

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06669

研究課題名(和文) ゴルジ体カルシウムシグナルによる神経軸索ガイダンス

研究課題名(英文) Neuronal axon guidance regulated by calcium signaling in the Golgi apparatus

研究代表者

戸島 拓郎 (Tojima, Takuro)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究センター・上級研究員

研究者番号：00373332

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)：ゴルジ体はタンパク質の翻訳後修飾や選別輸送を司る膜交通(membrane traffic)のキーステーションである。小胞体やミトコンドリアと同様に、ゴルジ体には高濃度カルシウムが内蔵されているが、その役割については不明の点が多い。本申請課題では、特に神経回路形成時の神経軸索ガイダンスに焦点を当て、ゴルジ体カルシウムシグナルが生命機能に果たす役割を解明する。具体的には、ゴルジ体内腔カルシウムが積荷タンパク質の糖鎖修飾や選別輸送を制御したり、細胞質カルシウムシグナル発生のための供給源として働く可能性などについて検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゴルジ体のカルシウム調節機能異常は、Hailey-Hailey disease等の皮膚疾患、心臓病等の循環器系疾患に加えて、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病等の各種神経変性疾患の原因になる可能性が指摘されており、本研究の成果は、将来的にこれら神経系疾患の発症機構・病態解明とその治療戦略構築への応用へと発展できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The Golgi apparatus is a key station in membrane traffic, which mediates post-translational modification and sorting of cargo proteins. Like the endoplasmic reticulum and mitochondria, the Golgi contains high concentrations of calcium, but its role remains unclear. In the present study, we focused on the role of Golgi calcium signaling in biological functions, with a particular focus on neuronal axon guidance during neuronal network formation. Specifically, we tried to examine the possibility that Golgi luminal calcium regulates glycosylation and sorting of cargo proteins, and acts as a source for generation of cytosolic calcium signals.

研究分野：神経科学

キーワード：ゴルジ体 カルシウム 神経回路形成 成長円錐

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は、広範な細胞の生理機能を司る最も重要なセカンドメッセンジャーの一つである。細胞質カルシウム濃度上昇の多彩な時空間パターンは、細胞外からのカルシウム流入と、細胞内オルガネラからのカルシウム放出の組み合わせにより形成され、これにより様々な下流シグナル伝達カスケードが活性化される。カルシウムを内蔵するオルガネラとしては、小胞体とミトコンドリアが代表格であるが、ゴルジ体の内腔カルシウム濃度もこれらと同様に高く保たれている ( $0.1 \sim 0.3 \text{ mM}$ )。ゴルジ体膜には、ゴルジ体特異的カルシウムポンプ (secretory pathway カルシウム-ATPase: SPCA) に加えて、小胞体カルシウムチャネルとして良く知られているリアノジン受容体や  $\text{IP}_3$  受容体も存在することから、ゴルジ体が小胞体やミトコンドリアと並ぶ重要な「 $\text{Ca}^{2+}$  sink」及び「 $\text{Ca}^{2+}$  source」として働いている可能性が高い。しかし、この可能性についてはこれまで全く検証されていない。また、ゴルジ体は小胞体で合成されたタンパク質の翻訳後修飾や選別輸送を担う膜交通 (membrane traffic) の重要なキーステーションであるが、その内腔カルシウムがゴルジ体機能に果たす役割についてもほとんど分かっていない。

### 2. 研究の目的

本課題の核心をなす学術的「問い」は、生命機能におけるゴルジ体内蔵カルシウムの役割は何か？また、その制御機構はどのようなものか？である。この問いに迫るために、本課題では神経細胞の軸索ガイダンスに焦点を当て、ゴルジ体カルシウムシグナルが神経細胞の機能を担う可能性とその機構を検証することを目指した。具体的には、ゴルジ体内腔カルシウムが積荷タンパク質の糖鎖修飾や選別輸送を制御したり、細胞質カルシウムシグナル発生のための供給源として働く可能性などについて解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

ゴルジ体はシス、メディアル、トランス、トランスゴルジ網 (TGN) といった4種類の槽から成る。シス槽は小胞体からの積荷の受取り、メディアル槽とトランス槽は積荷への糖鎖付加、TGNは積荷の選別輸送に特化した機能を持つ。これらゴルジ各槽のマーカーに低親和性カルシウム感受性プローブ (GCaMP6-150 等) を融合したゴルジ内腔カルシウムプローブのプロトタイプをすでに作製済みであった。これらのプローブを HeLa 細胞に発現させ、ゴルジ内腔カルシウムプローブの性能評価・改変を行った。さらに神経細胞におけるゴルジ各槽内腔でのカルシウム時空間動態を観察するための各種実験系を構築した。

### 4. 研究成果

(1) ゴルジ体内腔カルシウムプローブの最適化とその性能評価を行った。ゴルジ体を構成する4種類の槽 (シス、メディアル、トランス、TGN) に対する各局在化配列を低親和性カルシウム感受性プローブに融合し、ゴルジ体内腔側にカルシウム感受性プローブが呈示されるコンストラクトを作製した。これらを HeLa 細胞に発現させ、ヒスタミン刺激を与えたところ、典型的な応答例として、細胞質カルシウム濃度変動とは逆位相のシグナル変動が観察された。すなわち、ゴルジ体内腔のカルシウムが細胞質にリリースされることが示唆された。興味深いことに、まだ予備実験の段階ではあるが、ゴルジ体と TGN ではヒスタミンに対するカルシウム応答性が異なっている可能性が示唆された。さらに、作製したゴルジ局在型カルシウムプローブ (緑色) と、細胞質局在型カルシウムプローブ (赤色) を細胞に共発現させ2色同時観察を行った結果、ゴルジ体内腔カルシウム濃度の減少に伴って細胞質カルシウム濃度の上昇が観察された。すなわちゴルジ体がカルシウムストアとして働くことの状況証拠が得られた。

