

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：24506

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23110007

研究課題名(和文) ゴルジ体ストレス応答における糖鎖修飾の役割と神経機能への貢献

研究課題名(英文) Golgi stress response and glycosylation in neural function

研究代表者

吉田 秀郎 (YOSHIDA, HIDEROU)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：60378528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 70,200,000円

研究成果の概要(和文)： ゴルジ体は、神経細胞の機能に重要な機能を果たしている。例えば、樹状突起にはゴルジ・アウトポストと呼ばれる著しく発達したゴルジ体が存在し、神経細胞におけるタンパク質の糖鎖修飾や小胞輸送を担っている。

本研究では、ゴルジ体ストレス応答の応答経路としてTFE3経路やプロテオグリカン経路、ムチン経路、グリコスフィンゴリピッド経路を同定し、TFE3経路を制御する転写因子TFE3の活性化機構を解明するとともに、TFE3経路を活性化するゴルジ体ストレスの分子の実体にシアル酸修飾の不全が関与していることを明らかにした。また、ゴルジ体ストレス応答がグリア細胞の分化に必須であることを見出した。

研究成果の概要(英文)： The Golgi apparatus has an important role in neural function. For instance, dendrites contain Golgi outpost, a well developed Golgi structure critical for glycosylation and vesicular transport of membrane and secretory proteins.

In this research project, we identified four response pathways of the mammalian Golgi stress response, that is, the TFE3, proteoglycan, mucin and glycosphingolipid pathways, revealed the activation mechanism for TFE3, a key transcription factor for the TFE3 pathway, and found that insufficiency of sialic acid modification is involved in activation of the TFE3 pathway. Moreover, we demonstrated that the Golgi stress response is essential for differentiation of glial cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経 糖鎖 ゴルジ体 ストレス応答 細胞小器官 小胞体 小胞輸送 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体は膜タンパク質や分泌タンパク質の糖鎖修飾や小胞輸送を担う細胞小器官である。糖鎖修飾や小胞輸送が盛んな細胞ではゴルジ体ストレス応答によってゴルジ体の機能が強化される。神経細胞でもタンパク質の糖鎖修飾はきわめて重要であり、神経細胞の樹状突起の根本には著しく発達したゴルジ体(ゴルジアウトポストと呼ばれる)が存在することがしばしば観察される。しかしながら、神経細胞の機能にゴルジ体ストレス応答がどのように関与しているかについては、全く何もわかっていなかった。また、ゴルジ体ストレス(ゴルジ体の機能が不足する状態)の分子の実体についても、全くわかっていなかった。更に、ゴルジ体ストレス応答の分子機構については、応答経路の一つである TFE3 経路の転写因子 TFE3 は同定されていたが、TFE3 がゴルジ体ストレスによってどのようなメカニズムで活性化されるかについてもほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、(1) 哺乳類のゴルジ体ストレス応答の分子機構を明らかにする、(2) ゴルジ体ストレス応答を活性化するゴルジ体ストレスの分子の実体を解明することによって、神経系における新規の糖鎖コードを明らかにする、(3) 神経系の細胞におけるゴルジ体ストレス応答の機能を明らかにすることを目的とし、以下の解析を行った。

3. 研究の方法

ゴルジ体ストレス応答の分子機構を明らかにするために、マイクロアレイや定量的 PCR を行って標的遺伝子を同定した。転写制御配列を同定するためには、標的遺伝子のプロモーターを段階的に短くし、どの領域に転写を活性化する転写制御配列が存在するか調べた。転写を活性化する転写因子を単離するためには、同定した転写制御配列をプローブとし、そこへの結合を指標として、酵母細胞を用いた one hybrid スクリーニングを行った。

ゴルジ体ストレス応答の分子の実体を明らかにするためには、CMP-シアル酸のトランスポーターである SLC35A1 の発現を siRNA によって抑制し、ゴルジ体ストレス応答が活性化されるかどうか調べた。

アストロサイトの分化系としては、ラット C6 グリオーマ細胞にレチノイン酸を作用させてアストロサイトに分化させる系を用いた。

4. 研究成果

(1) ゴルジ体ストレス応答の分子機構の解析

ゴルジ体ストレス応答の応答経路である TFE3 経路は、転写因子 TFE3 によって制御されているが、TFE3 がゴルジ体ストレスによってどのように活性化されるかイムノブ

ロットによって調べた。その結果、TFE3 は平常時は108番目のセリン残基がリン酸化されることによって細胞質に不活性な状態で繫留されているが、ゴルジ体ストレス時には脱リン酸化されることによって核へ移行し、転写制御配列 GASE に結合してN型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写を誘導することを見出した。TFE3 をリン酸化・脱リン酸化する酵素に関しては、siRNA を用いた網羅的スクリーニングによって検索中である。

