

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：24506
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22370069
 研究課題名 bHLH-ZIP型転写因子群によるゴルジ体ストレス応答の制御ネットワークの解明
 研究課題名 Regulatory network controlling mammalian Golgi stress response
 by bHLH-ZIP transcription factors
 研究代表者
 吉田 秀郎（Yoshida Hiderou）
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
 研究者番号：60378528

研究成果の概要（和文）： ゴルジ体ストレス応答は、細胞の需要に応じてゴルジ体の機能を強化する自律的恒常性維持機構である。研究代表者は世界に先駆けてゴルジ体ストレス応答の研究を開拓している。予備的な実験から、ゴルジ体ストレス応答を制御する中心的調節因子である転写因子 TFE3 を同定していた。本研究課題では、TFE3 の活性がリン酸化状態による細胞内局在性によって制御されていることを明らかにするとともに、ゴルジ体ストレスの分子実体がゴルジ体での糖鎖修飾や小胞輸送の不全に起因することを明らかにした。また、神経細胞やグリア細胞、杯細胞などの細胞分化過程において TFE3 が活性化されることを見出し、ゴルジ体ストレス応答が生理学的に重要な機能を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： The Golgi stress response is an autoregulatory mechanism that controls the capacity of the Golgi apparatus in accordance with cellular demands. The applicant is trying to reveal the molecular mechanism of the Golgi stress response as a pioneer. By preliminary experiments I isolated a key transcription factor TFE3 that regulates the mammalian Golgi stress response. In this project, I revealed that activity of TFE3 is regulated by its subcellular localization, which is controlled through phosphorylation status of TFE3. In addition, I found that deficiency of glycosylation as well as vesicular transport in the Golgi apparatus is responsible for activation of the Golgi stress response. Moreover, the TFE3 pathway is activated during differentiation of neurons, glial cells and goblet cells, suggesting the biological significance of the Golgi stress response.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 5,500,000 | 1,650,000 | 7,150,000 |
| 2011年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 2012年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能、ゴルジ体

1. 研究開始当初の背景

細胞内には小胞体やゴルジ体など様々な

細胞小器官が存在し、細胞の機能を分担している。それぞれの細胞小器官の存在量は細胞

の需要に応じて厳密に制御されており、必要な時には必要な細胞小器官だけが必要な量だけ増強される。このような細胞小器官の量的調節機構は細胞が自律的に恒常性を維持するために必須の機構であり、細胞生物学の根幹に関わる重要な研究課題であるが、これまで核以外の細胞小器官についてはほとんど解析されてこなかった。研究代表者はこの問題に果敢に挑戦し、小胞体の量的調節機構である小胞体ストレス応答の分子機構を明らかにした。小胞体の機能が不足すると（小胞体ストレス）、小胞体膜上に存在するセンサー分子 pATF6(P)が活性化され、転写因子 pATF6(N)が核へ移行して転写制御配列 ERSE に結合することで小胞体シャペロン遺伝子の転写を活性化する。また、小胞体膜上に存在するもう一つのセンサー分子 IRE1 も小胞体ストレスによって活性化され、転写因子 XBP1 の前駆体 mRNA を細胞質でスプライシングすることによって活性型転写因子 pXBP1(S)が生成し、転写制御配列 UPRE に pXBP1(S)が結合することによって小胞体関連分解因子 (ERAD 因子) 遺伝子の転写が活性化される。これらの応答によって小胞体シャペロンや ERAD 因子の発現が増強され、小胞体の機能が強化される。

小胞体の量的調節機構の基本的メカニズムを明らかにすることができたので、ゴルジ体の量的調節機構であるゴルジ体ストレス応答解析に着手した。予備的な研究によって、ゴルジ体ストレス応答によって転写が誘導される標的遺伝子（ゴルジ体の構造形成タンパク質やゴルジ体での糖鎖修飾酵素、ゴルジ体以降の小胞輸送因子）を同定し、転写誘導を制御する転写制御配列 GASE (コンセンサス配列: ACGTGGC) を同定するとともに、GASE に結合して転写を活性化する転写因子 TFE3 を単離した。

