

研究報告書
令和3年度：A課題

令和5年2月7日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 秋田大学大学院医学系研究科

住 所 秋田県秋田市本道 1-1-1

研究者氏名 齋藤 康太

(研究課題)

がん微小環境における分泌機構の解明

令和4年 1月 24日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しました
のでご報告いたします。

【背景および目的】

がん微小環境においては免疫細胞によるがん細胞の排除機構と、がん細胞による免疫逃避反応とのせめぎあいがおこっているが、この過程ではさまざまなサイトカイン分子の分泌が大きな役割を担っている。しかしながら、がん微小環境におけるサイトカインの分泌に着目した研究はそれほど多くない。

分泌は小胞体で合成された分泌タンパク質がゴルジ体を通して細胞膜より細胞外へ放出される一連の過程である。本研究者は最近、分泌の出発点である ER exit site の形成に必要な因子として、TANGO1 と Sec16 を見出した。これらの因子は特異的に ER exit site に局在し、両者が結合することによって ER exit site の形成が制御されることを明らかにした。最近、本研究者は TANGO1 がカゼインキナーゼ 1 δ (CK1 δ) によってリン酸化されること、プロテインホスファターゼ 1 (PP1) によって脱リン酸化されることを見出し、細胞分裂期において TANGO1 のリン酸化が亢進することで Sec16 との結合親和性が低下し、一時的な ER exit site の崩壊と小胞体からの分泌停止が生じることを明らかにした。以上の結果から TANGO1 と Sec16 が ER exit site 形成の起点として機能することが明らかとなった。

さらに本研究者は、TANGO1 だけでなく Sec16 もリン酸化修飾を受けることを見出している。そこで本研究では、Sec16 の新規リン酸化・脱リン酸化酵素を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法と結果】

1. Sec16 相互作用因子の探索

Sec16 の新規相互作用因子を探索するため、内在 Sec16 の免疫沈降の他、FLAG-Sec16 の安定発現株に対する FLAG 抗体による免疫沈降、さらに Sec16 ドメイン発現株に対する免疫沈降の他、BioID による近位標識法による近接分子等に対し、LC-MS/MS を用いたショットガン解析を行った (国立循環器病センター若林真樹先生との共同研究)。次に、解析結果を既存のタンパク質間相互作用データベースや細胞内局在データベースと重ね合わせて、より確度の高い相互作用因子を絞り込んだ。その結果、9 手法のうち 6 手法以上によって結合が確認された因子が合計 37 因子、5 手法によって確認されたものが 95 因子存在した。これらの中には、既知の Sec16 相互作用因子が多数含まれていたことから、本解析の妥当性が考えられた。これらのうちから、特に有望なものを 39 因子ピックアップし、これらについてさらなる解析を加えることにした。

2. PTPN1 は ER exit site の形態に関与する

PTPN1 (PTP1B: non receptor-type protein phosphatase 1) は、小胞体に局在化するプロテインホスファターゼであり、チロシン残基の脱リン酸化に関与することが知られているが、その機能についてはまだ解明されていない点が多い。

本研究者は Sec16 の特異的相互作用因子の候補として、PTPN1 を単離した。そこで、まず PTPN1 を発現抑制した際の ER exit site に対する影響を免疫染色によって検討した。その結果、PTPN1 を発現抑制すると ER exit site に局在化する Sec16 と Sec31 のシグナルが有意に減弱することが明らかになった。

3. PTPN1 は Sec16 と特異的に相互作用する

PTPN1 が Sec16 を基質として脱リン酸化活性を有するか明らかにするために、PTPN1 野生型および PTPN1 の基質と特異的に結合する変異体である PTPN1 D181A に対し、各種 ER exit site 関連タンパク質との結合を検討した。その結果、今回解析に用いた ER exit site タンパク質である TANGO1、cTAGE5、Sec12 と PTPN1 の結合は認められなかったのに対し、Sec16 に対しては、PTPN1 野生型と比べて、PTPN1 D181A 変異体が有意に結合活性を示した。以上の結果から、PTPN1 は Sec16 を基質としてはたらき、ER exit site の形態に影響する可能性が高いと考えられた。

【考察および展望】

今回の解析により、TANGO1 と Sec16 で形成される ER exit site は TANGO1 に対するセリンスレオニンキナーゼによるリン酸化のみならず、Sec16 に対するチロシンリン酸化によっても、その形態が制御される可能性が明らかになった。チロシンキナーゼは種々のがん組織において、その活性化が知られており今後の解析が期待される。

【成果発表】

Saegusa K., Matsunaga K., Maeda M., Saito K., Izumi T., and Sato K. Cargo receptor Surf4 regulates endoplasmic reticulum export of proinsulin in pancreatic β -cells. *Commun Biol.*, 5 (1), 458 (2022)

前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太 「Sec16 のリン酸化による小胞体出芽部位 ERES の形成制御機構」 [第 73 回 薬理学会北部会] 2022 年 9 月 18 日 北海道科学大学 北海道・札幌市 (口頭発表)

前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太 「小胞体出芽部位 ERES の形成制御メカニズムの解明」 [第 19 回 生命科学研究会] 2022 年 7 月 2 日 日本教育会館 東京都・千代田区 (口頭発表)

前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太 「Sec16 のリン酸化による小胞体出芽部位 ERES の制御機構」 [日本生化学会東北支部 第 88 回例会・シンポジウム] 2022 年 5 月 27 日 鶴岡市先端研究産業支援センター 山形県・鶴岡市 (口頭発表)

Geoffrey M. Cooper 著、須藤和夫、堅田利明監訳、榎森康文、足立博之、富重道雄、齋藤康太 訳、クーパー分子細胞生物学 第 8 版 (東京化学同人)