

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16131

研究課題名（和文）ゴルジ体ストレス応答の新規応答経路を制御する因子の網羅的同定

研究課題名（英文）Identification of factors regulating a novel pathway in the mammalian Golgi stress response using genome-wide CRISPR screening

研究代表者

佐々木 桂奈江（Sasaki, Kanae）

兵庫県立大学・理学研究科・助教

研究者番号：80752427

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、O型糖鎖修飾能力を増強させるゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の分子機構を明らかにすることを目的として解析を行ない、その成果として、プロテオグリカン経路を制御する転写因子KLF2/4の同定に成功した。ゴルジ体ストレスが起こると、KLF2/4の発現が転写レベルで上昇し、タンパク質量も増加する。その結果、KLF2/4が核内で転写制御配列PGSEに結合して活性化させることで、糖鎖修飾酵素遺伝子群の発現制御に関与することを明らかにした。

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の分子機構について、ストレスを感知するセンサーやシグナル伝達因子など、多くの制御因子がまだ未同定である。本研究の成果により、プロテオグリカン経路で機能する転写因子KLF2/4を同定したことで、さらに上流で機能する制御因子を発見する手がかりを得ることができたと考え、学術的に非常に重要な成果であると考えている。本研究からさらに発展してプロテオグリカン経路の全貌を明らかにできれば、軟骨形成不全や損傷脊髄再生など、プロテオグリカン産生が関与する、様々な疾患に対する治療方法開発に大きく貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to determine the molecular mechanism of the proteoglycan pathway in the mammalian Golgi stress response that augments the capacity of O-type glycosylation. We identified transcription factors KLF2 and KLF4 as regulators of the proteoglycan pathway. Depending on the Golgi stress, KLF2 and KLF4 were upregulated at the transcription and translation levels. Then, KLF2 and KLF4 bound to the enhancer PGSE and activated it. These results indicated that KLF2 and KLF4 probably regulate gene expression of glycosylation enzymes.

研究分野：細胞生物学、分子生物学、生物化学

キーワード：ゴルジ体 ストレス応答 糖鎖修飾 プロテオグリカン 転写制御

### 1. 研究開始当初の背景

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。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。例えば抗体産生を行う 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。我々はこれまでに、プロテオグリカンの O 型糖鎖修飾能力を増強するゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の存在を見出している。標的遺伝子としてプロテオグリカン型糖鎖修飾酵素遺伝子群の発現が上昇することを明らかにし、その転写制御配列 PGSE を同定した。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、経路の全体像はまだ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路について、ストレスを感知するセンサーやシグナル伝達因子、転写因子などを網羅的に同定し、詳細な分子メカニズムを明らかにする (図 1)。

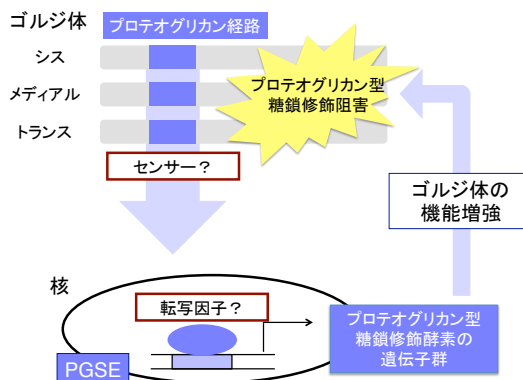


図 1. 本研究の目的:プロテオグリカン経路の分子機構解明

### 3. 研究の方法

プロテオグリカン経路の転写因子、上流のシグナル制御因子、ストレスセンサーを網羅的に同定するために、ヒトの培養細胞を用いた CRISPR-Cas9 システムによる遺伝学的スクリーニングの手法を利用することにした。

#### (1) xyloside による細胞死を利用したスクリーニング

CRISPR-Cas9 システムにより作製したヒト遺伝子網羅的ノックアウト HeLa 細胞をプロテオグリカン型糖鎖修飾阻害剤 xyloside で処理することで細胞死を誘導し、xyloside 耐性細胞のみを濃縮する。次にコントロール細胞群と比較して、xyloside 耐性細胞群ではどの遺伝子がノックアウトされているのか、次世代シーケンサーを用いて調べ、プロテオグリカン経路の制御因子を同定する。

