

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00467

研究課題名(和文)細胞外とのコミュニケーションの司令塔としての新たなゴルジ体の役割

研究課題名(英文) Novel role of Golgi apparatus for non-cell autonomous events

研究代表者

清水 重臣 (Shimizu, Shigeomi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：70271020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：GOMEDとは、trans-Golgi膜が大きく変形して分解すべき蛋白質を包み込み、その後リソソームと融合して内容物を消化する細胞機能である。GOMEDの重要性は明らかであるが、その実行機構や生体での役割に関しては、不明な点が多く、本研究を行なった。その結果、「GOMED実行機構の解明」においては、実行分子としてWipi3分子を同定したほか、初期反応においてUlk1のリン酸化が重要であることを見出した。「GOMEDの可視化」においては、新たなGOMED解析法であるFLAD法を開発した。「GOMEDの生理機能」においては、小脳細胞の機能維持に寄与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゴルジ体はこれまで、小胞体から運ばれてきた分子に、糖鎖修飾、リン酸化修飾などの適切な翻訳後修飾を加えることによって、各分子を細胞外、細胞膜、リソソームなどに適切に運搬するオルガネラとして考えられてきた。しかしながら、研究代表者は、Golgi-mediated degradation pathway (GOMED)と命名した細胞機能により、ゴルジ体が、周囲の環境に応じて、細胞外分泌の分泌量や細胞膜レセプターの種類や量を巧みに調節していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：GOMED is a cellular function in which trans-Golgi membranes are greatly deformed to encapsulate proteins to be degraded and subsequently fuse with lysosomes to degrade their contents. In the "Elucidation of GOMED execution mechanism," we identified the Wipi3 molecule as the execution molecule and found that phosphorylation of Ulk1 is important in the initial reaction. In "Visualization of GOMED," we developed a new GOMED analysis method, the FLAD method. In "Physiological Functions of GOMED," we found that GOMED contributes to the maintenance of cerebellar cell functions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：GOMED ゴルジ体 オートファジー

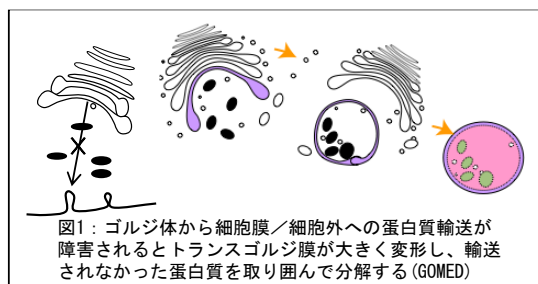
## 1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体はこれまで、小胞体から運ばれてきた分子に、糖鎖修飾、リン酸化修飾などの適切な翻訳後修飾を加えることによって、各分子を細胞外、細胞膜、リソソームなどに適切に運搬するオルガネラとして考えられてきた。

しかしながら、研究代表者は、Golgi-mediated degradation pathway (GOMED) (EMBO J, 2016) と命名した細胞現象の発見を契機に、ゴルジ体が、周囲の環境に応じて、細胞外分泌の分泌量や細胞膜レセプターの種類や量を巧妙に調節していることを見出した

GOMED とは、*trans*-Golgi 膜が *cis*, *medial* から乖離し、大きく変形して分解すべき蛋白質 (分解基質) を包み込み、その後リソソームと融合

して内容物を消化する細胞機能である (図1)。すなわち、GOMED は、細胞外/細胞膜への輸送量が過剰な時に、これらを分解基質として取り囲み分解する。このように、GOMED の重要性は明らかであるが、その実行機構や生体での役割に関しては、不明な点が多い。



## 2. 研究の目的

本研究では、上記背景のもとに、GOMED に関わる以下の研究を行った。

1, GOMED 実行機構の解明、2, GOMED が重要な役割を担っている細胞の種類の同定、3, GOMED の動態解明 (GOMED の可視化)、4, GOMED の変調から生じる生理的役割の解明である。

## 3. 研究の方法

1, GOMED 実行機構の解明: 本研究では、GOMED 実行分子を酵母遺伝学を用いて探索した。また、GOMED 実行分子の各分子が、ゴルジ体の槽形成  $\rightarrow$  *trans*-Golgi 膜の変形  $\rightarrow$  *trans*-Golgi 膜による輸送不良蛋白質の包み込み  $\rightarrow$  蛋白質分解と進行するうちの、どの過程で機能しているかを明らかにし、シグナル伝達機構を構築した。

