

令和 7 年 5 月 1 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K06208

研究課題名（和文）ゴルジ体ストレス応答機構の全容解明

研究課題名（英文）Full Elucidation of the Golgi Stress Response Mechanism

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経路の制御因子を網羅的に同定することが本研究課題の目的である。TFE3経路を活性化するプロテアーゼOMA1を同定、プロテオグリカン経路を制御する転写因子FOXL2を同定、ムチン経路を制御する転写因子RelAを同定した。また、PI4P経路による細胞死にBAXとBAK、及びcaspase-3が関与していることを明らかにした。このことは、ゴルジ体からミトコンドリアへ細胞死シグナルが伝達されることを示している。既に、ゴルジ体とミトコンドリア間の膜接触部位を同定しており、この膜接触部位がPI4P経路による細胞死誘導のシグナルを伝達しているかどうか現在検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゴルジ体ストレス応答経路のすべての制御因子を同定することはできなかったが、転写因子FOXL2やアポトーシス制御因子BAXやBAK、caspase-3などを同定することができた。これらの成果はゴルジ体ストレス応答という学術的に重要な問題に大きく貢献するものであるとともに、新規の抗がん活性化化合物であるOSW-1がゴルジ体ストレスを介してがん細胞を殺すという新しい機序の抗がん活性化化合物であることを明らかにするものであり、医学の分野にも大きく貢献できたと考えている。これらの成果の一部は、アメリカ生化学分子生物学会の学会誌であるJournal of Biological Chemistryに上梓した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research project is to comprehensively identify the regulators of the Golgi stress response pathway. We identified (1) protease OMA1, which activates the TFE3 pathway, (2) transcription factor FOXL2, which regulates the proteoglycan pathway, and (3) transcription factor RelA, which regulates the mucin pathway. In addition, (4) BAX and BAK and caspase-3 were implicated in cell death by the PI4P pathway. This indicates that cell death signals are transduced from the Golgi to mitochondria. We have already identified membrane contact sites between the Golgi and mitochondria and are currently investigating whether these sites transmit signals for cell death induction by the PI4P 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 PI4P

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞小器官の量的調節機構は細胞生物学の重要問題の一つであるが、核の量的調節機構(細胞周期)以外はほとんど解析されてこなかった。研究代表者はこの問題に果敢に挑戦し、小胞体の量的調節機構(小胞体ストレス応答)を明らかにするとともに、ゴルジ体の量的調節機構(ゴルジ体ストレス応答)の研究に着手した。

2. 研究の目的

これまでの研究から、ゴルジ体ストレス応答の制御因子をいくつか同定したが、センサー分子などのように従来の方法では同定が困難なものがまだ同定できていない。そこで本研究ではゴルジ体ストレス応答の制御因子をすべて同定し、同定した制御因子の活性化機構を明らかにすることによって、ゴルジ体ストレス応答の分子機構の全容を解明することにした。更に、同定した制御因子の遺伝子破壊細胞やマウスを作製してその表現型を解析することで、ゴルジ体ストレス応答の生理学的意義を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

哺乳類細胞を用いる新しい順遺伝学的方法 GeCKO (Genome-wide CRISPR Knockout) スクリーニングを行うことによって、ゴルジ体ストレス応答の制御因子を網羅的に検索し、同定することを試みた。

4. 研究成果

ゴルジ体と小胞体の間に存在する膜接触部位では、脂質輸送タンパク質である OSBP が PI4P (phosphatidylinositol 4-phosphate) をゴルジ体から小胞体へ輸送している。PI4P はトランスゴルジ領域から輸送小胞が出芽するために必要であり、トランスゴルジ領域に存在する PI4P 合成酵素 (PI4KIIIB) によって PI (phosphatidylinositol) から合成されている。OSBP はこの PI4P を小胞体へ輸送するが、その生物学的意義はよくわかっていなかった。OSBP の機能が不足すると、OSBP と同じ機能を持つ OSBP2 の発現がゴルジ体ストレス応答の PI4P 経路によって誘導され、ゴルジ体から小胞体へ PI4P を輸送する機能を増強される。OSBP と OSBP2 の機能を OSW-1 という化合物によって両方阻害すると、ゴルジ体が断片化するとともにゴルジ体でのタンパク質の糖鎖修飾が阻害され、細胞死が起こることが知られていたが、その分子機構も不明であった(東京農工大学の養田正文博士と櫻井香里博士との共同研究)。

