

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19370086

研究課題名（和文） ゴルジ体ストレス応答を制御する転写調節機構の解明

研究課題名（英文） Transcriptional regulatory mechanism of Golgi stress response

研究代表者

吉田 秀郎（YOSHIDA HIDEROU）

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：60378528

研究成果の概要：細胞内には様々な細胞小器官が存在し、細胞の機能を分担している。細胞小器官の存在量は細胞の需要に応じてダイナミックに変化するが、その調節機構については明らかではない。本研究では、細胞小器官のひとつであるゴルジ体の存在量の調節機構を解析した結果、制御に関わる転写制御配列と転写制御因子の同定に成功した。本研究成果は、基礎研究のみならずゴルジ体の関与する疾患の病態解明のための基盤となるものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ゴルジ体ストレス、小胞体ストレス、転写因子、糖鎖、小胞輸送、細胞小器官

1. 研究開始当初の背景

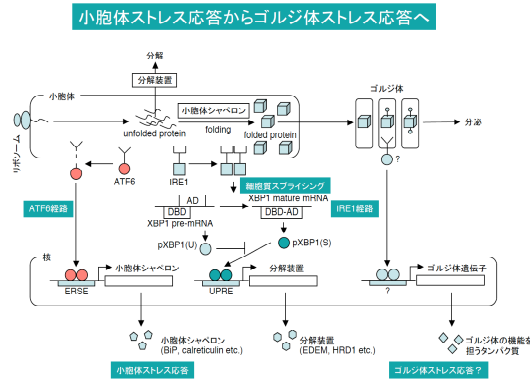
真核生物の細胞には様々な細胞小器官が存在し、細胞の機能を分担している。それぞれの細胞小器官の存在量は細胞の需要に応じて厳密に制御されているが、その調節機構についてはこれまでほとんどわかっていなかった。研究代表者はこれまでに小胞体の量的調節機構である小胞体ストレス応答の分子機構を明らかにし、本研究課題ではゴルジ体の存在量の調節機構であるゴルジ体ストレス応答の分子機構の解明をめざす。ゴルジ体ストレス応答の研究は世界に先駆けた全く新しい研究であり、ゴルジ体ストレス応答と

という言葉も研究代表者の造語である。

2. 研究の目的

本研究課題の最終目標は、ヒトのゴルジ体ストレス応答の分子機構を明らかにすることである。ゴルジ体を形成するための遺伝子は核に存在することから、ゴルジ体にはゴルジ体の機能が充足しているかどうか監視しているセンサー分子が存在しており、機能の不足を感知するとその信号を核に伝達し、核に存在するゴルジ体形成遺伝子の転写を誘導することによってゴルジ体の機能を増強していると考えられる。そこで、本研究課題で

は、これらゴルジ体ストレス応答を制御する因子群を同定し、その性質を解析することによってゴルジ体ストレス応答の基本メカニズムを明らかにすることを目指す。具体的には、ゴルジ体ストレスのセンサー分子や細胞内情報伝達因子、転写因子、転写制御配列を順次同定することを計画した。



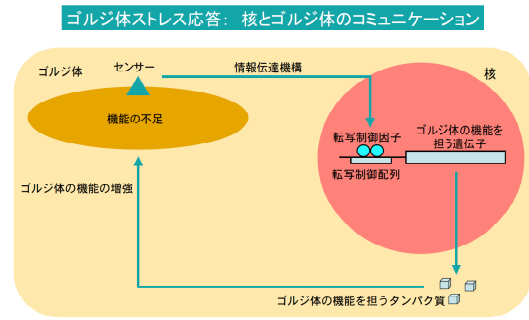
3. 研究の方法

これまでの予備的な研究によってゴルジ体ストレス応答の標的遺伝子（糖鎖修飾酵素、ゴルジ体構造形成因子、小胞輸送因子、ユビキチン関連因子など）をマイクロアレイ解析及び Northern blot 解析によって既に多数同定していたので、これらの遺伝子のプロモーターを解析することによってゴルジ体ストレス応答依存的な転写誘導を制御する転写制御配列を同定した。制御配列のコンセンサス配列の同定は、一塩基ごとに変異を導入し、活性に必須な塩基を同定することによって決定した。

