, K. (2020) Mitotic ER Exit Site Disassembly and Reassembly Are Regulated by the Phosphorylation Status of TANGO1. *Dev. Cell*, **55**(2), 237-250.e5. (In eng). DOI: 10.1016/j.devcel.2020.07.017.
 - 15) Maeda, M., Komatsu, Y. and Saito, K. (2020) Mitotic ER exit site dynamics : insights into blockade of secretion from the ER during mitosis. *Mol. Cell. Oncol.*, **7**(6), 1832420. (In eng). DOI: 10.1080/23723556.2020.1832420.
 - 16) Centonze, F.G. and Farhan, H. (2019) Crosstalk of endoplasmic reticulum exit sites and cellular signaling. *FEBS Lett.*, **593**(17), 2280-2288. (In eng). DOI: 10.1002/1873-3468.13569.
 - 17) Bruno, J., Brumfield, A., Chaudhary, N., Iaea, D. and McGraw, T.E. (2016) SEC16A is a RAB10 effector required for insulin-stimulated GLUT4 trafficking in adipocytes. *J. Cell Biol.*, **214**(1), 61-76. (In eng). DOI: 10.1083/jcb.201509052.
 - 18) Cho, H.J., Yu, J., Xie, C., *et al.* (2014) Leucine-rich repeat kinase 2 regulates Sec16A at ER exit sites to allow ER-Golgi export. *The EMBO Journal*, **33**(20), 2314-2331. DOI: 10.15252/embj.201487807.
 - 19) Witte, K., Schuh, A.L., Hegermann, J., *et al.* (2011) TFG-1 function in protein secretion and oncogenesis. *Nat. Cell Biol.*, **13**(5), 550-558. (In eng). DOI: 10.1038/ncb2225.
 - 20) Mertins, P., Yang, F., Liu, T., *et al.* (2014) Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. *Mol. Cell. Proteomics*, **13**(7), 1690-1704. (In eng). DOI: 10.1074/mcp.M113.036392.