

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07382

研究課題名(和文)新規タンパク質分解機構GOMEDの生理機能解析

研究課題名(英文) Physiological function analysis of GOMED, a novel proteolytic degradation mechanism

研究代表者

山口 啓史 (Yamaguchi, Hirofumi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：50644241

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)：Golgi membrane-associated degradation pathway (GOMED)は、ゴルジ体から細胞外や細胞膜に輸送されるタンパク質の運搬が障害されたときに、行き場を失ったタンパク質が分解される機構であり、生理的に重要な役割を担っている。このGOMED実行分子GOMED-1を解析したところ、GOMED-1は細胞質からトランスゴルジ体に局在変化させ、隔離膜形成を制御していた。さらに、脳特異的GOMED-1欠損マウスでは、GOMEDの分解基質であり、鉄輸送タンパク質であるセルロプラスミンが異常蓄積し、その結果、鉄沈着から神経変性疾患様症状を呈することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GOMEDを制御する分子GOMED-1の解析から、GOMEDの分子機構の一端を理解することができた。また、神経細胞を取り上げ、GOMEDが生体機能維持に不可欠な機能であることを示すことができた。GOMEDは分泌経路を遮断するときに誘導される機構であることを勘案すると、分泌を行っている細胞を中心に、多岐にわたる細胞で重要な役割を果たしているものと考えられる。また、糖尿病や神経変性疾患などの多くの疾患の発症に関わっている可能性が考えられる。従って、本研究は、様々な疾患の病態生理解明や疾患治療に波及効果をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Golgi membrane-associated degradation pathway (GOMED) is an Atg5/Atg7-independent type of autophagy that contributes to the degradation of the accumulated proteins when the transport of proteins from the Golgi to the extracellular or plasma membrane is impaired. Analysis of the GOMED-1, a molecule essential for GOMED revealed that GOMED-1 localizes from the cytoplasm to the trans-Golgi and regulates the formation of isolation membranes from trans-Golgi membranes. Furthermore, brain-specific GOMED-1-deficient mice show that abnormal accumulation of ceruloplasmin, an iron transport protein and a degradation substrate of GOMED, resulting in neurodegenerative disease-like symptoms from iron deposition. These indicate that GOMED-1 functions to maintain neuronal cells via mechanisms different from those of canonical autophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー ゴルジ体

1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体は、小胞体から運ばれてきたタンパク質に、適切な翻訳後修飾を加え、細胞外、細胞膜やリソソームなどに輸送するオルガネラである。我々は、ゴルジ体から細胞外や細胞膜への分泌経路に障害 (ゴルジストレス)が生じたときに、輸送されずに、行き場を失ったタンパク質が分解される機構を発見し、Golgi membrane-associated degradation pathway (GOMED)を命名した。GOMEDは、*trans*-Golgi 膜が湾曲、伸長し、分解されるべきタンパク質を包み込み、その後リソソームと融合し、リソソーム内のタンパク分解酵素で分解する機構である (図 1)。この GOMED は、酵母から哺乳動物細胞まで保存されており、真核生物共通の機能であると考えられる。その後の研究で、我々は、①GOMED は、細胞外や細胞膜への分泌経路を遮断したときに惹起される機構であること、②膵β細胞が低血糖に曝された時には、分泌され損なったインスリンの分解を GOMED が担うことを見出した。さらに、③GOMED 誘導時に *trans*-Golgi 膜に局在する分子として GOMED-1 を同定し、④この分子を欠損させた細胞では、GOMED が誘導されないこと、⑤脳特異的に欠損させると、神経細胞のゴルジ体に余剰なタンパク質が蓄積し、神経細胞の変性・脱落が生じること、などを見出した。これらのことは、GOMED が生体内において、重要な生理的機能を有していることを示している。

