

平成 31 年 4 月 16 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07356

研究課題名(和文) プロテオグリカンの糖鎖修飾を制御するゴルジ体ストレス応答経路の解析

研究課題名(英文) The proteoglycan pathway of the Golgi stress response regulates glycosylation of proteoglycans.

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) 3,900,000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機能を強化する機構である。われわれは世界に先駆けてゴルジ体ストレス応答の研究を開拓し、これまでにゴルジ体の一般的な機能を増強するゴルジ体ストレス応答のTFE3経路を同定した。本研究課題では、軟骨細胞などプロテオグリカンを大量に合成する細胞で特異的に機能するプロテオグリカン経路を同定し、その分子機構を解析した。その結果、プロテオグリカン経路によって転写が誘導される標的遺伝子を同定し、その転写誘導を制御するエンハンサー配列PGSEを同定した。更に、PGSEに結合するとしてKLF familyに属する転写因子を同定した。

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の一つである。本研究によってゴルジ体ストレス応答の分子機構が明らかになることは、学術的に極めて意義のあることである。また、ゴルジ体の機能は神経変性疾患など様々な疾患と関係しており、ゴルジ体ストレス応答の分子機構が明らかになることによって、医科学研究者がゴルジ体が関与する疾患を解析する際の研究基盤となることが期待できる。更に、プロテオグリカン経路が制御するプロテオグリカンは軟骨での潤滑を担う重要な分子であることから、プロテオグリカン経路のメカニズムを活用することで軟骨の再生を促進する技術の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The Golgi stress response is a homeostatic mechanism that augments capacity of the Golgi function in accordance with cellular demands. We initiated the research of the Golgi stress response and identified the TFE3 pathway of the Golgi stress response, which upregulates the general function of the Golgi. In this research project, we discovered a novel response pathway of the Golgi stress response, the proteoglycan pathway. We identified target genes such as HS6ST1 and NDST2, an enhancer element PGSE and transcription factors that belong to the KLF family. We will identify the sensor molecule that detects Golgi stress and activates the transcription factors in order to clarify the molecular mechanism of the mammalian Golgi stress response in near future.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 ゴルジ体 ストレス応答 プロテオグリカン 糖鎖 PGSE KLF xyloside

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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おり、必要な時には必要な細胞小器官だけが必要なだけ増強される。このような細胞小器官の量的調節機構は細胞が自律して機能するために必須の機構であり、細胞生物学の根幹に関わる問題の一つである。研究代表者は小胞体の量的調節機構である小胞体ストレス応答の機構を森和俊博士の指導の下で明らかにした後、ゴルジ体の量的調節機構であるゴルジ体ストレス応答の研究を世界に先駆けて開始した。その結果、ゴルジ体の全般的な機能を制御するゴルジ体ストレス応答の応答経路 TFE3 経路を同定した。TFE3 経路はゴルジ体の構想維持に関わるタンパク質や小胞輸送因子、N型糖鎖修飾酵素などを標的遺伝子とし、転写因子 TFE3 がエンハンサー配列 GASE に結合することで標的遺伝子の転写を誘導する。また、TFE3 は平常時は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（ゴルジ体の機能が不足する状態）では脱リン酸化されて核へ移行することも明らかにした。しかしながら、ゴルジ体の特定の機能（プロテオグリカン型やムチン型糖鎖修飾能やコレステロールの輸送能力など）を増強する応答経路に関してはまったく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、ゴルジ体の特定の機能（糖タンパク質であるプロテオグリカンに糖鎖を付加する機能）を増強する応答経路プロテオグリカン経路を同定し、その分子機構を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) プロテオグリカン経路の標的遺伝子を同定するために、ヒト細胞にプロテオグリカン型ゴルジ体ストレス（プロテオグリカンの糖鎖修飾能力が不足する状態）を与え、その際に発現が上昇する遺伝子を次世代 DNA シークエンサーを用いた RNA sequencing と qRT-PCR によって検索したところ、プロテオグリカン型糖鎖修飾酵素遺伝子を多数同定することができた。

(2) 同定した標的遺伝子の転写誘導を制御するエンハンサーを同定するために、同定した標的遺伝子のうち、HS6ST1 や NDST2、GLCE、B3GAT3 のプロモーター領域の欠失変異体を作製し、それぞれの転写誘導能を測定することによって、転写誘導に必要な領域を同定した。最終的には、1塩基ごとに点変異を導入し、転写誘導に必要な塩基配列を同定し、PGSE と命名した。PGSE のコンセンサス配列は、CCGGGGCGGGGCG であった。

