

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07353

研究課題名(和文)トランスゴルジ膜が担う新たな細胞機能GOMEDの解析

研究課題名(英文)Analysis of a new intracellular proteolysis mechanism GOMED using Golgi membrane

研究代表者

荒川 聡子(Arakawa, Satoko)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：90415159

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)：我々はゴルジ体のtrans膜がゴルジ体から乖離し、分泌タンパク質などを分解する細胞機能を発見し、これをGOMEDと命名した。

本研究で(1) GOMEDに関わる因子としてWipi3の同定に成功した。そして(2)分泌阻害により細胞質中に散在していたWipi3がゴルジ体のtrans膜に局在化すること、(3)その働きにより、trans膜が湾曲化し隔離膜となることを見出した。さらに、Wipi3神経細胞特異的欠損マウスの解析から、(4)GOMEDの不全により鉄代謝・輸送を担うセルロプラスミンがブルキンエ細胞に蓄積し、鉄も蓄積していること、(5)神経変性疾患を惹起することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常のAtg5/Atg7を用いるオートファジーではER膜から隔離膜が形成されるが、GOMEDはそれとは異なり、ゴルジ体のトランス膜を用いるなど、隔離膜の由来が異なり、また通常のオートファジーとは異なる分子メカニズムを用いていることが判明した。さらに生体内においても、通常のオートファジーとは異なる生理的機能を持つこと、特に、脳の神経細胞において、鉄蓄積を防いでいるということを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：GOMED is an Atg5/Atg7-independent type of autophagy that contributes to various physiological events. In this study, we identified Wipi3 as a molecule essential for GOMED.

Wipi3 altered the distribution from the cytoplasm to the trans-Golgi membrane and was indispensable for the formation of isolated membranes.

Next, we analyzed neuron-specific Wipi3-deficient mice, which showed behavioral abnormalities. In the cerebellum, neuronal cells exhibited an accumulation of iron and ceruloplasmin and these caused the neuronal degeneration. Based on these findings, GOMED appears to play a critical role in neuronal cell maintenance.

研究分野：組微細構造生物学

キーワード：GOMED Golgi neurodegeneration ceruloplasmin Autophagy Cell Death

1. 研究開始当初の背景

真核生物のオルガネラであるゴルジ体は、*cis*, *medial*, *trans* の各槽から構成されており、糖鎖付加やリン酸化、ペプチド切断などの分子修飾を行うことによって、細胞外へのタンパク質分泌や、リソソーム、エンドソームなどへのタンパク質輸送を担っている。これまで、*cis*, *medial*, *trans* の各槽は、段階的に分子修飾を加える一体化したものとして考えられてきた。

しかしながら、我々はゴルジ体から細胞外、細胞膜に向かうタンパク質の運搬に滞りが生じると、(1)*trans* ゴルジ膜のみが大きく変形し、*cis*, *medial* から乖離すること、(2)この *trans* ゴルジ膜は、行き場を失ったタンパク質を包み込むこと、(3)内容物は、リソソーム酵素によって分解されることを発見し、この新たに発見した細胞機能を **Golgi-mediated degradation pathway (GOMED)** と命名した(EMBO J, 2016)。さらに GOMED は、①細胞外や細胞膜への分泌経路を遮断したときに惹起される細胞機能であること、②酵母細胞から哺乳動物細胞まで保有する普遍的な機能であることも見出した。

2. 研究の目的

GOMED という新たなゴルジ体機能を理解するため、①どのようにして *trans* 膜が *cis*, *medial* から乖離して GOMED が実行されるか？ ② この時、糖鎖付加や分子運搬などのゴルジ体機能はどうか？ ③ GOMED はいかなる細胞で、どのような生理的な役割を果たしているか？ を明らかにし、GOMED の実行機能や生体での役割、重要度を明らかにすることを目的と研究を進めた。

3. 研究の方法

- (1) はじめに GOMED に関わる必須遺伝子を、酵母の遺伝学から同定する。
- (2) 次に同定した遺伝子のうち、哺乳動物の相同遺伝子である遺伝子を欠損させた細胞を作製し、微細構造解析、生化学および細胞生物学的解析を行うことで、その分子の GOMED への関与、及びその機能を明らかとする。
- (3) 最後に、同定した遺伝子の神経特異的欠損マウスを作製・解析を行い生理機能を明らかとする。