そこで、OSW-1 処理によっても細胞死が起こらなくなる変異体細胞を GeCKO スクリーニングによって検索し、ゴルジ体ストレスによる細胞死誘導に関与する遺伝子を同定することにした(国立感染症研究所の花田賢太郎博士と山地俊之博士(現順天堂大学薬学部)との共同研究)。スクリーニングの結果、PI4P の合成酵素である PI4KIIIB や PI4P 合成の材料となる PI を小胞体からゴルジ体へ輸送する PITPNB、CDP-DAG から PI を新規合成する酵素である CDIPT など PI4P 合成に必要な遺伝子を破壊すると、ゴルジ体ストレスによる細胞死が起こらなくなることを見出した(図1)。このことは、ゴルジ体に PI4P が過剰蓄積することが細胞死誘導の原因となっていることを示している。実際、ゴルジ体ストレス時(OSW-1 処理時)には、ゴルジ体に PI4P が過剰蓄積することも見出した(図2)。

これらの遺伝子(PI4KIIIB や PITPNB、CDP-DAG など)の遺伝子を破壊すると細胞はゴルジ体ストレスによって死にくくなるだけでなく、ゴルジ体の断片化やゴルジ体での糖鎖修飾も正常化した。また、ゴルジ体ストレスによる OSBP2 の発現誘導も見られなくなった(図3)。これらのことは、ゴルジ体に PI4P が蓄積すると、ゴルジ体の断片化や糖鎖修飾の異常が引き起こされ、その結果細胞死が誘導されている可能性が示された。また OSBP2 はこのような異常事態(PI4P の過剰蓄積)を感知して発現誘導を受けていることがわかった。

ゴルジ体ストレスによる細胞死誘導の分子機構を解析したところ、ゴルジ体ストレスによって caspase-3 が活性化すること、caspase の阻害剤で処理すると、ゴルジ体ストレスによる細胞死が抑制されること、ミトコンドリアに局在するアポトーシス制御因子である BAK と BAX の 2 重欠損変異株ではゴルジ体ストレスによる細胞死が抑制されることから、ゴルジ体ストレスによる細胞死は、ミトコンドリア経由の内在性アポトーシスであることがわかった。ゴルジ体からミトコンドリアに細胞死のシグナルを伝達する機構として、ゴルジ体とミトコンドリア間に存在する膜接触部位を経由している可能性があるが、そのような膜接触部位はこれまで知られていなかった。そこでゴルジ体のタンパク質とミトコンドリアのタンパク質に 2 つに分断した GFP タンパク質(split GFP: 山形大学理学研究科の田村康博士との共同研究)を融合して細胞に発現させたところ、ゴルジ体とミトコンドリアの接触領域と思われるところで蛍光を観察した。このことは、ゴルジ体とミトコンドリア間にこれまで知られていなかった膜接触部位が存在

することを示唆している。今後は、この膜接触部位を構成している因子を split TurboID によって網羅的に同定するとともに、同定した膜接触部位の因子を破壊した細胞株を樹立し、ゴルジ体ストレスによる細胞死シグナルがこの膜接触部位を介して伝達されているかどうか調べる予定である。

OSW-1 (図4) は、東京薬科大学の三巻祥浩博士によってユリ科 (現在はキジカクシ科) の *Ornithogalum saundersiae* から単離された化合物であり、がん細胞に対して非常に特異性の高い抗がん活性を有しているが、その作用機序は不明であった。本研究課題によって OSW-1 の作用機序が解明され、ゴルジ体を標的とする新しい抗がん剤の開発に大きく貢献することができた。

