

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06645

研究課題名(和文) ゲノムワイド・スクリーニングによるゴルジ体ストレス応答制御因子の網羅的同定と解析

研究課題名(英文) Identification of regulatory factors for the mammalian Golgi stress response by GeCKO screen

研究代表者

吉田 秀郎 (Yoshida, Hiderou)

兵庫県立大学・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体ストレス応答は、細胞の需要に応じてゴルジ体の量を増強する恒常性維持期機構である。研究開始時までにTFE3経路とプロテオグリカン経路、ムチン経路、コレステロール経路の4経路を発見していたが、その分子機構は不明な点が多かった。本研究課題では、これらの経路の制御因子を様々な方法によって同定することを目指した。研究の結果、プロテオグリカン経路の転写因子KLFやムチン経路のエンハンサー配列MGSEと転写因子RELA、コレステロール経路の制御因子OSBP1やPITPNB、CDIPT、PI4K111Bを同定した。また、TFE3経路の制御因子として、TJAP1やSDF4、PPP2R1Aなどを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、ゴルジ体ストレス応答の4つの応答経路の分子機構の基本的部分を半分程度明らかにすることができた。ゴルジ体ストレス応答は小胞体ストレス応答とともに細胞小器官の量的調節機構という細胞生物学の根幹に関わる研究課題であることから、今回の研究成果はゴルジ体ストレス応答という研究分野の基盤を構築するとともに、細胞生物学に対して学術的に大いに貢献するものであると考える。また、ゴルジ体ストレス応答は小胞体ストレス応答と同様に様々な疾患に関与しており、高齢化社会で特に問題となっているアルツハイマー病(認知症の一種)などの神経変性疾患の予防・診断・治療の開発のための研究基盤となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The Golgi stress response is a homeostatic mechanism that enhances capacity of Golgi function according to cellular demand. By the time this research was initiated, we had identified four response pathways: the TFE3 pathway, proteoglycan pathway, mucin pathway, and cholesterol pathway; however, the molecular mechanisms of these response pathways remained unclear. In this research project, we tried to identify the regulators of these pathways by various techniques. As a result of our research, we identified the transcription factor KLF in the proteoglycan pathway, the enhancer sequence MGSE and the transcription factor RELA in the mucin pathway, and the regulators OSBP1, PITPNB, CDIPT and PI4K111B in the cholesterol pathway. He also found TJAP1, SDF4, and PPP2R1A as regulators of the TFE3 pathway.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 ストレス プロテオグリカン ムチン コレステロール 神経変性疾患 TFE3 KLF

1. 研究開始当初の背景

細胞内には小胞体やゴルジ体など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厳密に制御されており、必要な時には必要な細胞小器官だけが必要な量だけ増やされる。このような細胞小器官の量的調節機構は細胞が自律的に機能するために必須の機構であり、細胞生物学の根本的命題である。研究代表者は森和俊博士の下で小胞体ストレス応答の基本機構を明らかにした後、ゴルジ体の量的調節機構であるゴルジ体ストレス応答を世界に先駆けて開始し、TFE3 経路とプロテオグリカン経路、ムチン経路という3つの応答経路を発見した。それぞれの応答経路には、(1)ゴルジ体の機能が足りているかどうかを感知するセンサー分子、(2)ゴルジ体の機能を担う遺伝子の転写を誘導する転写因子、(3)転写因子が結合するエンハンサー配列、(4)転写が誘導される標的遺伝子というような制御因子が存在しており、これらの制御因子を同定することによってゴルジ体ストレス応答の分子機構を明らかにすることが可能である。しかしながら、本研究開始時に同定できていた制御因子は、TFE3 経路の転写因子 TFE3 とエンハンサー配列 GASE、プロテオグリカン経路のエンハンサー配列 PGSE と転写因子の KLF2 と KLF4 だけだった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、既知の3つの応答経路に関して未同定の制御因子を同定し、その機能を解析することにした。また、新たな応答経路として、小胞体からゴルジ体へのコレステロール輸送能力を増強するコレステロール経路が存在するかどうか調べ、またその制御因子を同定することにした。