4. 研究成果

我々は、酵母細胞に抗真菌薬アンフォテリシン B1 を添加すると、GOMED を誘導できることを明らかにしている(EMBO 2016)。そこで、本研究では最初にこの系を用いて、GOMED の必須遺伝子をスクリーニングした。その結果、HSV2 遺伝子を同定することに成功した。コントロールの細胞においては、アンフォテリシン B1 を添加すると、はじめにゴルジ体の層板構造が形成され、その後トランス膜が湾曲し、内容物を含むオートファゴソーム様構造となったのち、液胞膜と融合する(図1上段)。

ここで、HSV2 を欠損させた細胞においては、ゴルジ体の層板形成がみられるものの、ゴルジ膜が膨潤しその後の膜の湾曲がみられず、隔離膜が形成されない(図1下段)。

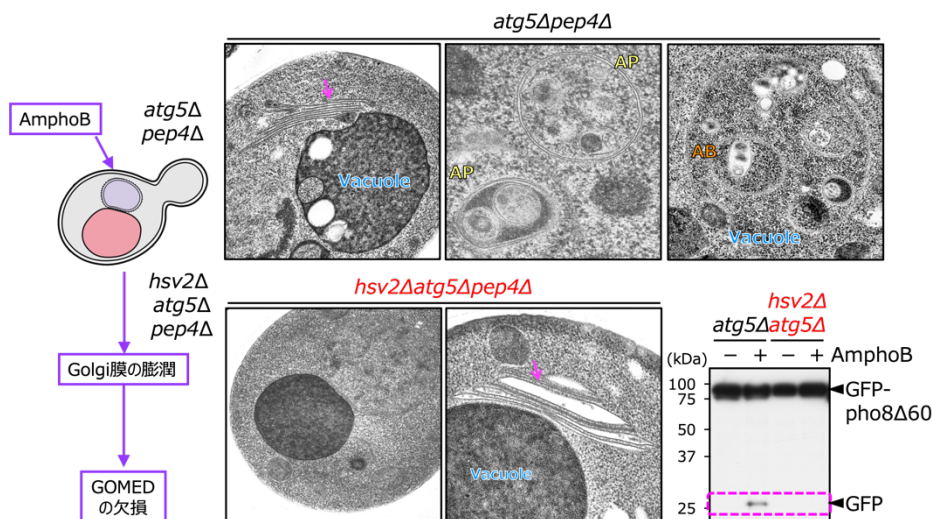


図1. *hsv2*欠損細胞では、ゴルジ体の層板が膨潤し湾曲せずオートファゴソームが形成できない

次に、酵母の Hsv2 の哺乳動物相同遺伝子である Wipi3 を欠損させた細胞を作製し、GOMED 誘導刺激である抗がん剤のエトポシドを添加した。そうしたところ、哺乳動物細胞においても GOMED が誘導されないことが電子顕微鏡観察から明らかとなった(図2)。GOMED 機構は、従来の ER 膜を用いるオートファジー機構とは異なり、ゴルジ体膜のトランス膜を用いて隔離膜形成を行うが、Wipi3 の欠損細胞では、ゴルジ体膜が膨潤しており、トランス膜がゴルジ体から分離・湾曲化して分解物を隔離する過程が見られないことがわかった(図2)。