2. 研究の目的

上記の様に、ゴルジ体ストレス応答を制御する転写因子 TFE3 と転写制御配列 GASE を同定したが、TFE3 がどのような活性制御を受けているのかについては、全く未知であった。そこで、TFE3 の活性調節機構を解析し、活性調節因子群をシグナルの上流に向かって順次を単離し、それらの因子の活性調節機構を解析していくことによって、ゴルジ体ストレスを感知するセンサー分子から TFE3 の活性化に至るシグナル伝達経路の全貌を明らかにしようと考えた。

また、ゴルジ体ストレス（ゴルジ体の機能が不足する状態）というものが、いったいどのような状態であるのかについても全く未

知であった。そこで、ゴルジ体の機能を不足させるような様々な処理を細胞に与えた時に TFE3 が活性化されるかどうか調べることによって、ゴルジ体内のどのような分子的变化がゴルジ体ストレス応答を活性化するかを明らかにしようと考えた。更に、同定したセンサー分子を用いて、センサー分子によるゴルジ体ストレスの感知機構についても解明しようと考えた。

更に、小胞体ストレス応答は抗体産生細胞などの分泌が盛んな細胞で活性化されており、アルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患や糖尿病といったフォールディング病と深く関連していることが知られているが、ゴルジ体ストレス応答がどのような細胞・組織で活性化されているか、また疾患とどのように関わっているかについては、全く未解明であった。そこで、様々な細胞・組織で TFE3 が活性化されているかどうか調べることによって、ゴルジ体ストレス応答が人体のどのような生物学的現象に貢献しているか解析しようと考えた。

そこで本研究課題では、以下の項目について解析を行うこととした。

- (1) 転写因子 TFE3 の活性制御機構の解析
- (2) ゴルジ体ストレスの分子の実体の解析
- (3) ゴルジ体ストレス応答の生理学的重要性の解析

3. 研究の方法

(1) 転写因子 TFE3 の活性制御機構の解析
TFE3 がどのような活性制御を受けているのかについて解析するために、ゴルジ体ストレス時に TFE3 の転写やスプライシングに変化が起こるかどうか、Northern blotting や RT-PCR によって調べた。また、TFE3 のタンパク質の量や分子量に変化が起こるかどうか、Western blotting によって調べた。更に、TFE3 の細胞内局在性に変化が起こるかどうか調べるために、抗 TFE3 抗体を用いた細胞染色を行ったり、GFP-TFE3 を細胞内で発現させることを行った。また、TFE3 の GASE に対する結合がゴルジ体ストレスによって変化するかどうか、ChIP assay を行って調べた。

(2) ゴルジ体ストレスの分子の実体の解析
これまでは酸性の細胞小器官であるゴルジ体の pH をイオノフォアであるモネンシンを用いて中性化することによってゴルジ体内の酵素の活性を低下させてゴルジ体ストレスを起こしていたが、モネンシンがゴルジ体の pH を低下させることでゴルジ体ストレスを起こしているのか、あるいは全く別の作

用によってゴルジ体ストレスを起こしているのかは明らかでなかった。そこで、別のイオノフォアであるナイジェリシンやゴルジ体を酸性に維持するために必要なV-ATPase (ATPの加水分解エネルギーを用いて、ゴルジ体にプロトンを含み入れている酵素)の活性を阻害する薬剤バフィロマイシンで細胞を処理したときにTFE3が活性化されるかどうか調べることによって、ゴルジ体のpH変化によってゴルジ体ストレス応答が活性化されるかどうか調べた。