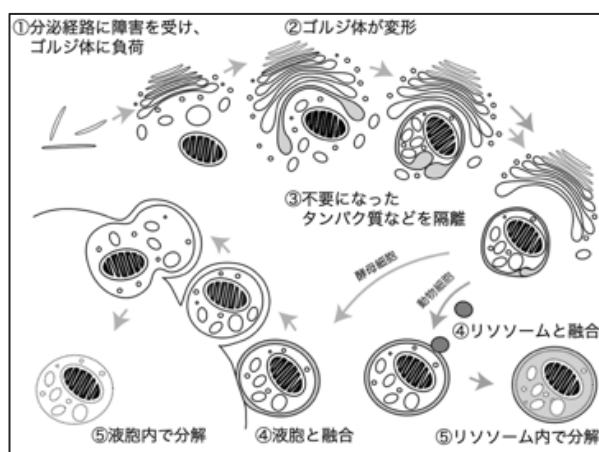


図 1 新規タンパク質分解機構 GOMED の模式図

2. 研究の目的

(1) GOMED 実行機構を明らかにする。また、(2) 膵β細胞における GOMED の役割を明らかにする。さらに、(3) 神経特異的 GOMED-1 欠損マウスを解析する。

3. 研究の方法

(1) GOMED 実行時の GOMED-1 の解析および相互作用分子の同定

Atg5 欠損マウス由来の線維芽細胞 (Atg5 KO MEF)において、超解像顕微鏡 STED を用い、GOMED 誘導前後の細胞内局在を検討した。また、細胞分画法および免疫電子顕微鏡法を用いても、細胞内局在について生化学的評価、微細構造観察を行った。さらに、GOMED 誘導時の GOMED-1 の修飾について検討した。また、Atg5 KO MEF に、FLAG-GOMED-1 を発現させ、抗 FLAG 抗体による免疫沈降法を用い、相互作用候補分子を同定する。当該分子について、crispr/Cas9 を用い、欠損細胞を作製し、autolysosome マーカーである mRFP-GFP のイメージングおよびタンパク質分解アッセイを行い、その欠損細胞における GOMED の多寡を検討した。

(2) 膵β細胞における GOMED-1 の解析

膵β細胞株 (MIN6 細胞)に対して、crispr/Cas9 を用い、Atg5/GOMED-1 二重欠損細胞を作製した。この細胞に対して低グルコース負荷をかけ、細胞内蓄積インスリン量を、生化学的に評価した。

(3) 神経特異的 GOMED-1 欠損マウスの解析

神経特異的 GOMED-1 欠損マウスを作製し、マウス小脳において、いかなる分子が蓄積しているか、オルガネラにいかなる変化が生じているのかを中心に解析する。

4. 研究成果

(1) GOMED 実行時の GOMED-1 の解析

Atg5 KO MEF における、GOMED 誘導前後の GOMED-1 の細胞内局在について、超解像顕微鏡 STED を用いて検討した。その結果、GOMED 誘導剤 etoposide による GOMED 誘導後、GOMED-1 の一部は細胞質から *trans*-Golgi 膜に局在変化していることが明らかになった。また、Atg5 KO MEF に対して細胞分画を行ったところ、GOMED 誘導後、*trans*-Golgi 分画において GOMED-1 が増加していることが明らかになった。さらに、GOMED-1 について免疫電子顕微鏡法を用いて微細構造観察を行ったところ、GOMED 誘導後、*trans*-Golgi 膜マーカーと共局在していた。*trans*-Golgi は、隔離膜形成の場であること、Atg5/GOMED-1 DKO MEF では、*trans*-Golgi 膜からの隔離膜形成に異常が生じていることから、GOMED 誘導時、GOMED-1 が *trans*-Golgi 膜に局在し、隔離膜形成に関与することで、GOMED を制御していることが示唆された。GOMED 誘導時の GOMED-1 の修飾はウェスタンブロットレベルでは検出することはできなかった。

(2) GOMED 実行時の GOMED-1 相互作用分子の同定

Atg5 KO MEF に、FLAG-GOMED-1 を発現させ、抗 FLAG 抗体による免疫沈降法後、質量分析計を用いて、相互作用候補分子の同定を試みた。細胞内局在の報告から分子の絞り込みを行い、候補分子を 4 つ (GOMED-2~5) 同定した。これらの遺伝子と Atg5 を二重欠損した細胞を crispr/Cas9 を用いて作製した。これらの細胞に対し、