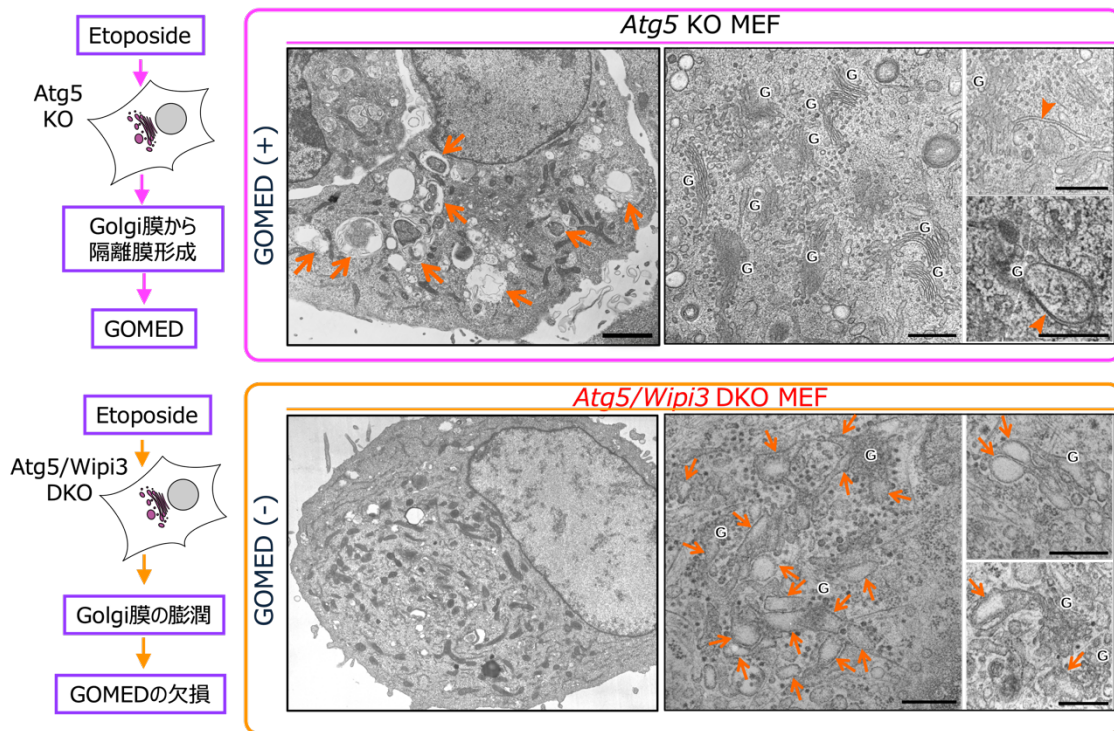


図2. Wipi3欠損細胞ではゴルジ膜が膨潤しており、隔離膜の形成ができない

次に、Wipi3 の細胞内局在について、密度勾配遠心法により分画し生化学的解析を行った。各フラクションを調べた結果、トランスゴルジマーカがフラクション4から6に多く存在し、そのフラクションではエトポシド添加後、時間経過とともにWipi3の量が増加していた(図3上段)。トランスゴルジマーカが最も多いフラクション5を電顕観察したところ、エトポシドの添加前では脂質二重層でできた単位膜構造を持つ小胞や空胞が多く見つかったが、内腔には膜構造は観察されなかった。一方、GOMED 誘導後は、細胞内で見られる構造と同様、オルガネラなどの内容物を含んだ二重膜構造や、分解物の入った膜構造が出現していた(図3中段)。