このようにして得られた転写制御配列の情報をもとに one-hybrid スクリーニングを行い、ゴルジ体ストレス応答を制御する転写制御因子を単離した。単離した転写制御因子の発現・活性制御機構を解析することによって、ストレスシグナルの細胞内情報伝達経路を明らかにし、最終的にはゴルジ体ストレスを監視しているセンサー分子を同定しようとした。

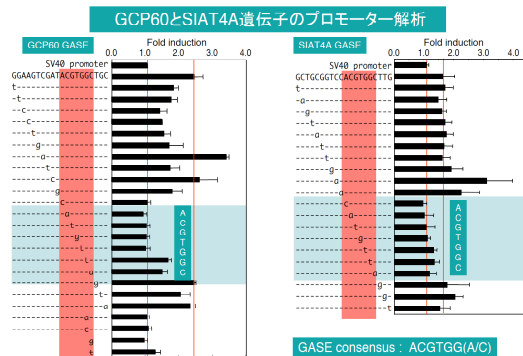
また同時に、遺伝的解析の容易な出芽酵母のゴルジ体ストレス応答機構を解析することにより、ゴルジ体ストレス応答の制御因子を網羅的に同定し、そのヒトホモログを単離することによってヒトのゴルジ体ストレス応答機構の解析の進捗を促進使用と試みた。具体的には、出芽酵母のゴルジ体ストレス応答を制御する転写制御配列にレポーター遺伝子をつないで酵母細胞に導入し、ゴルジ体ストレス存在下でもレポーター遺伝子の発現が誘導されない変異株を単離することに

よってゴルジ体ストレス応答の制御因子を単離しようと考えた。



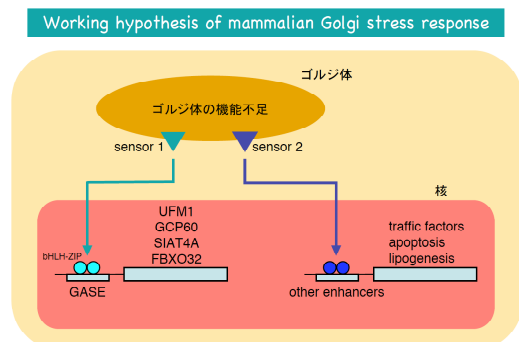
4. 研究成果

糖鎖修飾酵素である SIAT4A 遺伝子のゴルジ体ストレス依存的な転写誘導を制御する転写制御配列 GASE を同定し、そのコンセンサス配列が ACGTGGC であることを明らかにした。興味深いことに、GASE はゴルジ体の構造形成因子である GCP60 やユビキチン様因子である UFM1、ユビキチン関連因子である FBXO32 の転写誘導も制御していることがわかり、ゴルジ体ストレス応答が予想以上に広範な広がりのある応答機構であることを見いだした。



GASE に結合するタンパク質を one-hybrid 法によって検索したところ、bHLH-ZIP 型転写因子である BigMax を単離した。BigMax は酵母細胞でもヒト細胞でも特異的に GASE 配列に結合する。今後は、BigMax の発現や活性、細胞内の局在性などがゴルジ体ストレスによってどのように調節されているかを解析することによって、ゴルジ体ストレスのセンサーから BigMax に至る細胞内情報伝達経路を明らかにする。また、小胞輸送や膜合成に関わる遺伝子の転写誘導は BigMax-GASE 経路とは異なる機構に

よって制御されていることを示唆するデータを得ており、こちらの制御経路についても解析を行う。これら一連の解析によって、ヒトのゴルジ体ストレス応答の全体像を明らかにしたいと考えている。



酵母のゴルジ体ストレス応答の解析に関しては、マイクロアレイ解析及び Northern blot 解析を行うことによってゴルジ体ストレス応答によって転写が誘導される標的遺伝子を複数同定した。標的遺伝子としては、小胞輸送因子やゴルジ体での糖鎖修飾酵素などが同定された。これらの標的遺伝子のプロモーター解析を行い、転写制御配列を同定中である。