モネンシンやナイジェリシン、バフィロマイシンはゴルジ体以外の酸性細胞小器官(リソソームやエンドソーム、ミトコンドリア)にも作用するため、ゴルジ体特異性が低い。そこで、より特異的にゴルジ体の機能を阻害するために、GCP60のドミナントネガティブ体(GCP60-DN)を用いることにした。GCP60はゴルジ体膜に存在するタンパク質であり、ゴルジ体の構造維持に必要なタンパク質である。GCP60遺伝子のプロモーター領域にもGASEが存在しており、GCP60-DNを細胞で過剰発現させるとゴルジ体の機能を担うタンパク質であるGiantinがゴルジ体に局在できなくなり、ゴルジ体が断片化され、ゴルジ体での小胞輸送も阻害されることがわかっている。そこで、GCP60-DNを用いてゴルジ体機能を特異的に阻害し、その時にTFE3が活性化されるかどうか調べた。

糖鎖修飾はゴルジ体の重要な機能であり、糖鎖修飾の不全がゴルジ体ストレスの原因となっている可能性は充分に考えられる。ゴルジ体では、大きく分けて3種類の糖鎖修飾が行われている。その一つは、小胞体で付加されたN型糖鎖のプロセッシングである。様々なプロセッシングが行われるが、本研究課題では、スワインソニンを用いてmannosidaseの活性を阻害し、マンノースのトリミングを阻害したときにTFE3が活性化されるかどうか調べた。また、トランスゴルジでは最後の糖鎖付加としてシアル酸付加が起こる。シアル酸の転移酵素は多数存在するために、転移酵素の阻害剤やRNA干渉法ではシアル酸付加を阻害することが難しい。そこで、ゴルジ体にシアル酸を輸送するトランスポーターの発現をRNA干渉法で阻害したり、シアル酸トランスポーター遺伝子に変異を持つ細胞株Lec2を用いてTFE3が活性化されているかどうか調べた。ゴルジ体で起こる第2の糖鎖付加は、プロテオグリカンに対するO型糖鎖修飾である。プロテオグリカンのコアタンパク質に最初に結合する糖はXyloseである。従って、細胞内にXyloseの誘導体であるXylosideが大量に存在すると大部分のO型糖鎖はXylosideに付加され、プロテオグリカンの糖

鎖修飾はほとんど起こらなくなる。そこで、Xylosideで処理したときにTFE3が活性化されるかどうか調べた。Xylosideとしては、4-NP Xylosideと4-MU Xylosideの2種類を用いた。ゴルジ体で起こる第3の糖鎖付加は、粘膜の構成成分であるムチンに対するO型糖鎖付加である。ムチンのコアタンパク質に最初に付加される糖は、GalNAcである。従って、GalNAcの誘導体であるBenzyl-GalNAcが細胞内に多量に存在していると、本来ムチンに付加されるべきO型糖鎖が大部分Benzyl-GalNAcに付加されてしまうことになる。そこで、Benzyl-GalNAcで細胞を処理したときにTFE3が活性化されるかどうかを調べた。

輸送小胞を用いた選別輸送も、ゴルジ体の重要な機能である。そこで、ゴルジ体以降の小胞輸送には様々な因子が関与しているが、中でもphosphatidylinositol 4-kinase (PI4K)やphosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve)が重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、PI4Kの阻害剤であるwortmanninやLY294002(これらはPI3Kの阻害剤でもある)、PIKfyveの阻害剤であるYM201636で細胞を処理したときにTFE3が活性化されるかどうか調べた。また、リン酸化酵素YSK1はゴルジ体に存在しており、ゴルジ体からの小胞輸送に重要であることが知られている。そこで、YSK1の発現をRNA干渉法によって抑制したときにTFE3の活性化が起こるかどうか調べた。

(3) ゴルジ体ストレス応答の生理学的重要性の解析

細胞分化に伴ってゴルジ体ストレス応答が活性化されることが期待された。そこで、以下の3種類の細胞分化過程においてTFE3が活性化されているかどうか調べた。第1の細胞分化過程は、神経細胞である。長い樹状突起を伸長させる神経細胞では、樹状突起の根本にゴルジ体の集積が見られ、この構造はGolgi out postと呼ばれる。樹状突起を伸長するためには多量の膜タンパク質と膜輸送が必要であり、そのためにゴルジ体が発達していると考えられる。そこで、褐色細胞腫由来の細胞であるPC12細胞にNGFを作用させて神経細胞を分化させたときに、TFE3が活性化されるかどうか調べた。

