

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570167

研究課題名(和文) ゴルジタンパク質によるゴルジ嚢の長さ調節とカーゴ輸送調節の分子機構解明

研究課題名(英文) Giantin regulates the early secretory pathway by controlling communication among Golgi stacks

研究代表者

佐藤 あやの (SATO, AYANO)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：40303002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、分泌や輸送における中心的な役割を果たす細胞内小器官であるゴルジ体、とその周辺輸送に関わるゴルジタンパク質群に関して研究を進めている。本研究では、ゴルジファミリーに属する、Giantinが、細胞内の輸送とゴルジ体形成を調節するということを明らかにした。これらの事実は、Giantinの発現量を変化させることによって細胞内輸送や分泌を調節することができるということを意味する。つまり、Giantinを標的として、分泌調節薬の開発が可能であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Golgin tethers function in COPI vesicle transport around the Golgi apparatus. Here we show by RNAi that the loss-of-function of a golgin tether, Giantin changed the length of Golgi cisternae. Cargo transport increased in the RNAi cells. Furthermore, surface glycosylation patterns and localization of Golgi enzymes were changed in the RNAi cells. These suggest that golgin tethers may be necessary for Golgi formation and give an accuracy of COPI vesicle transport.

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：6703

キーワード：分泌 ゴルジ体 細胞内輸送 糖鎖

1、研究開始当初の背景

細胞の中で作り出された様々な物質を正しい目的地へと送り届けるため、細胞内には細胞内輸送とよばれる物流システムが存在する。この物流は、主に小胞を介して行われると考えられている。

細胞が作り出す全タンパク質のうち、およそ1/3は、小胞体の中で作られ、物流システムに乗せられ、次の目的地であるゴルジ体へ輸送される。この小胞体からゴルジ体への輸送は、COPIIと呼ばれる小胞によって媒介されている。ゴルジ体は、小胞体から輸送されたタンパク質に糖鎖修飾などの化学修飾を施し、最終目的地への荷札をつける役割を担う。ゴルジ体周辺では、COPIと呼ばれる小胞による輸送が重要であると考えられている。

2、研究の目的

我々は、輸送に中心的な役割を果たす細胞内小器官であるゴルジ体と、その周辺輸送を司るCOPI小胞の研究を進めてきた。そして、COPI小胞の種別化にゴルジンタンパク質ファミリーが関与することを見出した(Malsam J, Satoh A *et al*, *Science* 2005; Satoh A *et al*, *Traffic* 2003; Beard M, Satoh A *et al*, *JBC* 2005; Satoh A *et al*, *Traffic* 2008)。本研究では、ゴルジンファミリーに属する、Giantinが輸送にどのように関与するかを明らかにし、輸送の分子機構の理解へ繋げることを目的とした。

3、研究の方法

siRNAを用いたGiantinのノックダウンを行い、Giantin欠損細胞で、1)細胞内輸送(SEAP

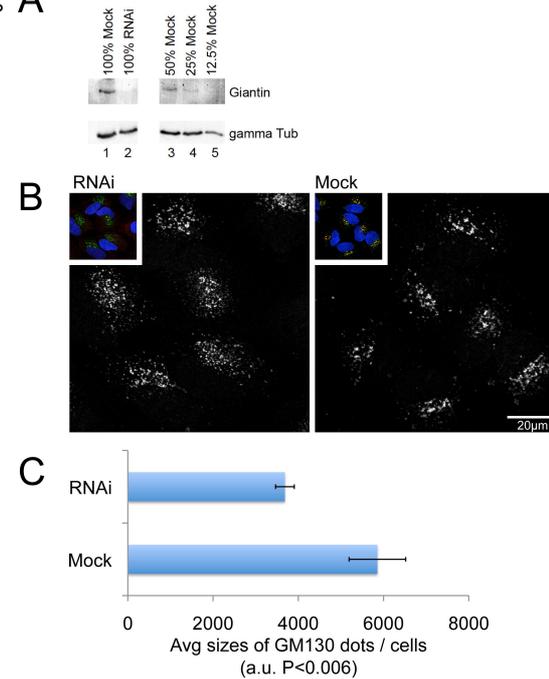
secretion assay, VSVG transport assay)、2)細胞表面の糖鎖構造(蛍光標識レクチンを使用)、3)微小管重合阻害剤の影響がどのように変化するかを解析した。A