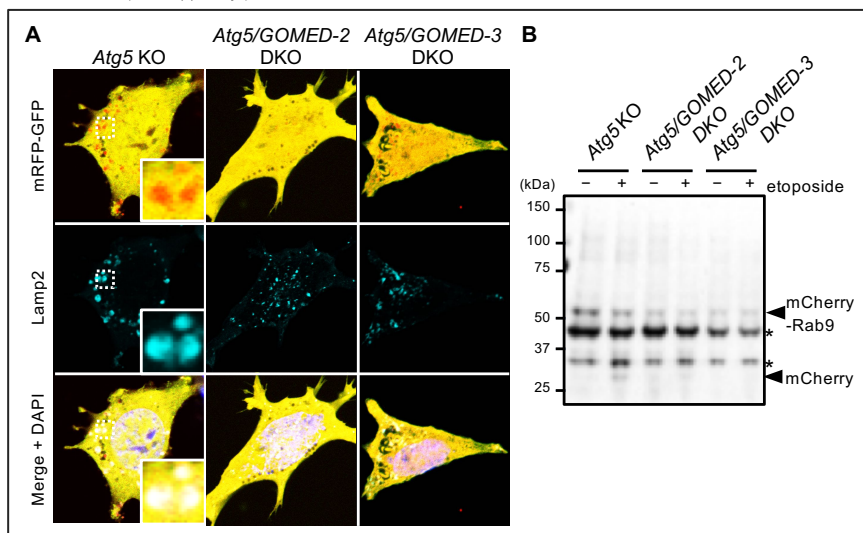


図 2: GOMED-2, GOMED-3 欠損によりオートリソソーム形成が抑制される (A)。また、GOMED によるタンパク質切断も抑制される (B)。

etoposide を添加し、autolysosome マーカーである mRFP-GFP の多寡の検討および細胞質タンパク質分解アッセイを行った。その結果、Atg5/GOMED-2 DKO MEF および Atg5/GOMED-3 DKO MEF では、autolysosome 形成が抑制され、これらの細胞では細胞質タンパク質分解も抑制されていることが示唆された (図 2)。これらの結果から、GOMED-2 および GOMED-3 が autolysosome 形成の上流で機能している可能性が示唆された。また、GOMED-1 と、GOMED-2 および GOMED-3 との相互作用を免疫沈降法および近接ライゲーションアッセイ法を用いて確認できた。

一方、従来のオートファジーへの GOMED-2, GOMED-3 の関与を明らかにするため、GOMED-2 KO および GOMED-3 KO MEF を crispr/Cas9 を用いて作製し、飢餓による従来のオートファジーの惹起を抗 LC3 ウェスタブロットティング、LC3 のイメージングを用いて検討した。その結果、GOMED-2 および GOMED-3 欠損による顕著な抑制は検出されなかった。以上の結果から、GOMED-1 と同様に GOMED-2 および GOMED-3 は従来のオートファジーと比較して GOMED に大きく関与していることが示唆された。

(3) 膵β細胞における GOMED-1 の解析

膵β細胞株 (MIN6 細胞) に対して、Atg5 および GOMED-1 を crispr/Cas9 を用い、二重欠損細胞を作製した。この細胞に対して低グルコース負荷をかけ、細胞内に蓄積したインスリン量を、生化学的に評価した。その結果、Atg5 KO MIN6 細胞では、低グルコース負荷をかけると細胞内蓄積したインスリン量が時間依存的に減少し、この減少は、リソソーム阻害剤である bafilomycin A1 によって阻害された。しかし、Atg5/GOMED-1 DKO MIN6 細胞では、低グルコース負荷をかけても細胞内蓄積したインスリンの減少は検出できなかった。このことから、GOMED-1 が膵β細胞においても重要な生理的機能を有していることが示唆された。

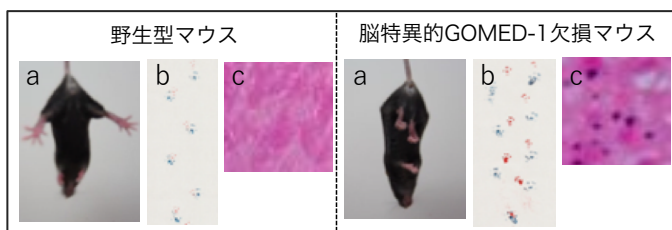


図 3: GOMED が破綻している GOMED-1 欠損マウス (右) では、clamping (a)、歩行障害などの神経症状 (b)、神経細胞への鉄沈着 (c、黒点) が認められる。