さらに免疫電顕法により、湾曲した膜やオルガネラを包んだ膜構造上に Wipi3 やトランスゴルジマーカが局在していることが明らかとなった(図3最下段)。

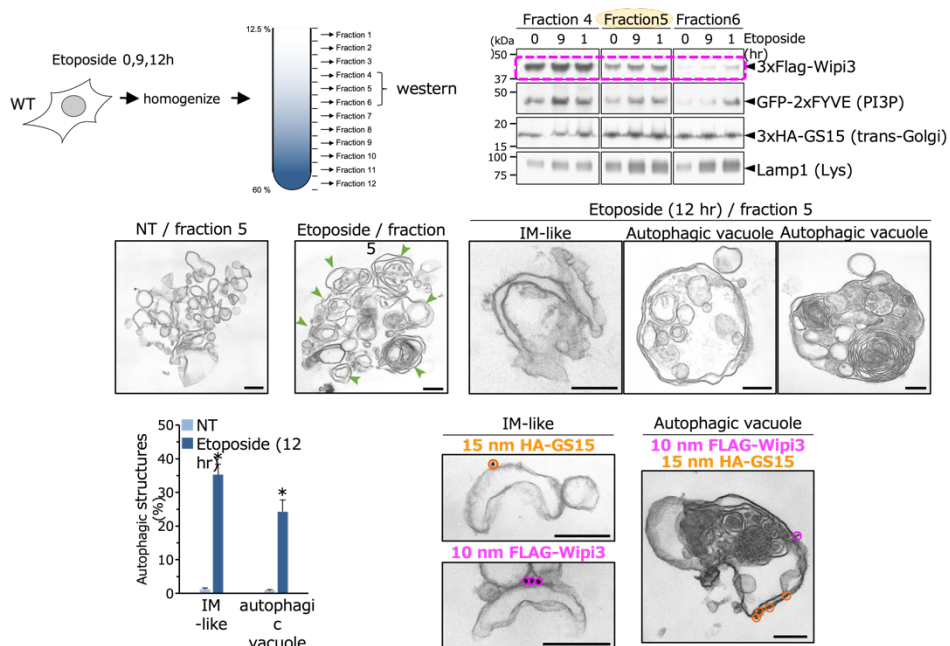


図3. Wipi3はetoposideによりtrans Golgi膜に局在、オートファジー様構造にも局在する

以上により、GOMEDが誘導されるとWipi3が細胞質からトランスゴルジ膜上に移動し、その膜を変形させて基質を隔離する隔離膜となっていることがわかった。

次に、マウスの神経細胞でのWipi3を欠損させたマウスを作製した。そうしたところ、このマウスは生後10週齢頃より、行動異常が見られるようになり、バランスがとれず、歩行障害がみられ、ロータリーロッド試験の結果でも運動失調となっていた(図4)。

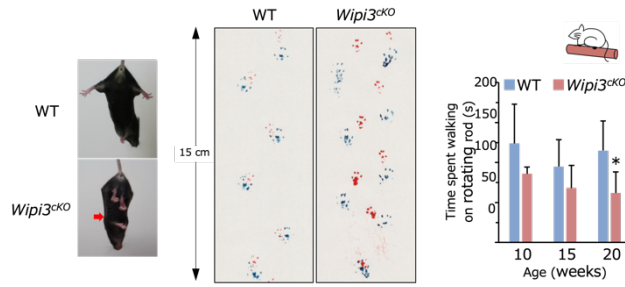


図4. Wipi3-nestin Cre KOマウスは神経変性疾患様症状を呈する

このマウスより脳切片を作製すると、小脳において細胞死が観察された(図5)。さらに電子顕微鏡で観察すると、脱落前のプルキンエ細胞ではゴルジ体の形態異常がみられ、層板構造が崩れていること、そのためGOMEDが不全になっていることが明らかとなった。

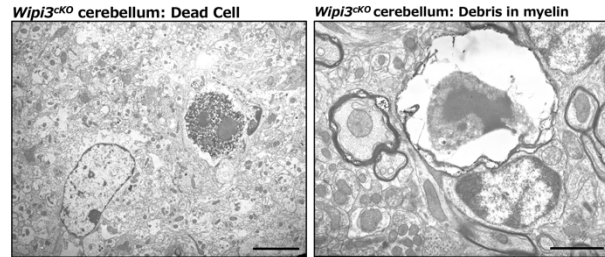


図5. Wipi3-cKOマウス小脳では神経細胞死が起きている

さらにこのマウスでは、小脳の細胞中に鉄および鉄輸送タンパクで鉄代謝に関与するセルロプラスミンが蓄積していることも判明した(図6)。このことから、セルロプラスミンはGOMEDで分解されるタンパク質であり、この分解不全により鉄沈着が認められることがわかった。実際、セルロプラスミンを細胞に強制発現させると、GOMED依存的に分解されていた。以上の解析から、神経細胞において、GOMEDが過剰セルロプラスミンを分解することで、鉄沈着を防ぎ、神経細胞の維持に寄与していることがわかった。

