

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440055

研究課題名(和文)細胞内輸送の高効率化とゴルジ体構造変化に関わるゴルジタンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Characterization of golgins in secretion and Golgi

研究代表者

佐藤 あやの (Sato, Ayano)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：40303002

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)：これまでに、ゴルジタンパク質群のひとつであるgiantinをノックダウンすると分泌が上がること、ゴルジ体の構造に変化が起こることを示した。本研究課題では、この現象に関わる分子機構を明らかにすることを最終的な目的とし、電子線トモグラフィーなどを用いゴルジ体の構造を詳細に解析した。また、この間、分泌調節に関わる新規小分子を発見したため、新規分子の特徴付けを合わせて行なった。本研究課題の期間は終了したが、引き続き、これらの解析や新規分子のターゲットの探索を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We have shown that secretion increases and the structure of the Golgi changes when knocking down giantin, which is one of the Golgin protein group. In this research project, to clarify the molecular mechanisms underlying this phenomenon as the ultimate goal, the structure of the Golgi was analyzed in detail using electron beam tomography and the like. Also, during this time, we discovered a novel small molecule involved in secretion regulation, so we performed the characterization of new molecules, as well.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 分泌 電子線トモグラフィー ノックダウン ゴルジン 小分子化合物

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体内で作られた成長因子、ホルモン、分泌酵素類や、受容体類は、ゴルジ体へ運ばれ、それぞれの目的地へと輸送される。このような細胞内輸送は、生命活動維持に必須である。ゴルジ体は、このような細胞内輸送に中心的な役割を果たす細胞内小器官である。ほ乳類細胞は一般に、約数百個のゴルジ体を含む。ゴルジ体は、それぞれが連なってリボン様の構造をとる(ゴルジリボン)。それぞれのゴルジ体は、円盤状の膜構造が数個積み重なって形作られる。この積み重なり構造はゴルジスタックと呼ばれる。申請者らは、ゴルジ体に局在し、コイルドコイド構造をもつゴルジタンパク質群の一つである Giantin をノックダウンすることにより、ゴルジ体のスタックの連なりが変化し、かつ分泌酵素の輸送が高効率化することを見出した(引用文献1)。

## 2. 研究の目的

これらの背景をふまえ、細胞内輸送の高効率化の原因を明らかにするため、本研究では、ゴルジ体の構造が輸送能に影響を及ぼすという仮説を立て、ゴルジ体の形状や細胞内輸送を細胞生物/分子生物/生化学的な実験で調べることにより、これを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ゴルジスタックは、一般に 500~1000 nm 程度の大きさであり、その詳細を従来の光学顕微鏡のみで明らかにするのは難しいため、電子顕微鏡による研究手法を取り入れて研究が行われる。本研究では、電子線トモグラフィのエキスパートである大阪大学産業科学研究所の西野-林美都子、西野邦彦、両博士の協力のもと、Giantin の発現を下げた状態で、ゴルジ体の電子線トモグラフィ解析を行った。特にゴルジ体のスタック間の距離の変化や、構造変化などに関する 3D 情報を集め、Giantin の寄与を明らかにすることをめざした。また、これ以外の方法で構造変化を示すため、蛍光退色後回復測定 (FRAP) 法によって、ゴルジ体タンパクの挙動を解析した。さらに、これまでの実験では、siRNA を用いたノックダウンによって Giantin の発現を下げていたが、新たに Crispr 法によるノックアウトによって Giantin の発現抑制を試みた。

## 4. 研究成果

Giantin のノックダウン、ノックアウトにより、ゴルジ体スタックの間の構造の変化が観測された。また、Giantin のノックダウンにより、ゴルジ体タンパクの拡散速度の変化が観測

された。今後、より多くのデータを収集し、これらの解析結果を発表する予定である。また、これまでの実験では、siRNA を用いたノックダウン法によって Giantin の発現を下げていたが、今回 Crispr によるノックアウト法によって Giantin の発現を下げても同様の結果が得られることを確認した。さらに、本研究にともなう分泌活性測定中に、新規細胞死抑制剤が分泌阻害活性をもつことを発見したため、現在その特徴付け(ゴルジ体への影響などを含む)およびターゲットの探索を進めている。

## <引用文献>

1. PLoS One. 2013;8(3):e59821. doi: 10.1371/journal.pone.0059821. The golgin tether giantin regulates the secretory pathway by controlling stack organization within Golgi apparatus. Koreishi M, Gniadek TJ, Yu S, Masuda J, Honjo Y, Satoh A.