現在でもゴルジ体ストレス応答の研究に関しては全く報告が無く、本研究成果は新しい研究領域を切り開く先駆けとなった。今後は得られた成果を基盤としてゴルジ体ストレス応答の基本構造を明らかにすることによって、当該研究領域への他研究者の参入を容易にし、基礎科学分野だけでなく医学・薬学・農学を含めたより大きな研究領域に育っていくことを期待している。

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. *Yoshida, H., Uemura, A. and *Mori, K. (2009) pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. **Cell Struct. Funct.**, 34, 1-10. (*Corresponding author) 査読有

2. Yamamoto, K., Suzuki, N., Wada, T., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R. J., and Mori, K. (2008) Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. **J. Biochem.** 144, 477-486. 査読有
3. Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. and Mori, K. (2008) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. **Cell Struct. Funct.** 33, 75-89. 査読有
4. Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. and Mori, K. (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. **Dev. Cell** 13, 365-376. 査読有
5. Nadanaka, S., Okada, T., Yoshida, H. and Mori, K. (2007) A role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. **Mol. Cell. Biol.** 27, 1027-1043. 査読有
6. Yoshida, H. (2007) ER stress and diseases. **FEBS J.** 274, 630-658. 査読有
7. Yoshida, H. (2007) Unconventional splicing of XBP-1 mRNA in the unfolded protein response. **Antioxid. Redox Signal.** 9, 2323-2333. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. M. Oku, T. Yokoyama, A. Uemura and H. Yoshida. Promoter analysis of target genes of Golgi stress response. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (2008, Cold Spring Harbor, USA).
2. A. Uemura, S. Sugiura, T. Takehara, M. Oku, and H. Yoshida Regulatory factors of a transcription factor XBP1 that controls mammalian unfolded protein response. 日本分子生物学会年会 (第 31 回; 神戸、2008 年)
3. T. Takehara, M. Oku, T. Yokoyama, A. Uemura and H. Yoshida. Target genes of the Golgi stress response in budding yeast. 日本細胞生物学会大会 (第 60 回; 横浜、2008 年)
4. K. Mori, A. Uemura, H. Yoshida pXBP1(U), a Negative Regulator of the Unfolded Protein Response Activator pXBP1(S), Targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated Degradation. 臨床ストレス学会大会 (第 3 回; 秋田、2008 年)
5. M. Oku, T. Yokoyama, A. Uemura and H. Yoshida. Stress response to Golgi-disturbing agents. Gordon Research Conference (2007, Oxford, UK).
6. M. Oku, T. Yokoyama, A. Uemura and H. Yoshida. Golgi-disturbing agents enhance expression of factors involved in membrane traffic. International Symposium of Membrane Traffic (2007, Awaji, Japan).

7. H. Yoshida 「ゴルジ体機能阻害によって転写が誘導される遺伝子の検索」 日本分子生物学会年会 (第 30 回; 横浜、2007 年)

8. H. Yoshida Screening for regulatory factors of mammalian cytoplasmic splicing 日本分子生物学会春期シンポジウム (第 7 回; 淡路島、2007 年)

[図書] (計 1 件)

吉田秀郎 「フレームスイッチプライシング」 分子細胞生物学辞典 (第 2 版) 東京化学同人 (2008)

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.eonet.ne.jp/~biophysics-kyoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 秀郎 (YOSHIDA HIDEROU)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 60378528

(3) 連携研究者

奥 雅弥 (OKU MASAYA)

京都大学・大学院理学研究科・博士 1 年

上村 彰 (UEMURA AYA)

京都大学・大学院理学研究科・修士 2 年

横山 貴章 (YOKOYAMA TAKAAKI)

京都大学・理学部・4 年生

杉浦 周嗣 (SUGIURA SHUJI)

京都大学・理学部・4 年生

竹原 俊之 (TAKEHARA TOSHIYUKI)

京都大学・理学部・4 年生