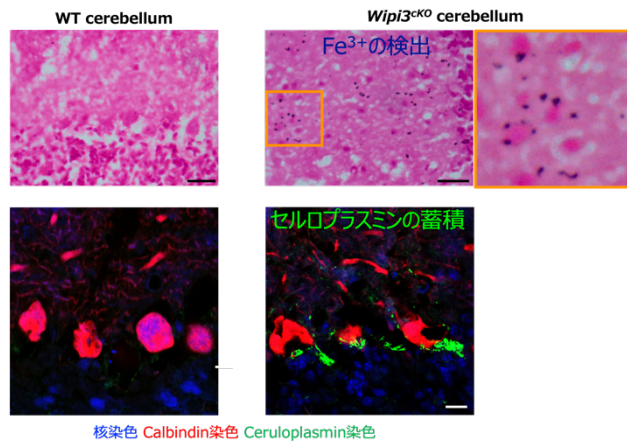


図6. Wipi3 cKOマウス的小脳では鉄とセルロプラスミンが蓄積

また、従来型オートファジーに必須のAtg7を欠損したマウスの脳でも同様の神経機能異常が見られるが、神経細胞の内部構造はWipi3で観察される蓄積物の形態や、オルガネラの異常が異なっており、各々異なる機構で神経機能を維持していることが考えられた(図7)。最後に、Wipi3, Atg7の両者を欠損したマウスを作製したところ、生後28日で死亡し、単独の遺伝子欠損マウスよりもはるかに重篤な神経変性を示すことがわかり、このことから、従来型オートファジーとGOMEDは、異なる機構で神経細胞を維持していることが明らかとなった。