#### (2) 転写制御配列 PGSE を利用したスクリーニング

PGSE の下流に、細胞死を誘導するジフテリア菌由来毒素フラグメント A (DT-A) 遺伝子を繋いだコンストラクトを網羅的ノックアウト細胞に導入し、前者の方法よりも短い時間で xyloside 処理を行う。プロテオグリカン経路が阻害されて PGSE の転写誘導が起こらない細胞は生き残ることから、これらの細胞でどの遺伝子がノックアウトされているのか解析する。また DT-A の代わりに蛍光タンパク質 EGFP をレポーターとして用い、PGSE の転写誘導が阻害されて EGFP の蛍光が低い細胞を蛍光フローサイトメトリーで分離し、ノックアウトされた遺伝子を解析する方法も計画していた (図 2)。

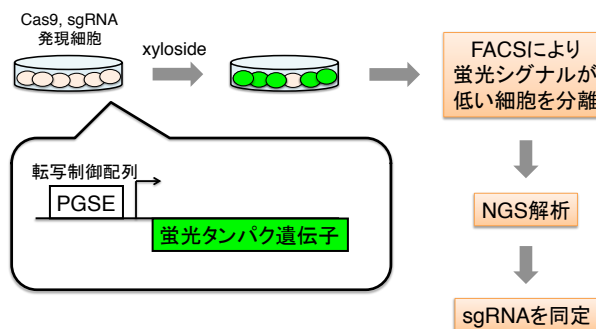


図 2. 転写制御配列 PGSE を利用したスクリーニング

#### 4. 研究成果

##### (1) xyloside による細胞死を利用したスクリーニング

xyloside 感受性の高い細胞をクローニングし、DNA 切断酵素 Cas9 の安定発現株を樹立した。今後、sgRNA ライブラリーを導入し、スクリーニングに用いる予定である。

##### (2) 転写制御配列 PGSE を利用したスクリーニング

PGSE-DT-A を作製したが、DT-A mRNA の転写効率が悪く、効率的な細胞死が誘導されなかった。転写効率を改善するために、コンストラクトの改変を行ってきたが、最終的にストレス依存的な転写誘導の差を検出することが困難であったため、DT-A から EGFP に切り替えた。EGFP コンストラクトについても様々なタイプを作製・検討してきたが、バックグラウンドを低減させた蛍光タンパク質レポーターシステムを用いるとストレス依存的な蛍光強度の差が大きくなったことから、今後このコンストラクトをゲノムに組み込んだ細胞株を樹立し、スクリーニングを行う予定である。

##### (3) *in silico* スクリーニングによるプロテオグリカン経路で機能する転写因子 KLF2 及び KLF4 の同定

PGSE に結合する転写因子を同定するため、転写因子結合配列データベースを用いた *in silico* スクリーニングを行なったところ、転写因子候補として KLF ファミリーに属する複数の転写因子が抽出された。KLF ファミリーの中でも特に KLF2 や KLF4 において、それらを過剰発現させると PGSE からの転写が上昇し、KLF2/4 の転写活性ドメインを欠損させたドミナントネガティブ変異体を発現させると、PGSE からの転写が抑制されることが明らかとなった。また、プロテオグリカン経路特異的なゴルジ体ストレス条件下において、KLF2 及び KLF4 の mRNA 量、タンパク質量がともに増加することが明らかとなった。これらの結果から KLF2 及び KLF4 が、ゴルジ体ストレス依存的に自身の量が増やされることによって、PGSE からの転写を制御している可能性が示唆された (図 3)。