2, GOMED が重要な役割を担っている細胞の同定: GOMED が如何なる細胞で機能しているかを、GOMED 欠損マウスを用いて明らかにした。

3, GOMED の動態解明 (GOMED の可視化): GOMED の解析は、電子顕微鏡を用いた方法以外には、十分には確立していない。そこで、本研究において GOMED の可視化をおこなった。

4, GOMED の変調から生じる細胞障害機序: ①神経特異的 GOMED 欠損マウスにおいて、神経細胞の脱落などの所見が認められている。そこで、ゴルジ体の蛋白質蓄積から細胞脱落に至るメカニズムを、培養細胞やマウス脳を用いて解析した。②GOMED が重要に機能する神経以外の細胞/臓器に関しても同様に、ゴルジ体の蛋白質蓄積から細胞変調に至るメカニズムを解析する。

#### 4. 研究成果

1、GOMED 実行機構の解明： GOMED は酵母においても観察される。そこで、オートファジー欠損酵母と合成致死に至る遺伝子を探索したところ、Hsv2 遺伝子を見出した。酵母 Hsv2 の哺乳動物ホモログは Wipi3 分子であり、同分子が GOMED に重要であるかを解析した。

その結果、細胞に DNA 傷害ストレスを加えると、GOMED が誘導されたが、Wipi3 欠損細胞では誘導されなかった (図 2)。また、この細胞を電子顕微鏡で観察すると、ゴルジ体膜の形態が異常であり、ゴルジ体膜の異常のために GOMED が誘導されないことが明らかとなった (図 3)。

また、初期に機能する Ulk1 に着目し、このタンパク質の修飾変化を探索したところ、DNA 傷害ストレスにより Ulk1 の 746 番目のセリンのリン酸化が誘導されることを見出した。さらに、このリン酸化を認識する特異的な抗体を作製したところ、GOMED

誘導時にリン酸化 Ulk1 が出現し、ゴルジ体に局在することを見出した (図 4)。

また、このリン酸化が起これないと、GOMED が誘導されないことも見出した。

さらに、膜形態と分子の関係性から、DNA 傷害ストレスによるシグナル伝達機構を構築した結果、

以下の知見を得た。まず、①PPM1D 分子による Ulk1 の 637 番目セリンの脱リン酸化が重要であること、②GOMED を活性化させるには、さらに RIPK3 分子による Ulk1 の 746 番目セリンのリン酸化が重要であること、③このリン酸化により Ulk1 はゴルジ体に移動し GOMED を誘導すること、④その下流で Wipi3 が機能すること、⑤Wipi3 分子は、細胞質中に局在するが、GOMED のシグナルが細胞に加わると、ゴルジ体に移動しゴルジ体膜の変形を行うこと、⑥湾曲したゴルジ体膜は、細胞質成分やゴルジ体中のタンパク質を包み込みリソソーム酵素で分解し、GOMED を実行することを見出した (図 5)。

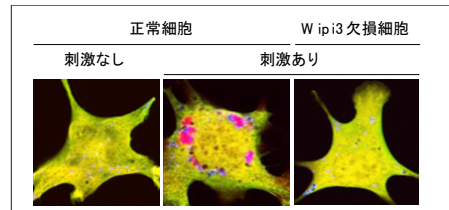


図 2 : wipi3を欠損すると、GOMEDが誘導されない (赤色部分が、GOMED)

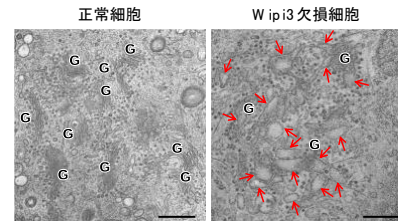


図 3 : wipi3を欠損すると、ゴルジ体膜が変形し、GOMEDが誘導されない。(G:ゴルジ体、矢印:異常なゴルジ体)