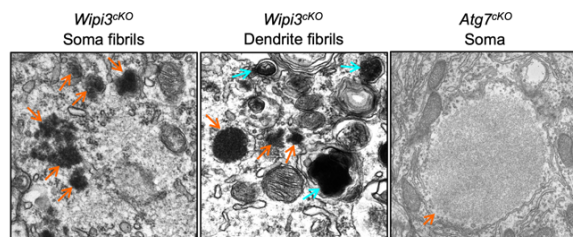


図7. 観察される蓄積物がWipi3 cKO (GOMED不全) Atg7cKO (従来型Autophagy不全) マウスで異なる

以上の成果を Nature Commun.11(1), 5311, 2020 に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Akihito Kira, Ichiko Tatsutomi, Keisuke Saito, Machiko Murata, Izumi Hattori, Haruna Kajita, Naoko Muraki, Yukako Oda, Saya Satoh, Yuta Tsukamoto, Seisuke Kimura, Kenta Onoue, Shigenobu Yonemura, Satoko Arakawa, Hiroki Kato, Tsuyoshi Hirashima, Kohki Kawane	4. 巻 58
2. 論文標題 Apoptotic extracellular vesicle formation via local phosphatidylserine exposure drives efficient cell extrusion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dev Cell	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2023.05.008	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 該当する
1. 著者名 IWAMOTO TATSUYA, SHIMIZU SHIGEOMI, TAJIMA-SAKURAI HAJIME, YAMAGUCHI HIROFUMI, NISHIDA YUYA, ARAKAWA SATOKO, WATADA HIROTAKA	4. 巻 69
2. 論文標題 Inhibition of Insulin Secretion Induces Golgi Morphological Changes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 42 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14789/jmj.JMJ22-0040-0A	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 Sakurai Hajime Tajima, Arakawa Satoko, Noguchi Saori, Shimizu Shigeomi	4. 巻 12
2. 論文標題 FLIP-based autophagy-detecting technique reveals closed autophagic compartments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-26430-5	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 Matsuda Hiroki, Nibe-Shirakihara Yoichi, Tamura Akiko, Aonuma Emi, Arakawa Satoko, Otsubo Kana, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiiichiro, Shimizu Shigeomi, Ma Averil, Watanabe Mamoru, Uo Motohiro, Okamoto Ryuichi, Oshima Shigeru	4. 巻 592
2. 論文標題 Nickel particles are present in Crohn's disease tissue and exacerbate intestinal inflammation in IBD susceptible mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.111	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 Sato Shigeto, Noda Sachiko, Torii Satoru, Amo Taku, Ikeda Aya, Funayama Manabu, Yamaguchi Junji, Fukuda Takahiro, Kondo Hiromi, Tada Norihiro, Arakawa Satoko, Watanabe Masahiko, Uchiyama Yasuo, Shimizu Shigeomi, Hattori Nobutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Homeostatic p62 levels and inclusion body formation in CHCHD2 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 443 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab057	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 Yamaguchi Hirofumi, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Kimiko, Katoh Kaoru, Miyake Koichi, Miyake Noriko, Fujikake Nobuhiro, Sakurai Hajime Tajima, Arakawa Satoko, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18892-w	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 Torii Satoru, Yamaguchi Hirofumi, Nakanishi Akira, Arakawa Satoko, Honda Shinya, Moriwaki Kenta, Nakano Hiroyasu, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a phosphorylation site on Ulk1 required for genotoxic stress-induced alternative autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15577-2	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 Honda Shinya, Arakawa Satoko, Yamaguchi Hirofumi, Torii Satoru, Tajima Sakurai Hajime, Tsujioka Masatsune, Murohashi Michiko, Shimizu Shigeomi	4. 巻 432
2. 論文標題 Association Between Atg5-independent Alternative Autophagy and Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 2622 ~ 2632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.01.016	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 Kato Hironori, Okabe Kohki, Miyake Masato, Hattori Kazuki, Fukaya Tomohiro, Tanimoto Kousuke, Beini Shi, Mizuguchi Mariko, Torii Satoru, Arakawa Satoko, Ono Masaya, Saito Yusuke, Sugiyama Takashi, Funatsu Takashi, Sato Katsuaki, Shimizu Shigeomi, Oyadomari Seiichi, Ichijo Hidenori, Kadowaki Hisae, Nishitoh Hideki	4. 巻 3
2. 論文標題 ER-resident sensor PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.201900576	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 Kato Yuji, Arakawa Satoko, Terasawa Kazue, Inokuchi Jin-ichi, Iwata Takanori, Shimizu Shigeomi, Watabe Tetsuro, Hara-Yokoyama Miki	4. 巻 30
2. 論文標題 The ceramide analogue N-(1-hydroxy-3-morpholino-1-phenylpropan-2-yl)decanamide induces large lipid droplet accumulation and highlights the effect of LAMP-2 deficiency on lipid droplet degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126891 ~ 126891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.126891	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Satoko Arakawa, Hirofumi Yamaguchi and Shigeomi Shimizu
2. 発表標題 Discovery of Alternative Autophagy and its Physiological Role in the Brain
3. 学会等名 Annual Meeting of the Japanese Society of Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoko Arakawa, Hirofumi Yamaguchi, Shigeomi Shimizu
2. 発表標題 Wipi3 is essential for Golgi membrane-associated degradation (GOMED) pathway and its loss causes neurodegeneration
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒川聡子、清水重臣
2. 発表標題 電子顕微鏡からみた細胞死 アポトーシス・オートファジー細胞死がおきないときの細胞死形態とネトーシス
3. 学会等名 第2回細胞死コロキウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoko Arakawa, Hirofumi Yamaguchi, Shigeomi Shimizu
2. 発表標題 The role of acrosome and nuclear pore on the changes of physical properties and nuclear morphology of sperm chromatin
3. 学会等名 A Genome modality Understanding physical properties of the genome, Online meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒川聡子・山口啓史・清水重臣
2. 発表標題 オルタナティブ・オートファジー (GOMED) の生理機能解析
3. 学会等名 第14回オートファジー研究会、新学術領域マルチモードオートファジー第3回班会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoko Arakawa, Shinya Honda, Hirofumi Yamaguchi and Shigeomi Shimizu
2. 発表標題 The membrane origin of mitophagy after enucleation in red blood cell.
3. 学会等名 International Symposium for Female Researchers in Chromatin Biology (ISFRCB) 2020 (Satellite Symposium of the 43rd MBSJ), Session 2 "Scientific talks by young female researchers in epigenetics" (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://reins.tmd.ac.jp/html/100007614_ja.html#item_kaknh_bnrui_2
<https://orcid.org/0000-0002-4375-1643>
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=26432550000>
<https://publons.com/researcher/3607080/satoko-arakawa>

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0件

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
---------	---------