3. 研究の方法

(1) TFE3 経路の制御因子 (センサー分子など) の探索

転写因子 TFE3 は、ゴルジ体の機能が不足した時 (ゴルジ体ストレス時) に脱リン酸化されることによって細胞質から核へと移行する。もしゴルジ体ストレスのセンサー分子の機能を低下させることができれば、TFE3 はゴルジ体ストレス時にも核へ移行しなくなるはずである。そこで、TFE3 と蛍光タンパク質 mNeonGreen の融合タンパク質を発現する細胞株を作製し、そこへ siRNA ライブラリーを導入し、ゴルジ体ストレス時にも TFE3 が核へ移行しなくなるような siRNA をスクリーニングした (東大薬学研究科名黒功博士との共同研究)。その結果、ゴルジ体に局在する TJAP1 や SDF4、脱リン酸化酵素のサブユニットである PPP2R1A などの候補因子を同定することができた。今後は、これらの因子を過剰発現したり、遺伝子破壊を行ってその影響を調べることによって、制御因子であるかどうか解析する予定である。

(2) プロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF2 と KLF4 の解析

KLF2 と KLF4 はプロテオグリカン経路の転写因子であるが、興味深いことにこれらの転写因子の発現自体がゴルジ体ストレス時に誘導されることがわかった。そこで KLF2 と KLF4 遺伝子の転写誘導を制御するエンハンサー配列を MGSE と同様にして解析したところ、KLF2 は TTATATA(N9)AATTT 配列、KLF4 は PGSE 配列によって転写が誘導されていることがわかった。TTATATA(N9)AATTT 配列に結合する転写因子の候補をデータベース JASPAR で検索したところ、FOXO family の転写因子群を見出した。

(3) ムチン経路の制御因子の探索

ムチン経路によって転写が誘導される標的遺伝子のプロモーターの部分欠変異体を作製し、プロモーター上に存在するエンハンサー配列を探したところ、ACTTCC(N9)TCCCA という配列がエンハンサー配列であることがわかった。そこでこの配列を MGSE と命名し、MGSE に結合する転写因子を森和俊博士が開発した酵母 one hybrid 法によって検索したところ、RELA などいくつかの転写因子の候補を得ることができた。

(4) 新規ゴルジ体ストレス応答経路であるコレステロール経路の発見

小胞体で合成されたコレステロールをゴルジ体 (トランスゴルジ) に輸送することもゴルジ体の重要な機能である。小胞体からゴルジ体への輸送は OSBP によって担われていることが知られていたが、細胞が大量のコレステロールを産生するようになった時、OSBP の発現が増えるかどうかは知られていなかった。そこで本研究では、OSBP の阻害剤である OSW-1 を用いて OSBP の機能が不足する状態 (ゴルジ体ストレス状態) を人工的に作り出したところ、OSBP の発現は増加しなかったが、OSBP に非常によく似た OSBP2 の発現が誘導された。OSBP2 がコレステロールを輸送するのかどうかは現在解析中である。OSW-1 は抗がん活性を持っていることから、OSW-1 はゴルジ体ストレスによって細胞死を誘導していると考えられる (東京農工大の養玉田正文博士・櫻井香里博士との共同研究)。そこで、破壊すると OSW-1 による細胞死が起こらなくなる遺伝子を GeCKO スクリーニング (哺乳類細胞での順遺伝的スクリーニング: 国立感染症研究所の花田賢太

郎博士・山地俊之博士との共同研究)によって検索したところ、PITPNB や CDIPT、PI4K3B、PI4K2A、C10orf76 などいずれもトランスゴルジでの PI4P 合成に関与する遺伝子を見出した。OSBP はコレステロールを小胞体からゴルジ体へ輸送する際、ゴルジ体の PI4P を小胞体へ対向輸送することが知られている。従って、細胞を OSW-1 で処理すると、トランスゴルジに PI4P が蓄積し、そのことが細胞死を誘導するのではないかと考えた。これらの PI4P 代謝関連遺伝子を破壊すると、細胞死が抑制されるだけでなく OSBP2 の転写誘導も抑制されることから、細胞死と転写誘導が同一の応答経路によって制御されていることがわかった。