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計9件)

1. Oncotarget. 2017 Aug 3;8(49):85415-85427. doi: 10.18632/oncotarget.19960. A RasGAP, DAB2IP, regulates lipid droplet homeostasis by serving as GAP toward RAB40C. Luo X, Li C, Tan R, Xu X, Wu WKK, Satoh A, Wang T, Yu S. 査読あり
2. BMC Cell Biol. 2017 May 10;18(1):22. doi: 10.1186/s12860-017-0138-8. COPI-TRAPPII activates Rab18 and regulates its lipid droplet association. Li C, Luo X, Zhao S, Siu GK, Liang Y, Chan HC, Satoh A, Yu SS. 査読あり
3. Hepatology. 2017 May;65(5):1720-1734. doi: 10.1002/hep.29051. An endoplasmic reticulum protein, Nogo-B, facilitates alcoholic liver disease through regulation of kupffer cell polarization. Park JK, Shao M, Kim MY, Baik SK, Cho MY, Utsumi T, Satoh A, Ouyang X, Chung C, Iwakiri Y. 査読あり
4. EMBO J. 2017 Feb 15;36(4):441-457. doi: 10.15252/embj.201694866. ULK1 phosphorylates Sec23A and mediates autophagy-induced inhibition of ER-to-Golgi traffic. Gan W, Zhang C, Siu KY, Satoh A, Tanner JA, Yu S. 査読あり

5. Nanomedicine. 2016 Jul;12(5):1365-74. doi: 10.1016/j.nano.2016.01.013. Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. Park JK, Utsumi T, Seo YE, Deng Y, Satoh A, Saltzman WM, Iwakiri Y. 査読あり
6. Trends in Glycoscience and Glycotechnology. 2016 Issue 161 E61-E62. doi.org/10.4052/tigg.1519.6E. Transport within the Golgi: For the Study of Glycoprotein Movement 2 Satoh A, Honjo Y. 査読あり
7. J Biol Chem. 2015 Jul 10;290(28):17439-50. doi: 10.1074/jbc.M114.594937. Pancreatic  $\alpha$ -Amylase Controls Glucose Assimilation by Duodenal Retrieval through N-Glycan-specific Binding, Endocytosis, and Degradation. Date K, Satoh A, Iida K, Ogawa H. 査読あり
8. Trends in Glycoscience and Glycotechnology. 2015 Issue 153 33-36. doi.org/10.4052/tigg.27.33. The Roles of GRASP55/65 in Golgi Formation and Function Satoh A, Hasegawa Y, Honjo Y. 査読あり
9. Trends in Glycoscience and Glycotechnology. 2013 Issue 146 241-244. doi.org/10.4052/tigg.25.241 Transport within the Golgi: for the Study of Glycoprotein Movement Satoh A, Iwakiri Y. 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 第 68 回日本細胞生物学会・第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会 合同大会 (2016) 佐藤あやの 他、新規ビスインドール化合物による分泌阻害の機序解明
2. 第 34 回日本糖質学会年会 (2015) 佐藤あやの 他、新規ビスインドール化合物による分泌阻害の機序解明
3. 第 67 回日本細胞生物学会年会 (2015) 佐藤あやの 他、新規分泌阻害剤の作用機序の解明
4. 第 95 回日本化学会春季年会 (2015) 佐藤あやの 他、新規ビスインドール

ル化合物がもつ分泌阻害活性の特徴付け

5. 第 135 回日本薬学会年会 (2015) 鈴木秀幸、佐藤あやの 他、ハイスループットスクリーニングによるフルオロアルキル基を有するビスインドール化合物の発見と合成
6. 第 33 回日本糖質学会年会 (2014) 佐藤あやの 他、新規ビスインドール化合物がもつ分泌阻害活性の特徴付け
7. ISMB2014 (22<sup>nd</sup> Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology) (2014) Mayumi Oda & Ayano Satoh, Characterization of a novel bisindole containing compound in intracellular trafficking
8. 日本化学会中四国支部大会(2013) 結城尚也、佐藤あやの 他、フルオロアルキルインドール類の合成と細胞死抑制活性評価
9. 第 32 回日本糖質学会年会 (2013) 佐藤あやの 他、ゴルジ体形成と分泌におけるゴルジタンパク質の機能解析
10. 第 65 回日本細胞生物学会年会 (2013) Ayano Satoh, The golgin tether Giantin regulates the secretory pathway by controlling stack organization within Golgi apparatus

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 2 件)

1. 名称：細胞死抑制剤及び新規化合物  
発明者：佐藤あやの、仁科 勇太  
権利者：岡山大学  
種類：特許  
番号：6263814  
取得年月日：2018. 1. 5  
国内外の別：国内
2. 名称：細胞死抑制剤及びその製造方法  
発明者：佐藤あやの、仁科 勇太  
権利者：岡山大学

種類：特許  
番号：6263815  
取得年月日：2018. 1. 5  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 あやの (Ayano Satoh)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号：40303002

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

- 西野 邦彦 (Kunihiko Nishino)
- 西野 - 林 美都子 (Mitsuko Hayashi-Nishino)
- 仁科 勇太 (Yuta Nishina)
- Sidney Yu