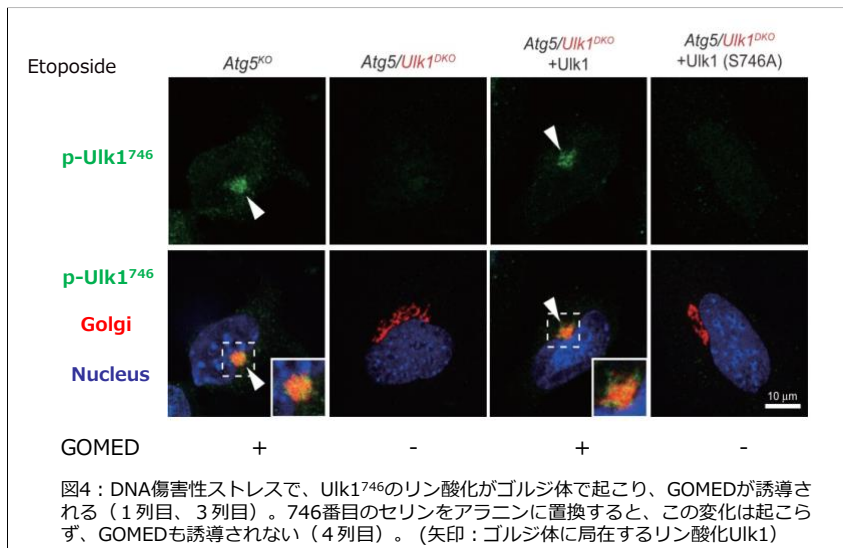


図 4 : DNA傷害性ストレスで、Ulk1<sup>746</sup>のリン酸化がゴルジ体で起こり、GOMEDが誘導される (1列目、3列目)。746番目のセリンをアラニンに置換すると、この変化は起こらず、GOMEDも誘導されない (4列目)。(矢印:ゴルジ体に局在するリン酸化Ulk1)

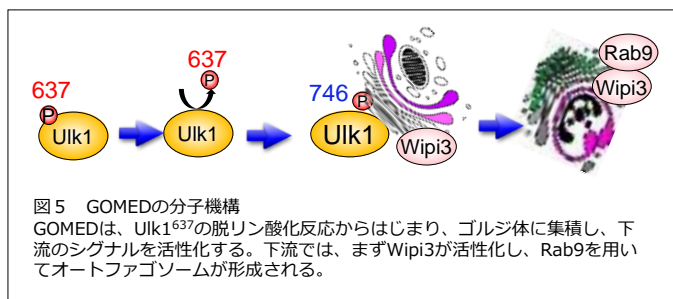


図 5 GOMEDの分子機構  
GOMEDは、Ulk1<sup>637</sup>の脱リン酸化反応からはじまり、ゴルジ体に集積し、下流のシグナルを活性化する。下流では、まずWipi3が活性化し、Rab9を用いてオートファゴソームが形成される。

2、GOMEDが重要な役割を担っている細胞の同定：神経特異的にWipi3を欠損させたマウスにおいて、GOMEDの破綻とプルキンエ細胞の変性を認めたことより、神経細胞 (特に

小脳のプルキンエ細胞)で重要な機能を果たしていることを見出した(後述)。また、心臓や腸、血液細胞などでも重要な役割を果たしていることを見出した。

3、GOMEDの動態解明(GOMEDの可視化): GOMEDは、細胞内成分を分解する時に、分解したい成分を隔離膜で包み込んで、細胞質から隔離する。この隔離の進行を適切に評価する研究手法はこれまで存在しなかった。そこで我々は、極小の蛍光分子を隔離膜内に入れ、蛍光分子が漏れ出ていないことで隔離の進行を評価する測定系を構築した。

具体的には、GFPなどの蛍光タンパク質を細胞に発現させる。その後、細胞の一部にフォトブリーチ(蛍光タンパク質を強力に励起することで消光させる技術)を行う(図6左下)。これにより、隔離膜に包まれていない蛍光タンパク質は、自由拡散によって消光し、隔離膜に包み込まれた蛍光タンパク質は、隔離膜内にとどまり強い蛍光を発する(図6右)。この手法を、FLAD(FLIP-based autophagy detection)と命名した。