第2の細胞分化過程は、グリア細胞である。グリア細胞も神経細胞と同様に発達した突起を有することから、ゴルジ体ストレス応答が活性化されている可能性が考えられる。そこで、ラットグリオーマ細胞であるC6細胞にdibutyryl cAMPを作用させてアストロサイトに分分化させたり、レチノイン酸を作用さ

せてオリゴデンドロサイトに分化させたときに、TFE3 が活性化されるかどうか調べた。

第3の細胞分化過程は、ゴブレット細胞である。ゴブレット細胞は小腸などで粘液を分泌する細胞であり、ムチンを大量に合成するためにゴルジ体が極めてよく発達している。そこで、結腸ガン由来の細胞である HT29 細胞に酪酸を処理してゴブレット細胞への分化を起し、その際に TFE3 が活性化されるかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) 転写因子 TFE3 の活性制御機構の解析

細胞内に存在する TFE3 の GASE 結合について調べたところ、通常時には TFE3 は GASE に結合していないが、ゴルジ体ストレス時には GASE に結合するようになることがわかった。このことは、TFE3 の活性が何らかの調節を受けていることを示唆している。そこで、TFE3 がどのような活性調節を受けているかについて様々な角度から調べた結果、転写レベル・スプライシングレベルでの調節は検出されなかった。タンパク質レベルで調べたところ、ゴルジ体ストレスによって分子量が低下することがわかった。低下の原因について調べたところ、TFE3 は通常時にはリン酸化されているが、ゴルジ体ストレス時に脱リン酸化されることがわかった。脱リン酸化の意義について調べたところ、リン酸化されている TFE3 は細胞質に繫留され、脱リン酸化されると核へ移行することがわかった。すなわち、TFE3 の活性は、リン酸化状態による細胞内の局在性変化によることがわかった。

TFE3 の核移行に必要な領域を解析したところ、TFE3 の basic 領域が核移行シグナルとして機能していることがわかった。一方、細胞質繫留に必要な領域を解析したところ、TFE3 の N 末端領域が細胞質繫留に必須であることがわかった。TFE3 の細胞質繫留に必要なアミノ酸残基を 1 アミノ酸レベルで解析したところ、N 末端領域内のセリン残基 (S108) が必須であり、S108 を別のアミノ酸に置換すると TFE3 は恒常的に脱リン酸化された状態で核に存在し、GASE からの転写を活性化することがわかった。

次に、TFE3 をリン酸化するリン酸化酵素と脱リン酸化する脱リン酸化酵素を同定するために、siRNA ライブラリーを用いた網羅的スクリーニングを行った (現在も継続中)。その結果、TFE3 のリン酸化酵素の候補として、CKI を同定した。CKI の発現を siRNA によって抑制すると TFE3 が脱リン酸化されて核へ移行し、GASE からの転写が誘導された。興味

深いことに、CKI のリン酸化コンセンサス配列と、TFE3 の S108 付近のアミノ酸配列は完全に一致した。現在、CKI が TFE3 を直接リン酸化するかどうか検討中である。TFE3 の脱リン酸化酵素については、現在更にスクリーニング中である。

(2) ゴルジ体ストレスの分子の実体の解析

モネンシンやナイジェリシン、バフィロマイシンでゴルジ体を中性化したすると、TFE3 が脱リン酸化されて核移行し、GASE からの転写も活性化されることがわかった。このことは、ゴルジ体の中性化によってゴルジ体の酵素の活性が低下し、ゴルジ体ストレス応答が活性化されることが示唆される。よりゴルジ体特異性の高いゴルジ体ストレス処理として GCP60-DN を細胞に発現させたところ、やはり TFE3 経路の活性化が見られた。このことは、機能不全のゴルジ体からゴルジ体ストレス応答を活性化するシグナルが来ていることを示している。ゴルジ体での N 型糖鎖修飾や O 型糖鎖修飾 (プロテオグリカンやムチン) を阻害したところ、TFE3 経路の活性化が見られた。このことは、ゴルジ体での糖鎖修飾不全によってゴルジ体ストレス応答が活性化されることを示している。一方、ゴルジ体以降の小胞輸送を阻害しても、TFE3 経路の活性化が見られた。このことは、小胞輸送の不全もゴルジ体ストレス応答を活性化することを示している。以上の結果から、ゴルジ体内に分泌タンパク質が蓄積することがゴルジ体ストレスの分子の実体ではないかと想定し、糖鎖付加が不全な分泌タンパク質がゴルジ体内に蓄積するのか、また蓄積したことがゴルジ体ストレスのシグナルになるのかどうか、現在更に検討を進めている。