(2) ゴルジ内腔で働くカルシウム結合タンパク質と、ゴルジ体局在型カルシウムポンプについての解析を開始した。両者の蛍光タグつきコンストラクトを作製し、それらが局在するゴルジ槽を検証した。さらに、共同研究によりカルシウム結合タンパク質と糖転移酵素の相互作用などを検証し、ゴルジ内腔カルシウムシグナルとゴルジ機能との連関を示唆するデータが得られつつある。

(3) ゴルジ体カルシウムシグナルに連動した積荷輸送を神経細胞において可視化するためのツールを作製・最適化した。具体的には、神経細胞に発現する積荷タンパク質を積荷とした RUSH

( Retention using selective hooks; Boncompain et al, Nat Methods 2012 ) システム用コンストラクトを作製し、神経細胞に導入したところ、HeLa 細胞に導入した際に比べると発現量が非常に低かったので、mNeonGreen や mScarlet-I といった明るい蛍光タンパク質への変更やプロモーターなどを再検討し、従来よりも非常に明るく観察できるプローブが完成した。

( 4 ) ゴルジ体カルシウムシグナルに応じた糖鎖修飾制御機構の解析への足掛かりとして、各種レクチンを用いた細胞染色の実験系を立ち上げた。さらに共同研究により質量分析による糖鎖解析も開始した。

( 5 ) 細胞局所でケージドカルシウムの光乖離を可能とするために、対象物に対してポンポイントでレーザーを照射できる顕微鏡システムを構築した。

以上のように、ゴルジ体内腔カルシウムシグナルが細胞機能を制御する機構に徐々に迫りつつある。今後、本課題の成果を足場に更なる解析を推進したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takuro Tojima, Yasuyuki Suda, Midori Ishii, Kazuo Kurokawa, Akihiko Nakano | 4. 巻<br>132             |
| 2. 論文標題<br>Spatiotemporal dissection of the trans-Golgi network in budding yeast     | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science  | 6. 最初と最後の頁<br>jcs231159 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1242/jcs.231159  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 著者名<br>Takuro Tojima, Daisuke Miyashiro, Yasuhito Kosugi, and Akihiko Nakano                          | 4. 巻<br>in press |
| 2. 論文標題<br>Super-resolution live imaging of cargo traffic through the Golgi apparatus in mammalian cells | 5. 発行年<br>2022年  |
| 3. 雑誌名<br>Methods in Molecular Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>-  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>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<br>-        |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>戸島拓郎                     |
| 2. 発表標題<br>高速超解像顕微鏡によるゴルジ体槽成熟の時空間解析 |
| 3. 学会等名<br>理研シンポジウム：第8回「光量子工学研究」    |
| 4. 発表年<br>2022年                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山田梨乃、矢木宏和、戸島拓郎、青木一洋、本田怜奈、矢木真穂、足達俊吾、加藤晃一 |
| 2. 発表標題<br>パスポート配列の付加による糖タンパク質の特異的な糖鎖修飾のメカニズム      |
| 3. 学会等名<br>第40回日本糖質学会年会                            |
| 4. 発表年<br>2021年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takuro Tojima                                |
| 2. 発表標題<br>Membrane traffic in the neuronal growth cone |
| 3. 学会等名<br>Research Meeting on Cell Dynamics (招待講演)     |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>戸島拓郎                  |
| 2. 発表標題<br>神経成長円錐における膜交通ダイナミクス   |
| 3. 学会等名<br>第43回日本分子生物学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2020年                  |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>戸島拓郎                       |
| 2. 発表標題<br>出芽酵母におけるトランスゴルジ網の槽成熟ダイナミクス |
| 3. 学会等名<br>第22回植物オルガネラワークショップ (招待講演)  |
| 4. 発表年<br>2021年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>戸島拓郎   |
| 2. 発表標題<br>Dynamics of membrane traffic in the neuronal growth cone revealed by super-resolution live imaging |
| 3. 学会等名<br>理研シンポジウム 第7回「光量子工学研究」  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>戸島拓郎                      |
| 2. 発表標題<br>ゴルジ体からトランスゴルジ網への槽成熟ダイナミクス |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)     |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>戸島拓郎                  |
| 2. 発表標題<br>神経成長円錐における膜交通の可視化解析   |
| 3. 学会等名<br>第3回オルガネラゾーン研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2019年                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takuro Tojima, Yasuyuki Suda, Midori Ishii, Kazuo Kurokawa, and Akihiko Nakano    |
| 2. 発表標題<br>The identity of the trans-Golgi network revealed by super-resolution live imaging |
| 3. 学会等名<br>Molecular Membrane Biology Gordon Research Conference                             |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takuro Tojima   |
| 2. 発表標題<br>Visualization of membrane traffic in the neuronal growth cone |
| 3. 学会等名<br>RIKEN symposium: Cutting edge of membrane traffic (招待講演)      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>戸島拓郎, 須田恭之, 石井みどり, 黒川量雄, 中野明彦       |
| 2. 発表標題<br>トランスゴルジ網形成の時空間ダイナミクス                |
| 3. 学会等名<br>第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会 |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 戸島拓郎の研究者個人ホームページ<br><a href="http://tojimat.web.fc2.com/">http://tojimat.web.fc2.com/</a><br>理化学研究所量子工学研究センター生細胞超解像イメージング研究チーム<br><a href="http://sclim.riken.jp/">http://sclim.riken.jp/</a> |
|---|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織                   |                       |    |
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|