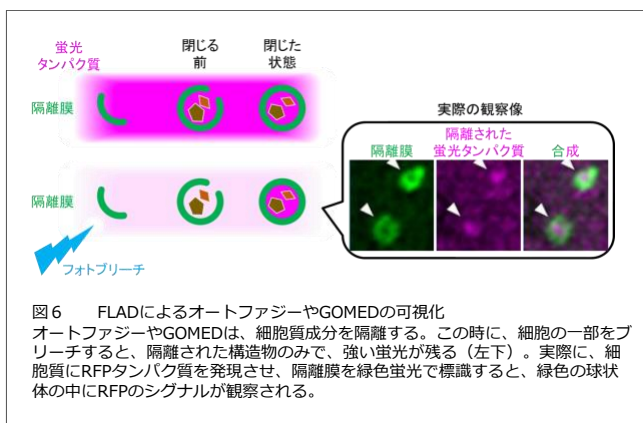


図6 FLADによるオートファジーやGOMEDの可視化  
オートファジーやGOMEDは、細胞内成分を隔離する。この時に、細胞の一部をブリーチすると、隔離された構造物のみで、強い蛍光が残る(左下)。実際に、細胞質にRFPタンパク質を発現させ、隔離膜を緑色蛍光で標識すると、緑色の球状体の中にRFPのシグナルが観察される。

4、GOMEDの変調から生じる細胞障害機序:

①神経細胞でWipi3遺伝子をもたないマウスを作製したところ、姿勢保持の異常、歩行障害などの小脳失調様症状を示した(図7)。実際に小脳を観察すると、(1)小脳のプルキンエ細胞が変性脱落している、(2)脱落前の神経細胞でゴルジ体の形態が異常である、(3)GOMEDが起きていない、などの所見が観察された。さらに、興味深いことに、(4)鉄ならびに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、(5)セルロプラスミンは新規オートファジーで分解されるタンパク質である、などの知見を得た(図8)。即ち、GOMED不全により、セルロプラスミンが分解されなくなり、鉄代謝の異常から鉄沈着が生じているものと考えられた。なお、ヒトの脳内鉄沈着神経変性症 SENDA は、Wipi4(Wipi3の相同遺伝子)の遺伝子変異によって発症することが知られており、このマウスは SENDA のモデルマウスとも考えられた。

なお、従来型オートファジーに必須の Atg7 を欠損したマウスの脳でも同様の神経機能異常が見られたが、両者の神経細胞の内部構造は全く異なっており、各々異なる機構で神経機能を維持していることが考えられた。実際に、Wipi3, Atg7の両者を欠損したマウスを作成したところ、生後28日で死亡し、単独の遺伝子欠損マウスよりもはるかに重篤な神経変性を示した。このことから、従来型オートファジーとGOMEDは、異なる機構で神経細胞を維持していることが確認された。