しかしながら、TFE3 経路は主としてN型糖鎖修飾酵素遺伝子の発現を制御しており、O型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写制御には関与していないことがわかった。そこで、プロテオグリカン型糖鎖の阻害剤である xyloside を用いてプロテオグリカン型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写を制御する応答経路(プロテオグリカン経路)を解析したところ、TFE3 経路とは別のプロテオグリカン経路を見出した。プロテオグリカン経路の標的遺伝子としては、NDST2 や GLCE, HS6ST1, HS3ST1, CGGALNACT2, CHST7, CHST11, B3GAT3 などが見出された。これらの標的遺伝子のプロモーター解析を行ったところ、これらの遺伝子の転写を共通に制御する転写制御配列 PGRE を見出した。現在、PGRE のコンセンサス配列を1塩基レベルで明らかにしようとしている。また、PGRE をプローブとして用い、PGRE に結合して転写を制御する転写因子を単離しようとしている。

また、ムチン型糖鎖修飾酵素の阻害剤である BenzylGalNAc を用いてムチン型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写を制御する応答経路(ムチン経路)を解析したところ、標的遺伝子として GALNT18 と SIAT7B を同定した。現在、これらの遺伝子のプロモーターを解析し、転写制御配列を同定しようとしている。興味深いことに、ムチン経路によって TFE3 遺伝子の転写が誘導されることを見出した。更に、TFE3 がムチン経路によって脱リン酸化され、核へ移行することも見出している。来られることは、ムチン経路と TFE3 経路がクロストークしていることを示している。

更に、糖脂質であるグリコスフィンゴリピッド型の糖鎖修飾酵素の阻害剤 PPMP を用いてグリコスフィンゴリピッド型糖鎖修飾酵素遺伝子の発現を制御する応答経路(グリコスフィンゴリピッド経路)を解析したところ、UGCG や ST3GAL5, B4GALT6, B4GALNT1, SIAT7C, SIAT7D, SIAT7E, SIAT7F などの転写が誘導されることがわかった。こちらも現在プロモーター解析を行って転写制御配列を同定しようとしているところである。

(2) ゴルジ体ストレスの分子の実体の解析

ゴルジ体ストレス(ゴルジ体の機能が不足する状態)時に、ゴルジ体内でどのような分子的变化が起こることによってゴルジ体ストレス応答が活性化されるのかについて解

析したところ、ゴルジ体内にシアル酸修飾の材料である CMP-シアル酸を運び込むトランスポーターSLC35A1 の発現を抑制することでゴルジ体ストレス応答の TFE3 経路が活性化されることがわかった。このことは、恐らく N 型糖鎖のシアル酸修飾が不足することが、ゴルジ体ストレス応答の引き金になっていることを示唆している。現在、どのような糖鎖がゴルジ体ストレスとなっているか、解析中である。

(3) 神経系細胞におけるゴルジ体ストレス応答の意義

グリア細胞のうち、アストロサイトが分化する際にゴルジ体ストレス応答の TFE3 経路が活性化されることを見出した。TFE3 の発現を抑制した状態では、アストロサイトの分化が正常に起こらなかった。これらのことは、アストロサイトの分化過程で大量の膜タンパク質や分泌タンパク質が産生され、それを支持するためにゴルジ体ストレス応答が活性化されていること、また、ゴルジ体ストレス応答によってゴルジ体の機能が強化されることがアストロサイトの分化に必須であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

(1) Taniguchi, M., Nadanaka, S., Tanakura, S., Sawaguchi, S., Midori, S., Kawai, Y., Yamaguchi, S., Shimada, Y., Nakamura, Y., Matsumura, Y., Fujita, N., Araki, N., Yamamoto, M., Oku, M., Wakabayashi, S., Kitagawa, H., Yoshida, H. TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.* 40, 13-30, 2015. 査読有 doi: 10.1247/csf.14015.

(2) Sasaki, K. and Yoshida, H. Organelle autoregulation-stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. *J. Biochem.* 157, 185-195, 2015. 査読有 doi: 10.1093/jb/mvv010.

(3) Taniguchi, M. and Yoshida, H. Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 24, 345-350, 2015. 査読有 doi: 10.1097/MNH.0000000000000141.

(4) Uemura, A., Taniguchi, M., Matsuo, Y., Oku, M., Wakabayashi, S. and Yoshida, H. (2013) UBC9 regulates the stability of XBP1, a key transcription factor controlling the ER stress response. *Cell Struct. Funct.* 38, 67-79. 査読有 doi:10.1247/csf.12026

(5) Ariyasu, D., Yoshida, H., Yamada, M. and Hasegawa, Y. (2013) Endoplasmic reticulum stress and apoptosis contribute to the pathogenesis of dominantly inherited isolated GH deficiency due to GH1 gene splice-site mutations. *Endocrinology*, 154, 3228-3239. 査読有 doi: 10.1210/en.2013-1249.