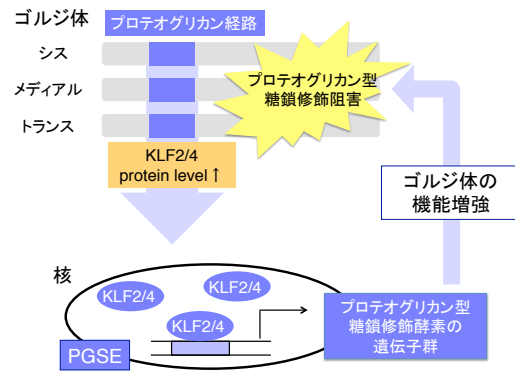


図3. プロテオグリカン経路における転写因子KLF2/4の機能

しかし、KLF2/4 のダブルノックアウト細胞で PGSE からの転写が抑制されなかったことから、PGSE による転写を制御する他の転写因子の存在も示唆された。

さらに KLF2 及び KLF4 の転写制御機構について解析を行なったところ、KLF2 に関しては MEF2-binding site 及びその上流近傍に存在する TA-rich 配列を転写制御配列として同定した。また、KLF4 においては KLF4 プロモーター内に存在する PGSE が重要であることを明らかにした。KLF2 遺伝子の発現制御については転写因子結合配列データベースを検索し、候補として抽出された MEF2 や FOX ファミリーに属する複数の転写因子について、現在その関与を解析中である。

今回の研究では、CRISPR-Cas9 システムによる遺伝学的スクリーニングの結果を得るまでに至らなかったが、試行錯誤の上、良いレポーターコンストラクトを得ることができ、スクリーニングを実行するための重要な準備を行うことができた。また、プロテオグリカン経路で機能する転写因子 KLF2/4 を同定したことで、さらに上流で機能する制御因子を発見する手がかりを得ることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Jamaludin Mohamad Ikhwan, Wakabayashi Sadao, Taniguchi Mai, Sasaki Kanae, Komori Ryota, Kawamura Hirota, Takase Hayataka, Sakamoto Miyu, Yoshida Hiderou	4. 巻 44
2. 論文標題 MGSE Regulates Crosstalk from the Mucin Pathway to the TFE3 Pathway of the Golgi Stress Response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 137 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19009	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 Sasaki Kanae, Yoshida Hiderou	4. 巻 593
2. 論文標題 Golgi stress response and organelle zones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2330 ~ 2340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13554	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 Kimura Mayu, Sasaki Kanae, Fukutani Yosuke, Yoshida Hiderou, Ohsawa Ikuroh, Yohda Masafumi, Sakurai Kaori	4. 巻 29
2. 論文標題 Anticancer saponin OSW-1 is a novel class of selective Golgi stress inducer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1732 ~ 1736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.022	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木桂奈江、森下史、足立拓弥、渡部雄斗、若林貞夫、櫻井香里、養王田正文、山地俊之、花田賢太郎、吉田秀郎
2. 発表標題 抗がん剤OSW-1によるゴルジ体ストレス応答におけるPtdIns transfer protein beta (PITPNB) の機能解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木桂奈江、森下史、足立拓弥、渡部雄斗、若林貞夫、櫻井香里、養王田正文、山地俊之、花田賢太郎、吉田秀郎
2. 発表標題 抗がん剤OSW-1が引き起こすゴルジ体ストレス依存性細胞死はホスホイノシタイド代謝因子によって制御される
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanae Sasaki, Hiderou Yoshida
2. 発表標題 The regulatory mechanism of the mammalian Golgi stress response
3. 学会等名 the 2020 Cold Spring Harbor meeting: Protein Homeostasis in Health & Disease (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanae Sasaki, Hiderou Yoshida
2. 発表標題 Regulation of the Golgi stress response augmenting the ability of proteoglycan-type glycosylation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木桂奈江、吉田秀郎
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス応答によるゴルジ体機能ゾーンの増強機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木桂奈江、小森亮太、島岡晶恵、緑佐智子、山本真由、奥田知穂、田中隆也、坂本美憂、谷口麻衣、若林貞夫、吉田秀郎
2. 発表標題 プロテオグリカン型糖鎖修飾能力を増強するゴルジ体ストレス応答経路の新規転写制御配列PGSEの同定
3. 学会等名 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 2019年

1. 発表者名 佐々木桂奈江
2. 発表標題 糖鎖修飾を制御するゴルジ体機能ゾーンの増強機構
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本細胞生物学会論文賞 (CSF Award) 受賞者 <a href="http://www.jscb.gr.jp/action/thesis_winners.html">http://www.jscb.gr.jp/action/thesis_winners.html</a> 兵庫県立大学大学院生命理学研究科 吉田秀郎研究室 <a href="https://sites.google.com/site/hiderouoshidalab2/home">https://sites.google.com/site/hiderouoshidalab2/home</a>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
---------	---------