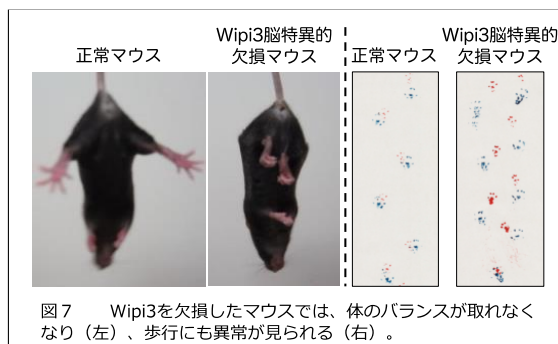


図7 Wipi3を欠損したマウスでは、体のバランスが取れなくなり(左)、歩行にも異常が見られる(右)。

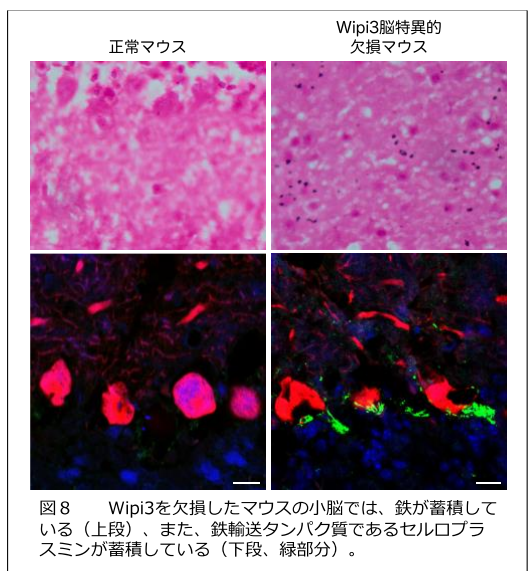


図8 Wipi3を欠損したマウスの小脳では、鉄が蓄積している(上段)、また、鉄輸送タンパク質であるセルロプラスミンが蓄積している(下段、緑部分)。

②通常のオートファジーと GOMED の最大の違いは、分解基質が異なる点にある。通常のオートファジーは、p62 や LC3 などの細胞質タンパク質を主に分解する。一方で、GOMED は、ゴルジ体を経由して運搬される分子が基質分子となる。このような GOMED 機能の代表的なものとして、インスリン分泌制御を見出した。インスリンは、膵臓のインスリン分泌細胞 ( $\beta$  細胞) で合成されゴルジ体を介して分泌されるが、細胞周囲のグルコース濃度が低下する (即ち血糖値が下がる) と、さらなる低グルコースを防ぐためにインスリン分泌が抑制される。この時、 $\beta$  細胞内では、GOMED が誘導されてインスリンの滞留が緩和された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hiroki Matsuda; Yoichi Nibe-Shirakihara; Akiko Tamura; Emi Aonuma; Satoko Arakawa; Kana Otsubo; Yasuhiro Nemoto; Takashi Nagaishi; Kiichiro Tsuchiya; Shigeomi Shimizu; Averil Ma; Mamoru Watanabe; Motohiro Uo; Ryuichi Okamoto	4. 巻 592
2. 論文標題 Nickel particles are present in Crohn's disease tissue and exacerbate intestinal inflammation in IBD susceptible mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BBRC	6. 最初と最後の頁 74-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.111	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 Tokuhiko Takuto, Ishikawa Akane, Sato Haruka, Takita Shunya, Yoshikawa Ayuri, Anzai Ryoko, Sato Shinichi, Aoyagi Ryohei, Arita Makoto, Shibuya Takumi, Aratani Yasuaki, Shimizu Shigeomi, Tanaka Masato, Yotsumoto Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Oxidized Phospholipids and Neutrophil Elastase Coordinately Play Critical Roles in NET Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.718586	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 Sato Shigeto, Noda Sachiko, Torii Satoru, Amo Taku, Ikeda Aya, Funayama Manabu, Yamaguchi Junji, Fukuda Takahiro, Kondo Hiromi, Tada Norihiro, Arakawa Satoko, Watanabe Masahiko, Uchiyama Yasuo, Shimizu Shigeomi, Hattori Nobutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Homeostatic p62 levels and inclusion body formation in CHCHD2 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 443 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab057	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 Noguchi S, Shimizu S	4. 巻 17
2. 論文標題 Molecular mechanisms and biological roles of GOMED.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16473	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 Sakurai Hajime Tajima, Arakawa Satoko, Noguchi Saori, Shimizu Shigeomi	4. 巻 12
2. 論文標題 FLIP-based autophagy-detecting technique reveals closed autophagic compartments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-26430-5	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 Yanagi Tomoki, Kikuchi Hiroaki, Susa Koichiro, Takahashi Naohiro, Bamba Hiroki, Suzuki Takefumi, Nakano Yuta, Fujiki Tamami, Mori Yutaro, Ando Fumiaki, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Takeuchi Koh, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Shigeomi, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 28
2. 論文標題 Absence of ULK1 decreases AMPK activity in the kidney, leading to chronic kidney disease progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 5~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12989	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 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 5311
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 Yasueda Asuka, Kayama Hisako, Murohashi Michiko, Nishimura Junichi, Wakame Koji, Komatsu Ken-ichi, Ogino Takayuki, Miyoshi Norikatsu, Takahashi Hidekazu, Uemura Mamoru, Matsuda Chu, Kitagawa Toru, Takeda Kiyoshi, Ito Toshinori, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Shimizu Shigeomi, Mizushima Tsunekazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Sanguisorba officinalis L. derived from herbal medicine prevents intestinal inflammation by inducing autophagy in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65306-4	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 1754
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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 清水重臣
2. 発表標題 ホスホイノシチドが制御する新たなタンパク質分解系GOMEDの生理機能とその破綻による多彩な疾患
3. 学会等名 第182回東京脂質談話会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigeomi Shimizu
2. 発表標題 Molecular mechanism and biological roles of Atg5-independent alternative autophagy
3. 学会等名 ゲーテ大学CRC seminar(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水重臣
2. 発表標題 オルタナティブ・オートファジーと神経変性疾患
3. 学会等名 第40回日本認知症学会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 清水重臣
2. 発表標題 ゴルジ体ストレス時に見られるゴルジ体調節機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水重臣
2. 発表標題 新規オートファジー GOMED とケミカルバイオロジー
3. 学会等名 第142回日本薬学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

病態細胞生物学分野ホームページ <a href="https://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html">https://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html</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
---------	---------