(3) ゴルジ体ストレス応答の生理学的重要性の解析

PC12 細胞が神経細胞に分化する際にも、C6 細胞がアストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化する際にも、HT29 細胞がゴブレット細胞に分化する際にも、TFE3 の活性化が見られた。従って、細胞分化に伴ってゴルジ体の機能が不足し、ゴルジ体ストレス応答によってゴルジ体が増強されることは確かなことである。現在、TFE3 の発現を RNA 干渉法によって抑制したときに、これらの細胞分化が正常に起こるかどうか調べることによって、細胞分化にゴルジ体ストレス応答がどの程度貢献しているか解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

(1) Aya Uemura, Yusaku Matsuo, Masaya Oku, Mai Taniguchi, Sadao Wakabayashi and Hiderou Yoshida UBC9 regulates stability of XBP1, a key transcription factor controlling the ER stress response. *Cell Structure and Function* 査読有 Vol. 38, 2013, 67-79.
doi:10.1247/csf.12026

(2) Ryota Komori, Mai Taniguchi, Yoshiaki Ichikawa, Aya Uemura, Masaya Oku, Sadao Wakabayashi, Kazuhiko Higuchi and Hiderou Yoshida Ultraviolet A induces the endoplasmic reticulum stress response in human dermal fibroblasts. *Cell Structure and Function* 査読有 Vol. 37, 2012, 49-53.
doi:10.1247/csf.11041

(3) Masaya Oku, Soichiro Tanakura, Aya Uemura, Miwa Sohda, Yoshio Misumi, Mai Taniguchi, Sadao Wakabayashi and Hiderou Yoshida The novel cis-acting element GASE regulates transcriptional induction by the Golgi stress response. *Cell Structure and Function* 査読有 Vol. 36 2011, 1-12.
doi:10.1247/csf.10014

〔学会発表〕 (計 15 件)

(1) Mai Taniguchi 他 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 2012
(2) Mai Taniguchi 他 Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 2012

(3) Hiderou Yoshida EMBO-EMBL Symposium 2012

(4) Mai Taniguchi 他 第35回日本分子生物学会大会 2012

(5) Soichiro Tanakura 他 第85回日本生化学会大会 2012

(6) Shogo Sawaguchi 他 第85回日本生化学会大会 2012

(7) Kohei Hida 他 第85回日本生化学会大会 2012

(8) Hiderou Yoshida PepCon 2013

(9) Hiderou Yoshida 奈良先端未来開拓「コロキウム」シンポジウム 2011

(10) Hiderou Yoshida 第63回日本細胞生物学会大会 2011

(11) Hiderou Yoshida Gordon Research Conference 2011

(12) Hiderou Yoshida 第84回日本生化学会大会 2011

(13) Hiderou Yoshida Cold Spring Harbor Meeting 2010

(14) Hiderou Yoshida 第62回日本細胞生物学会大会 2010

(15) Hiderou Yoshida International GCOE symposium 2010

〔図書〕 (計 1 件)

(1) Mai Taniguchi and Hiderou Yoshida Elsevier Comprehensive Biotechnology - Unfolded Protein Response 2011 525-537

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem2/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 秀郎 (YOSHIDA HIDEROU)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号：60378528

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
若林 貞夫 (WAKABAYASHI SADA0)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
研究者番号：80148436

谷口 麻衣 (TANIGUCHI MAI)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
研究者番号：00423898