(3) PGSE に結合して標的遺伝子の転写誘導を制御する転写因子を同定するために、酵母細胞を用いた one hybrid screening を行ったが、転写因子を同定することができなかった。そこで、既知の転写因子の DNA 結合配列データを集めたデータベースである JASPR を用いて PGSE に結合する転写因子を in silico で検索したところ、KLF family の転写因子を PGSE に結合する転写因子の候補として同定することができた。KLF family は 17 個の遺伝子が属しているが、このうちいくつかの KLF を細胞で過剰発現したところ、PGSE からの転写が誘導された。また興味深いことに、いくつかの KLF 遺伝子はプロテオグリカン型ゴルジ体ストレスによって発現が誘導されることもわかった。これらのことは、KLF family の転写因子とプロテオグリカン経路の間に何らかの関係があることを示唆している。

4. 研究成果

上記の研究の結果、プロテオグリカン経路の標的遺伝子とエンハンサー配列を同定し、転写因子の候補として KLF family の転写因子を見つけることに成功した。プロテオグリカン経路の研究は研究代表者の独壇場であり、ゴルジ体ストレス応答の全貌解明にまた一歩近づく成果である。細胞小器官の量的調節機構の解明という大きな命題に対しても、学術的に貢献する成果である。また、ゴルジ体は神経変性疾患などさまざまな疾患と関連しており、ゴルジ体ストレス応答の分子機構の解明は医学分野の研究の基盤となることも期待できる。更に、プロテオグリカンは軟骨細胞の主成分であるとともに、脊椎損傷時に神経再生を阻害する物質でもある。プロテオグリカン経路の解明によって、軟骨の再生を促進したり、神経再生を促進する方策を確立することにも貢献することを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Taniguchi M, Sasaki-Osugi K, Oku M, Sawaguchi S, Tanakura S, Kawai Y, Wakabayashi S, Yoshida H. MLX Is a Transcriptional Repressor of the Mammalian Golgi Stress Response. *Cell Struct Funct*. 2016 Jul 30;41(2):93-104. doi: 10.1247/csf.16005. 査読有
- (2) Ariyasu D, Yoshida H, Hasegawa Y. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Endocrine Disorders. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 11;18(2). pii: E382. doi: 10.3390/ijms18020382.

査読無

- (3) Taniguchi M, Yoshida H. TFE3, HSP47, and CREB3 Pathways of the Mammalian Golgi Stress Response. *Cell Struct Funct.* 2017 Apr 1;42(1):27-36. doi: 10.1247/csf.16023. 査読無
- (4) Sasaki K, Komori R, Taniguchi M, Shimaoka A, Midori S, Yamamoto M, Okuda C, Tanaka R, Sakamoto M, Wakabayashi S, Yoshida H. PGSE Is a Novel Enhancer Regulating the Proteoglycan Pathway of the Mammalian Golgi Stress Response. *Cell Struct Funct.* 2019 Jan 11;44(1):1-19. doi: 10.1247/csf.18031. 査読有

〔学会発表〕(計 30 件)

- (1) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答による糖鎖修飾局域の制御 第 68 回日本細胞生物学会大会 2016 年
- (2) 吉田秀郎 小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答 清瀬土屋・長記念勉強会 2016 年
- (3) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答 ゴルジ体から核へのシグナル伝達 第 67 回日本電気泳動学会 2016 年
- (4) Hiderou Yoshida From UPR to Organelle Autoregulation Nobel Forum: Unfolded proteins: from basic to bedside 2016
- (5) 吉田秀郎 Golgi stress response and homeostasis of Golgi apparatus 第 89 回日本生化学会大会 2016 年
- (6) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答による糖鎖修飾局域のダイナミックな制御 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年
- (7) 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答—細胞の需要に応じてゴルジ体機能を制御する機構 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (8) 谷口麻衣, 小森亮太, 奥田知穂, 田中隆也, 中川幸大, 濱田響, 佐々木桂奈江, 若林貞夫, 吉田秀郎 プロテオグリカンの糖鎖修飾酵素遺伝子の転写を調節するゴルジ体ストレス応答経路の解析 第 69 回日本細胞生物学会大会 2017 年
- (9) 小森亮太, Ikhwan Jamaludin, 佐々木桂奈江, 谷口麻衣, 若林貞夫, 吉田秀郎 プロテオグリカン産生の制御機構—医薬品・化粧品開発の基盤整備 知の交流シンポジウム 2017 年
- (10) 谷口麻衣, 小森亮太, 奥田知穂, 田中隆也, 高木菜那, 糸井雄基, 佐々木桂奈江, 若林貞夫, 吉田秀郎 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ゴルジ体ストレス応答経路の解析 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (11) 佐々木桂奈江, 谷口麻衣, 若林貞夫, 吉田秀郎 ゴルジ体におけるカルシウム恒常性破綻に対するストレス応答制御 2017 年
- (12) 小森亮太, 向井美穂, 若林貞夫, 佐々木桂奈江, 谷口麻衣, 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路による 糖鎖修飾酵素遺伝子 HS6ST1 の転写誘導機構 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (13) Jamaludin Mohamad Ikhwan^o, Hirotada Kawamura, Tomohito Tsukamoto, Kazuhiro Yoshikawa, Yuki Kishimoto, Kanae Sasaki, Mai Taniguchi, Sadao Wakabayashi and Hiderou Yoshida Analysis of the Molecular Mechanism Regulating Expression of Golgi Glycosylation Enzymes by the Golgi Stress Response 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (14) 奥田知穂, 緑佐智子, 山本真由, 若林貞夫, 小森亮太, 向井美穂, 若林貞夫, 佐々木桂奈江, 谷口麻衣, 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路によって転写が誘導される糖鎖修飾遺伝子 GLCE のプロモーター解析 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (15) 河村優忠, 吉川和宏, 村田あゆみ, 佐々木桂奈江, 谷口麻衣, 若林貞夫, 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答ムチン経路と TFE3 経路のクロストーク 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (16) 村上奈々, 佐々木桂奈江, 若林貞夫, 谷口麻衣, 養王田正文, 櫻井香里, 吉田秀郎 抗癌活性化化合物 OSW-1 によるゴルジ体ストレス応答の活性化 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (17) 糸井雄基, 中川幸大, 西田真実, 太田香織, 若林貞夫, 谷口麻衣, 佐々木桂奈江, 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の標的遺伝子 CSGALNACT2 の発現制御機構 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (18) 田中隆也, 山本真由, 緑佐智子, 若林貞夫, 佐々木桂奈江, 谷口麻衣, 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路によって転写が誘導される糖鎖修飾遺伝子 NDST2 の発現制御機構 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
- (19) 高木菜那, 谷口麻衣, 若林貞夫, 佐々木桂奈江, 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路によって転写が誘導される糖鎖修飾遺伝子 B3GAT3 の転写制御機構の解析 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年