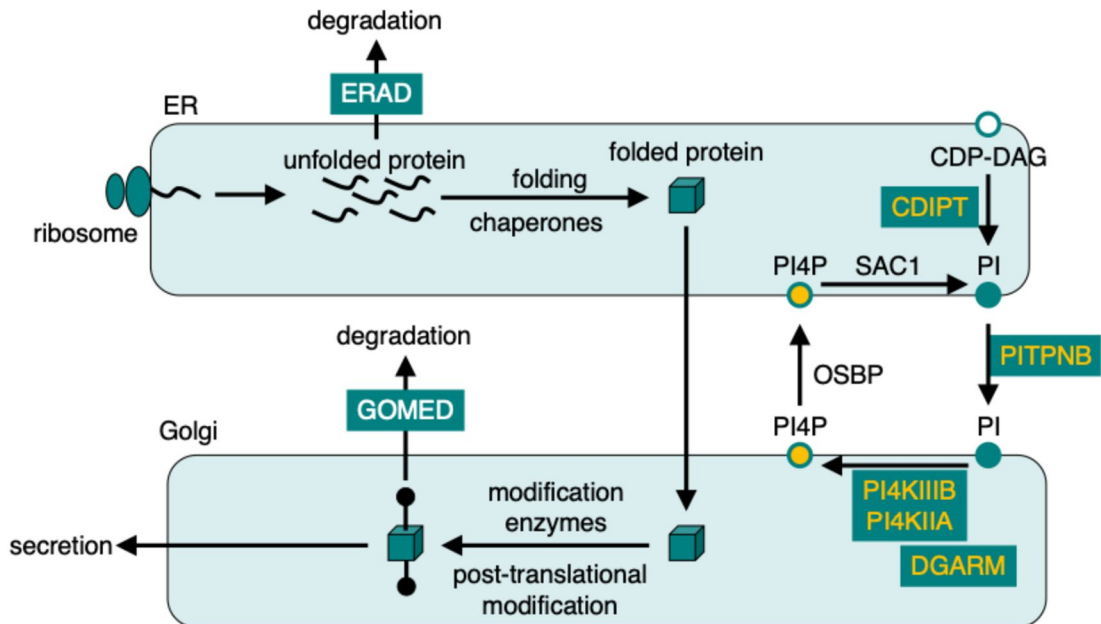


図1 GeCKOスクリーニングによって同定した遺伝子群
黄色文字で示した遺伝子を破壊すると、ゴルジ体ストレス(OSW-1処理)による細胞死が抑制される。

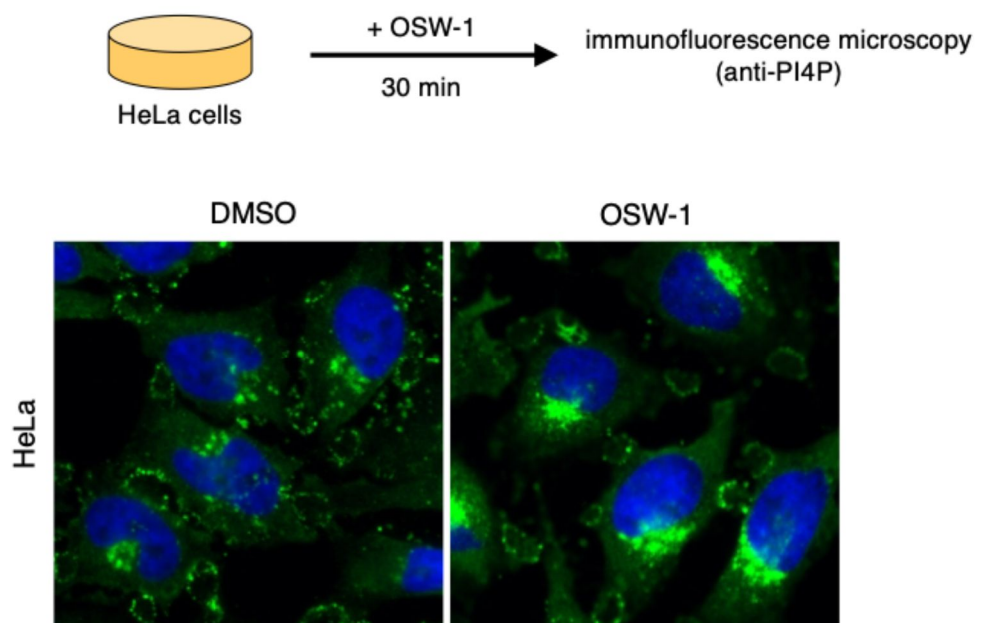


図2 ゴルジ体ストレス時(OSW-1処理時)には、ゴルジ体にPI4Pが過剰蓄積する。

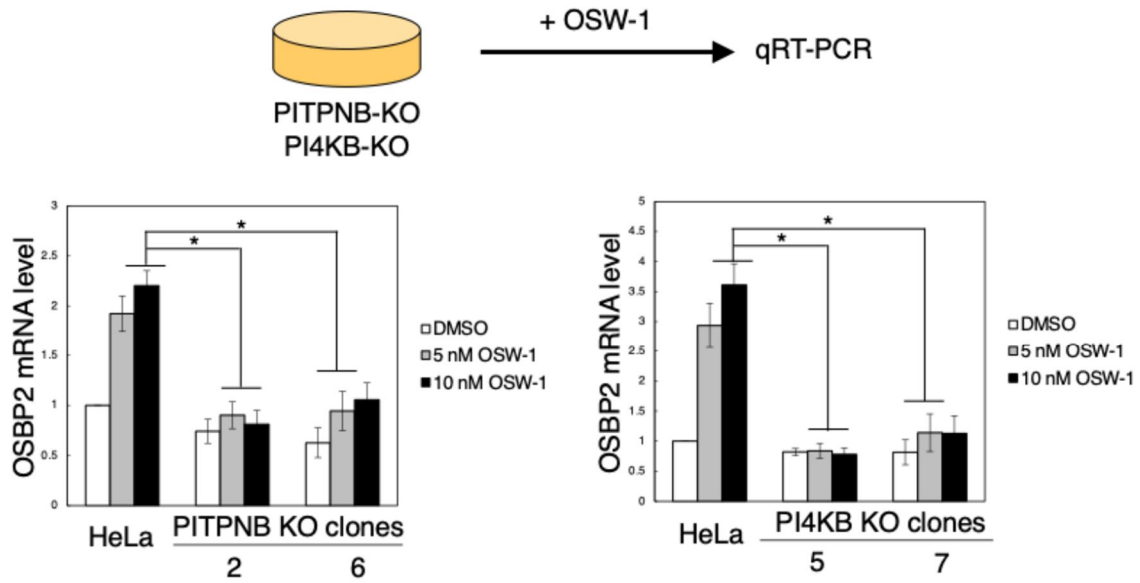


図3 PI4KIIIIBやPITPNB遺伝子を破壊すると、
ゴルジ体ストレスによるOSBP2の発現誘導が起こらなくなる。



Ornithogalum saundersiae

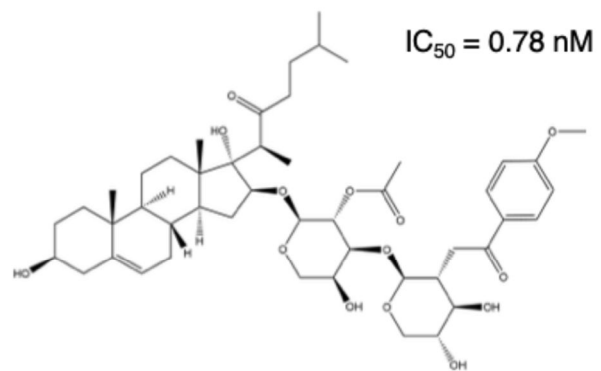


図4 Ornithogalum saundersiae とOSW-1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sogawa Ashuei, Komori Ryota, Yanagitani Kota, Ohfurudono Miku, Tsuru Akio, Kadoi Koji, Kimata Yukio, Yoshida Hiderou, Kohno Kenji	4. 巻 48
2. 論文標題 Signal sequence-triage is activated by translocon obstruction sensed by an ER stress sensor IRE1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 211 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.23072	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, Sakamoto Miyu, Miyake Iona, Tanaka Reishi, Tanaka Ryuya, Tanaka Azusa, Terami Misaki, Komori Ryota, Taniguchi Mai, Wakabayashi Sadao, Sakurai Hajime Tajima, Yoshida Hiderou	4. 巻 on line
2. 論文標題 Expression of transcription factors KLF2 and KLF4 is induced by the mammalian Golgi stress response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 on line
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.05.16.541051	査読の有無 無
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, Adachi Takuya, Morishita Fumi, Toide Marika, Watanabe Yuto, Sakurai Hajime Tajima, Wakabayashi Sadao, Kusumi Satoshi, Yamaji Toshiyuki, Sakurai Kaori, Koga Daisuke, Hanada Kentaro, Yohda Masafumi, Yoshida Hiderou	4. 巻 on line
2. 論文標題 The cholesterol pathway of the Golgi stress response induces cell death and transcription of Golgi-related genes through metabolic dysregulation of phosphatidylinositol-4-phosphate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 on line