(6) Wakabayashi, S. and Yoshida, H. (2013) The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* e201303010, 2013. 査読有 doi: 10.5936/csbj.201303010.

(7) Komori, R., Taniguchi, M., Ichikawa, Y., Uemura, A., Oku, M., Wakabayashi, S., Higuchi, K. and Yoshida, H. (2012) Ultraviolet A induces the endoplasmic reticulum stress response in human dermal fibroblasts. *Cell Struct. Funct.* 37, 49-53. 査読有 doi:10.1247/csf.11041

〔学会発表〕(計 20 件)

(1) Hiderou Yoshida The Golgi stress response maintains proteostasis in the Golgi apparatus by regulating expression of glycosylation enzymes. EMBO Conference 2015 年 5 月 10 日 イラクリオン (ギリシア)

(2) Hiderou Yoshida Golgi stress response – autoregulatory system controlling Golgi capacity. 第 67 回日本細胞生物学会 2015 年 6 月 30 日 タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

(3) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答による糖鎖修飾の制御 第 34 回日本糖質学会 2015 年 8 月 1 日 東京大学安田講堂 (東京都文京区)

(4) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答研究の現状 第 10 回小胞体ストレス研究会 2015 年 11 月 29 日 淡路夢舞台 (兵庫県淡路市)

(5) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答による糖鎖修飾酵素の発現調節 第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 3 日 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

(6) Hiderou Yoshida ER stress response and Golgi stress response. Congress of Molecular and Cell Biology 2014 2014 年 4 月 26 日 大連 (中華人民共和国)

(7) Hiderou Yoshida Mammalian Golgi stress response regulating Golgi glycosylation. JSCB presymposium 2014 年 6 月 10 日 東大寺文化センター (奈良県奈良市)

- (8) Hiderou Yoshida A novel Golgi stress response pathway that regulates proteoglycan glycosylation. 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 17 日 京都国際会館 (京都府京都市)
- (9) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答による糖鎖修飾の制御 第 37 回日本分子生物学年会 2014 年 11 月 26 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- (10) Hiderou Yoshida The novel response pathway of the mammalian Golgi stress response that regulates glycosylation of proteoglycans in the Golgi apparatus. EMBO Conference 2014 年 10 月 28 日 バルセロナ (スペイン)
- (11) Hiderou Yoshida ER stress response and Golgi stress response. ISN Forefront Symposium 2014 年 3 月 9 日 Charleston (アメリカ合衆国)
- (12) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答における膜タンパク質の品質管理 第 36 回日本分子生物学年会 2013 年 12 月 5 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- (13) 吉田秀郎 細胞分化とゴルジ体ストレス応答 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- (14) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答の分子の実体: 不完全な糖鎖修飾の関与 第 65 回日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 20 日 ウィンク愛知 (愛知県名古屋市)
- (15) Hiderou Yoshida The Golgi stress response – a quality control mechanism in the Golgi stress response. EMBO-EMBL Symposium 2012 年 9 月 19 日 ハイデルベルグ (ドイツ連邦共和国)
- (16) Hiderou Yoshida From the ER stress response to the Golgi stress response Protein and Peptide Conference 2013 2013 年 3 月 20 日 蘇州市 (中華人民共和国)
- (17) 吉田秀郎 Activation mechanism of TFE3, a key transcription factor regulating mammalian Golgi stress response. 奈良先端未来開拓コロキウムシンポジウム 2011 年 5 月 31 日 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市)
- (18) 吉田秀郎 Transcription factor TFE3 is activated by dephosphorylation during mammalian Golgi stress response. 第 63 回日本細胞生物学会大会 2011 年 6 月 26 日 北海道大学 (北海道札幌市)
- (19) Hiderou Yoshida A transcription factor TFE3 is a key regulator of mammalian Golgi stress response. Gordon Research Conference 2011 年 7 月 21 日 ピサ (イタリア)
- (20) 吉田秀郎 Activation mechanism of TFE3, a transcription factor regulating mammalian Golgi stress response. 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日 京都国際会館 (京都府京都市)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
ホームページ
<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem2/index-j.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
吉田 秀郎 (YOSHIDA HIDEROU)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号: 6 0 3 7 8 5 2 8
- (2) 研究分担者
該当なし
- (3) 連携研究者
若林 貞夫 (WAKABAYASHI SADA O)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
研究者番号: 8 0 1 4 8 4 3 6
- 谷口 麻衣 (TANIGUCHI MAI)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
研究者番号: 0 0 4 2 3 8 9 8