- (20)井上ちひろ、谷口麻衣、若林貞夫、佐々木桂奈江、斉藤美知子、Boaz Tirosh、吉田秀郎 抗体産生細胞の分化過程におけるゴルジ体ストレス応答 第40回日本分子生物学会年会 2017年
- (21)上田美里 岩佐奈実 樋田耕平 佐々木佳奈江 谷口麻衣 若林貞夫 吉田秀郎 小胞体ストレス応答を制御する因子 pXBP1(U)の機能解析 第40回日本分子生物学会年会 2017年
- (22)西谷健人、荒川佳穂、村田あゆみ、久保田圭祐、佐々木佳奈江、谷口麻衣、若林貞夫、吉田秀郎 グリア細胞分化過程におけるゴルジ体ストレス応答 第40回日本分子生物学会年会 2017年
- (23)安木亮佑、河村優忠、吉川和宏、村田あゆみ、佐々木桂奈江、谷口麻衣、若林貞夫、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答ムチン経路の標的遺伝子 GALNT8 の発現誘導機構の解析 第40回日本分子生物学会年会 2017年
- (24)木村真優、山田里佳、福谷洋介、野口恵一、吉田秀郎、櫻井 香里、養王田正文 オキシステロール結合タンパク質 OSBP と OSW-1 の相互作用解析 第40回日本分子生物学会年会 2017年
- (25)Hiderou Yoshida Organelle Zone: Autoregulation of the proteoglycan glycosylation zone by the Golgi stress response Joint annual meeting of JSCB and JSDB 2018
- (26)Hiderou Yoshida The proteoglycan pathway - a novel pathway of the Golgi stress response The 2018 Golgi Meeting 2018
- (27)Mai Taniguchi, Ryota Komori, Chiho Okuda, Ryuya Tanaka, Kanae Sasaki, Sadao Wakabayashi, Hiderou Yoshida Analysis of the proteoglycan pathway of the mammalian Golgi stress response that regulates the transcription of glycosylation enzymes for proteoglycans Joint annual meeting of JSCB and JSDB 2018
- (28)佐々木 桂奈江、小森 亮太、谷口 麻衣、島岡 晶恵、緑 佐智子、山本 真由、奥田 知穂、田中 隆也、若林 貞夫、吉田 秀郎 O型糖鎖修飾能を強化する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新規エンハンサー配列の同定 第41回日本分子生物学会年会 2018年
- (29)田中 隆也、山本 真由、緑 佐智子、佐々木 佳奈江、若林 貞夫、谷口 麻衣、吉田 秀郎 プロテオグリカン経路による NDST2 遺伝子の転写誘導メカニズム 第41回日本分子生物学会年会 2018年
- (30)斉藤 美知子、井上 ちひろ、曾我部 将至、若林 貞夫、佐々木 佳奈江、吉田 秀郎 ゴルジ体ストレス応答と抗体産生細胞分化 第41回日本分子生物学会年会 2018年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem2/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。