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.05.18.541279	査読の有無 無
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 Dang Thao Thi, Kim Mi-Jeong, Lee Yoon Young, Le Hien Thi, Kim Kook Hwan, Nam Somi, Hyun Seung Hwa, Kim Hong Lim, Chung Su Wol, Chung Hun Taeg, Jho Eek-Hoon, Yoshida Hiderou, Kim Kyoungmi, Park Chan Young, Lee Myung-Shik, Back Sung Hoon	4. 巻 オンライン
2. 論文標題 Phosphorylation of EIF2S1 (eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) is indispensable for nuclear translocation of TFEB and TFE3 during ER stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2023.2173900	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体内の化学環境摂動に対抗する恒常性維持機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田秀郎
2. 発表標題 脂質輸送異常に起因するゴルジ体ストレスによって細胞死が引き起こされる分子機構
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答: ゴルジ体の量と質を制御するサーベイランスシステム
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 桂奈江、櫻井 香里、養王田 正文、山地 俊之、花田 賢太郎、吉田 秀郎、甲賀 大輔
2. 発表標題 電子顕微鏡新技術を駆使したゴルジ体ストレス及び細胞死の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022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 OSW-1によって起こるゴルジ体ストレスや細胞死はゴルジ体のPI4Pによって制御される
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022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KLF2とKLF4の発現制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本 明日香、岩崎 洸介、小森 亮太、柱谷 詩織、若林 貞夫、名黒 功、一條 秀憲、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経路の制御因子の検索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>兵庫県立大学大学院理学研究科生体物質化学 分野 https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem2/index-j.html 兵庫県立大学大学院理学研究科生体物質化学 分野 https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem2/index-j.html</p>

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