4. 研究成果

哺乳類のゴルジ体ストレス応答の分子機構を半分以上明らかにすることができた。

- (1) TFE3 経路のセンサー分子候補を見出した。
- (2) プロテオグリカン経路の転写因子 KLF2/4 の転写誘導を制御するエンハンサーを同定し、転写因子の候補を見出した。
- (3) ムチン経路のエンハンサーを同定し、転写因子の候補を見出した。
- (4) コレステロール経路を発見し、コレステロール経路による転写誘導と細胞死にトランスゴルジでの PI4P 代謝が重要であることを見出した。

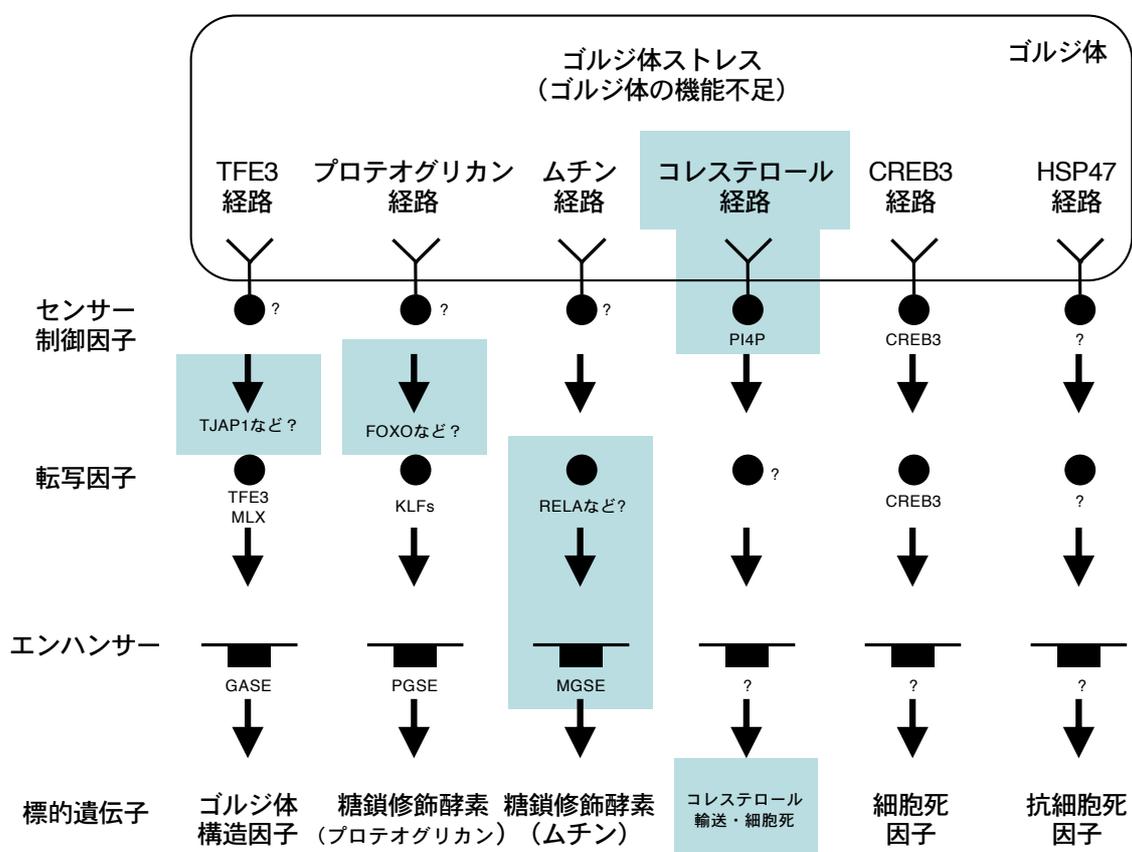


図1 哺乳類のゴルジ体ストレス応答
本研究によって明らかにした部分を水色で示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sasaki Kanae, Komori Ryota, Taniguchi Mai, Shimaoka Akie, Midori Sachiko, Yamamoto Mayu, Okuda Chiho, Tanaka Ryuya, Sakamoto Miyu, Wakabayashi Sadao, Yoshida Hiderou	4. 巻 44
2. 論文標題 PGSE Is a Novel Enhancer Regulating the Proteoglycan Pathway of the Mammalian Golgi Stress Response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 1~19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.18031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Mayu, Sasaki Kanae, Fukutani Yosuke, Yoshida Hiderou, Ohsawa Ikuroh, Yohda Masafumi, Sakurai Kaori	4. 巻 29
2. 論文標題 Anticancer saponin OSW-1 is a novel class of selective Golgi stress inducer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1732~1736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Kanae, Yoshida Hiderou	4. 巻 44
2. 論文標題 Organelle Zones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 85~94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Kanae, Yoshida Hiderou	4. 巻 593
2. 論文標題 Golgi stress response and organelle zones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2330~2340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jamaludin Mohamad Ikhwan, Wakabayashi Sadao, Taniguchi Mai, Sasaki Kanae, Komori Ryota, Kawamura Hirota, Takase Hayataka, Sakamoto Miyu, Yoshida Hiderou	4. 巻 44
2. 論文標題 MGSE Regulates Crosstalk from the Mucin Pathway to the TFE3 Pathway of the Golgi Stress Response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 137 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計19件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 坂本美憂、三宅衣織奈、小森亮太、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF2の発現制御機構
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅衣織奈、坂本美憂、小森亮太、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF4の発現制御機構
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木桂奈江、森下史、足立拓弥、渡部雄斗、若林貞夫、櫻井香里、養王田正文、山地俊之、花田賢太郎、吉田秀郎
2. 発表標題 抗がん剤 OSW-1によるゴルジ体ストレス応答における PtdIns transfer protein beta (PITPNB)の機能解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田秀郎
2. 発表標題 哺乳類ノックアウト細胞ライブラリーを用いた薬剤の作用機序の解析 ゴルジ体ストレス応答での応用例
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会産学連携委員会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田秀郎
