

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15122

研究課題名(和文)O型糖鎖修飾能を強化するゴルジ体ストレス応答の転写制御機構

研究課題名(英文)Transcriptional regulation of the mammalian Golgi stress response augmenting the capacity of O-type glycosylation

研究代表者

佐々木 桂奈江 (Sasaki, Kanae)

兵庫県立大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：80752427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体ストレス応答とは、ゴルジ体の処理能力を超える事態に対して、能力を増強することで恒常性を維持する、細胞の生命活動に必須の適応機構である。本研究では、ゴルジ体で特異的に起こるプロテオグリカン型糖鎖修飾に焦点を当て、その修飾能力を増強させるストレス応答機構を解明することを目的とした。プロテオグリカンの糖鎖修飾能力低下を誘導すると、複数のプロテオグリカン型糖鎖修飾酵素遺伝子の発現上昇がみられた。これら遺伝子群についてプロモーター解析を行い、プロテオグリカン型糖鎖修飾能力を増強する新規転写制御配列の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々の細胞小器官は環境に応じて機能を増強する仕組み、すなわちストレス応答機構をもつことが、所属研究室を含めた複数の研究グループによって報告され始めているが、小胞体以外の細胞小器官についてはまだ歴史が浅く、詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究はゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン糖鎖修飾特異的な新規経路の存在を示し、その分子機構の一部を明らかにすることができた。本研究をさらに進めることで、ゴルジ体ストレス応答という細胞生物学の重要課題に貢献するとともに、軟骨形成不全や損傷脊髄再生などの疾患に対する治療方法開発に大きく貢献したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Golgi stress response is an adaptive mechanism that compensates for the overloaded function of the Golgi apparatus and maintains cellular homeostasis. In this study, to clarify a novel response pathway against Golgi stress induced upon insufficiency of proteoglycan (PG) glycosylation capacity in the Golgi (PG-Golgi stress), I performed experiments below. Expression of glycosylation enzymes for PGs was induced by PG-Golgi stress. Promoter analyses of genes encoding these glycosylation enzymes revealed the novel enhancer elements, which regulate their transcriptional induction upon PG-Golgi stress.

研究分野：生化学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：ストレス応答 ゴルジ体 糖鎖修飾

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

1. 研究開始当初の背景

個々の細胞小器官はその機能に過度の負荷がかかるストレス状態におかれても、それに適応するための分子機構が備わっている。例えば小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の正常な折りたたみ機能を担っているが、構造異常タンパク質の蓄積や Ca^{2+} 恒常性の破綻によりその機能に負荷が生じると、UPR (unfolded protein response) により、タンパク質の正常な折りたたみに必要な分子シャペロンや変性タンパク質の分解除去を行う因子などの遺伝子発現が誘導される。このようなストレス応答機構は各細胞小器官に備わっていると考えられ、ミトコンドリアやリソソームにも存在することが報告されている。ゴルジ体は膜タンパク質や分泌タンパク質、脂質の糖鎖修飾及びそれらの選別輸送を行う細胞小器官である。抗体産生を行う B 細胞や糖タンパク質ムチンを分泌する Brunner 腺細胞では、ゴルジ体ストレス応答機構が働き、ゴルジ体の量を増大させることで、ゴルジ体の機能不足 (ストレス状態) を補っていると考えられる。

我々はゴルジ体ストレス応答機構の存在を世界で初めて明らかにした。これまでの研究で、ゴルジ体ストレスによりゴルジ体構成因子や輸送関連因子、N 型糖鎖修飾酵素をコードする遺伝子の発現が誘導されることを発見し、その転写制御配列 GASE や転写因子 TFE3 及び MLX を同定してきた。しかし、ゴルジ体ストレスを感知するセンサー分子など、上流の制御因子の同定には至っておらず、ゴルジ体ストレス応答の全体像はまだ明らかになっていない。さらに、個々の細胞小器官は環境に応じて機能を増強する仕組みをもつことが、我々を含めた複数の研究グループによって報告されているが、小胞体以外の細胞小器官についてはまだ歴史は浅く、詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々は N 型糖鎖修飾酵素の発現制御を行うゴルジ体ストレス応答経路を明らかにしたが、ゴルジ体では O 型糖鎖修飾など、N 型糖鎖修飾とは異なる修飾過程を経るものがあることから、複数のストレス応答経路の存在が推察された。そこで本研究では、ゴルジ体で O 型糖鎖修飾されるプロテオグリカンに焦点を当て、O 型糖鎖修飾の能力を増強させるストレス応答機構を解明することを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

プロテオグリカンはヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸など、長い糖鎖構造を有するグリコサミノグリカンが多数結合したタンパク質で様々な機能を有し、細胞外マトリクスや細胞表面に存在している。ゴルジ体内腔でプロテオグリカン前駆体のコアタンパク質は、セリン・スレオニン残基に糖鎖が結合する O 型糖鎖修飾を受ける。

O 型糖鎖修飾酵素の遺伝子発現制御を行うゴルジ体ストレス応答機構を解明するために、以下の手法を用いて解析を行った。

- (1) プロテオグリカン型糖鎖修飾特異的なゴルジ体ストレスの誘導
- (2) 上記ストレス下における網羅的遺伝子発現解析
- (3) 発現上昇した遺伝子のプロモーター解析

4. 研究成果

- (1) プロテオグリカン型糖鎖修飾特異的なゴルジ体ストレスの誘導

プロテオグリカンの糖鎖修飾能力低下を誘導するために、プロテオグリカンのコアタンパク質の過剰発現または阻害剤 xyloside 処理を行った HeLa 細胞を観察したところ、それぞれについてゴルジ体の断片化がみられた。小胞体やリソソーム、ミトコンドリアなどの他の細胞小器官についても観察を行なったところ、ゴルジ体ほど著しい形態変化はみられなかった。このことから、上記ストレスはゴルジ体特異的に起こっていると想定された。

- (2) 上記ストレス下における網羅的遺伝子発現解析

次に xyloside 処理細胞を用いて、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、CSGALNACT2、GLCE、HS6ST1、HS3ST1、NDST2、B3GAT3 などの複数のプロテオグリカン O 型糖鎖修飾酵素遺伝子の発現上昇がみられた (図 1)。これら遺伝子の発現上昇は定量 PCR によっても確認することができた。さらにこれら遺伝子の発現上昇は TFE3 発現抑制の影響を受けなかったことから、TFE3 が関与するストレス応答機構とは別の経路であることが示唆された。

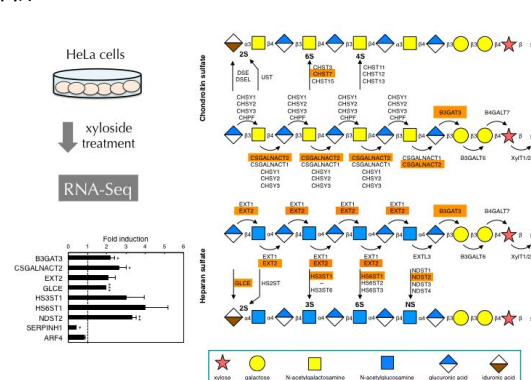


図 1. プロテオグリカン型糖鎖修飾特異的なゴルジ体ストレス応答の標的遺伝子の同定

(3) 発現上昇した遺伝子のプロモーター解析
 まず、発現上昇が確認されたプロテオグリカン 0 型糖鎖修飾酵素遺伝子それぞれにつき、転写開始点から上流 1 kbp 以内の領域をレポーターであるルシフェラーゼ遺伝子につないだ。次に、それらの欠損・置換変異コンストラクトを導入した HeLa 細胞でルシフェラーゼアッセイを行い、プロモーターを解析した。GLCE, HS6ST1, NDST2, B3GAT3 についてエンハンサー配列を同定することに成功し、それらの配列を比較すると、GGGGCGGGG というコンセンサス配列が存在することが判明した (PGSE-A の同定)。また、GLCE には上記のコンセンサス配列以外に TTTTACAATTGGTC という別のエンハンサー配列が転写制御に寄与することが明らかとなった (PGSE-B の同定)。以上の結果から、0 型糖鎖修飾能を制御する新規エンハンサー配列の同定に成功した (図 2)。