(4) 神経特異的 GOMED-1 欠損マウスの解析

神経特異的 GOMED-1 欠損マウスを作製し、マウス小脳を解析した。様々な金属の蓄積の有無について検討した結果、GOMED-1 欠損マウスでは、鉄が沈着していることが明らかになった (図 3)。さらに、小脳に蓄積する鉄関連タンパク質を探索した結果、鉄輸送タンパク質であるセルロプラスミンが蓄積していることが分かった (図 4)。さらに、Atg5 KO MEF 細胞にセルロプラスミンを発現させ、GOMED 誘導剤である etoposide を添加すると、セルロプラスミンが GOMED-1 依存的にリソソーム分解を受けることがわかり、セルロプラスミンが GOMED の基質であることが示唆された。すなわち、GOMED の基質であるセルロプラスミンの分解不全によって、鉄沈着が生じることが示唆された。

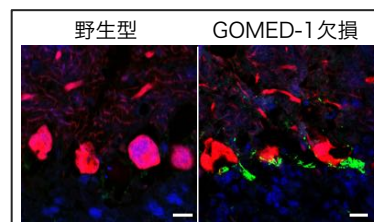


図 4: GOMED が破綻している GOMED-1 欠損マウス (右) では、セルロプラスミン (緑) の蓄積が認められる。赤: Calbindin, 青: DAPI。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamaguchi Hirofumi, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Kimiko, Katoh Kaoru, Miyake Koichi, Miyake Noriko, Fujikake Nobuhiro, Sakurai Hajime Tajima, Arakawa Satoko, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18892-w	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 Torii Satoru, Yamaguchi Hirofumi, Nakanishi Akira, Arakawa Satoko, Honda Shinya, Moriwaki Kenta, Nakano Hiroyasu, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a phosphorylation site on Ulk1 required for genotoxic stress-induced alternative autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15577-2	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 Honda Shinya, Arakawa Satoko, Yamaguchi Hirofumi, Torii Satoru, Tajima Sakurai Hajime, Tsujioka Masatsune, Murohashi Michiko, Shimizu Shigeomi	4. 巻 432
2. 論文標題 Association Between Atg5-independent Alternative Autophagy and Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 2622 ~ 2632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2020.01.016	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 -
1. 著者名 Torii Satoru, Honda Shinya, Murohashi Michiko, Yamaguchi Hirofumi, Shimizu Shigeomi	4. 巻 111
2. 論文標題 Autophagy involvement in oncogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3993 ~ 3999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14646	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山口啓史
2. 発表標題 Wipi3分子による新規オートファジー機構(GOMED)の制御とインスリン分泌への影響
3. 学会等名 2021年度難治疾患研究所発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口啓史
2. 発表標題 Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration
3. 学会等名 2019年度・2020年度難治疾患研究所発表会,
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 2. 山口啓史
2. 発表標題 GOMED制御分子の機能解析
3. 学会等名 2021年度 新学術領域「オルガネラゾーン」zoom班会議,
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口啓史、荒川聡子、清水重臣
2. 発表標題 新規オートファジー制御分子の機能解析
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口啓史
2. 発表標題 Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration
3. 学会等名 2019年度・2020年度難治疾患研究所研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoko Arakawa, Shinya Honda, Hirofumi Yamaguchi and Shigeomi Shimizu
2. 発表標題 The membrane origin of mitophagy after enucleation in red blood cell.
3. 学会等名 International Symposium for Female Researchers in Chromatin Biology (ISFRCB) 2020 (Satellite Symposium of the 43rd MBSJ), Session 2 “Scientific talks by young female researchers in epigenetics” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川聡子・山口啓史・清水重臣
2. 発表標題 オルタナティブ・オートファジーの生理機能解析と通常型との機能分担についての解明
3. 学会等名 マルチモードオートファジー 第2回班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 啓史
2. 発表標題 新規オートファジーを制御するAAG3の機能解析
3. 学会等名 第2回 オルガネラゾーン 若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 啓史、荒川 聡子、清水 重臣
2. 発表標題 新規オートファジーを制御するAAG3の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒川 聡子、山口 啓史、清水 重臣
2. 発表標題 新規オートファジー遺伝子欠損マウス(Aag3KO)と従来型オートファジー欠損マウス(Atg7KO)及び両オートファジー欠損マウス (Atg7 / Aag3DKO) を比較した形態機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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