2. 発表標題 新規技術によるゴルジ体ストレス応答の制御因子の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小森亮太、岩崎洸介、岡本明日香、谷口麻衣、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答TFE3経路の活性化機構
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中梓、坂本美憂、田中隆也、小森亮太、谷口麻衣、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する転写制御配列PGSEと転写因子KLF familyの同定
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本美憂、田中梓、三宅衣織奈、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する転写因子KLF2とKLF4の発現制御機構と活性化機構
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiderou Yoshida
2. 発表標題 ER stress response and Golgi stress response
3. 学会等名 KSMCB 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanae Sasaki and Hiderou Yoshida
2. 発表標題 The regulatory mechanism of the mammalian Golgi stress response
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田秀郎
2. 発表標題 プロテオグリカン型及びムチン型糖鎖修飾を担うオルガネラ・ゾーンの増強機構
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiderou Yoshida
2. 発表標題 ER stress response and Golgi stress response
3. 学会等名 The Second Symposium on Cellular Response to Organelle Stress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiderou Yoshida
2. 発表標題 Golgi stress response - a homeostatic mechanism that augments functional zones in the Golgi apparatus
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田秀郎
2. 発表標題 小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答によるゴルジ体機能ゾーンの増強機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jamaludin Mohamad Ikhwan, Hirotada Kawamura, Hayataka Takase, Kanae Sasaki, Sadao Wakabayashi and Hiderou Yoshida
2. 発表標題 Identification of MGSE as a Novel Enhancer Regulating a Crosstalk between the Mucin and TFE3 pathways in the Mammalian Golgi Stress Response
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小森亮太、谷口麻衣、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答TFE3経路の活性化機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 足立拓弥、渡部雄斗、櫻井香里、養王田正文、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答の新規応答経路であるコレステロール経路の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中梓、坂本美憂、田中隆也、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する転写制御配列PGSEと転写因子KLF familyの同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Hiderou Yoshida, University of Hyogo
<https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem2/index-j.html>
Laboratory of Molecular Biochemistry
<https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem2/index-j.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会	開催年
The Second Symposium on Cellular Response to Organelle Stress	2019年～2019年

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	University of Ulsan			
カナダ	University of Guelph			