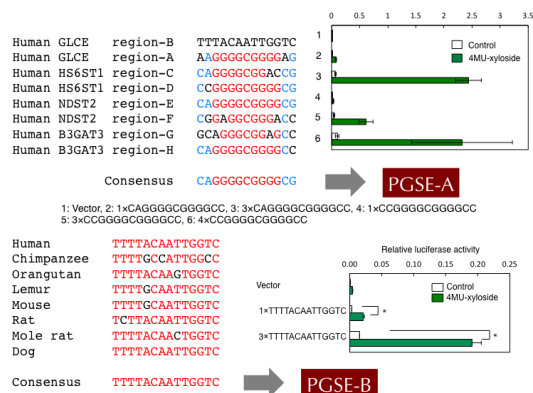


図2. 0型糖鎖修飾能を制御する新規エンハンサー配列の同定

本研究により、世界で未だ解析例の少ないゴルジ体ストレス応答の研究分野において、ストレス応答制御の新規経路 (プロテオグリカン経路、PG pathway) の存在を示すことができた (図 3)。また、小胞体ストレス応答が 3 つの経路によって制御されているのに対し、ゴルジ体ストレス応答についても複数の経路によって制御されていることを同時に示すことができた。

プロテオグリカンの糖鎖修飾酵素をコードする遺伝子の変異は軟骨形成不全や脊椎骨端異形成症等、多くの遺伝病を引き起こす。これら遺伝病の発症の分子メカニズム解明や治療方法の開発に対し、本研究をさらに進めることで重要な手がかりを得ることができると考えている。

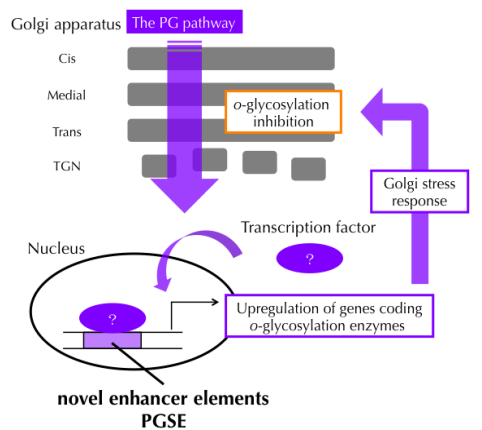


図3. ゴルジ体ストレス応答の新規経路(プロテオグリカン経路)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) Kanae Sasaki^{*}, Ryota Komori^{*}, Mai Taniguchi^{*}, Akie Shimaoka, Sachiko Midori, Mayu Yamamoto, Chiho Okuda, Ryuya Tanaka, Miyu Sakamoto, Sadao Wakabayashi, Hiderou Yoshida. (^{*}: authors equally contributed to this work) PGSE is a novel enhancer regulating the proteoglycan pathway of the mammalian Golgi stress response. *Cell. Struct. Funct.* 査読有 44, (2019) 1-19.
DOI: 10.1247/csf.18031
- (2) 佐々木桂奈江、吉田秀郎 「小胞体ストレスと応答システム」THE BONE 査読無 32,(2018) 17-23
http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0002_3202
- (3) 佐々木桂奈江、吉田秀郎 「ゴルジ体ストレス応答ゾーン」生体の科学 査読無 69,(2018) 556-559
DOI <https://doi.org/10.11477/mf.2425200919>
- (4) 佐々木桂奈江、吉田秀郎 「小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答」医学のあゆみ 査読無 267, (2018) 1029-1033
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=286610>

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 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 「0 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
- (2) 田中隆也、山本真由、緑佐智子、佐々木桂奈江、若林貞夫、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

〔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

<https://sites.google.com/site/hiderouoshidalab2/>

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。