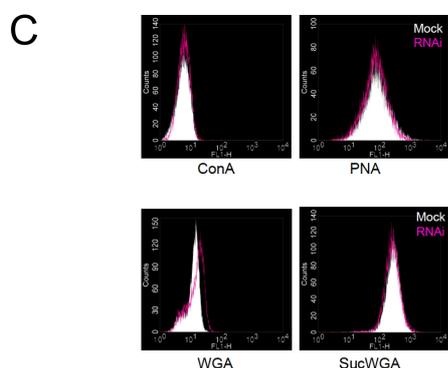
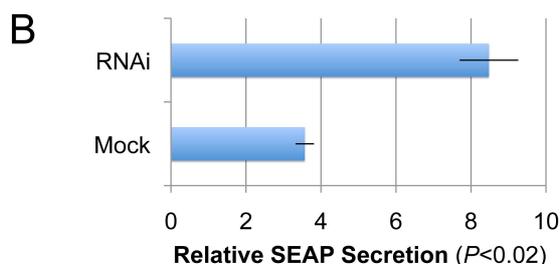
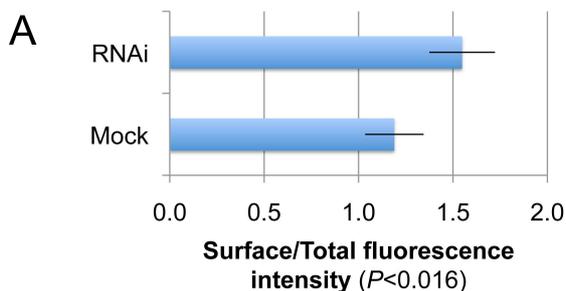
4、研究成果

Giantin ノックダウンの細胞内輸送、細胞表面糖鎖構造への影響

図は、上からA)VSVGタンパク質の小胞体から細胞表面への変化、B)SEAPタンパク質の

細胞外への輸送(分泌)の変化、C)レクチンConA, PNA, WGA, SucWGAの反応性の変化を、Giantin ノックダウン(RNAi)と対照(mock)で比較したものである。A), B)より、Giantin ノックダウンにより細胞内輸送が増大することが示された。C)では、WGA(GlcNAc, シアル酸認識レクチン)反応性に変化が見られたが、SucWGA(WGAを化学処理しGlcNAcを欠く)反応性には変化が見られないため、ノックダウンにより、細胞表面のシアル酸含有糖鎖構造に変化が起きたと考えられた





Giantin ノックダウンの効率とノックダウンによる mini-stack 構造の変化

図は、上からそれぞれ A) Giantin のノックダウン効率のウェスタンブロッティングによる定量、B、C) 微小管重合阻害剤 Nocodazole 処理した HeLa 細胞の免疫蛍光顕微鏡像とその定量結果である。Giantin のノックダウン効率は、全ての実験で 85-95% であった。微小管重合阻害剤処理により、通常ゴルジ体はリボン構造が崩壊し、上図 B の右側に示したような構造 (mini-stack 構造) をとる。しかしながら、Giantin のノックダウン細胞では、この mini-stack 構造がさらに分断化し (上図 B 左、上図 C で示したように mini-stack 数が倍増した。

以上のことから、Giantin はゴルジ体 stack の組織化を介して輸送を調節すると考えられた。

今後、この組織化の詳細を明らかにするため、電子線トモグラフィー等を用い、ゴルジ体の細構造の解析を行いたいと考えている。

5、主な発表論文等

[雑誌論文] (すべて査読あり、計 10 件)

- 1) Koreishi, M., Gniadek, T. J., Yu, S., Masuda, J., Honjo, Y., Satoh, A. PLoS One 8, e59821 (2013).
- 2) Koreishi, M., Yu, S., Oda, M., Honjo, Y., Satoh, A. PLoS One 8, e54382 (2013).
- 3) Satoh, A., Iwakiri, Y. Trends in Glycoscience and Glycotechnology 25, 241-244 (2013).
- 4) Yamada, H., Abe, T., Satoh, A., Okazaki, N., Tago, S., Kobayashi, K., Yoshida, Y., Oda, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Matsui, H., Takei, K. J Neurosci 33, 4514-4526.
- 5) Tashiro, K., Satoh, A., Utsumi, T., Chung, C., Iwakiri, Y. Am J Pathol, (2013).
- 6) Matsuda, S., Yan, T., Mizutani, A., Sota, T., Hiramoto, Y., Prieto-Vila, M., Chen, L., Satoh, A., Kudoh, T., Kasai, T., Murakami, H., Fu, L., Salomon, D. S., Seno, M. Int J Cancer, (2013).
- 7) Sekhar, S. C., Kasai, T., Satoh, A., Shigehiro, T., Mizutani, A., Murakami, H., El-Aarag, B. Y., Salomon, D. S., Massaguer, A., de Llorens, R., Seno, M. J Cancer 4, 391-401 (2013).
- 8) Zong, M., Satoh, A., Yu, M. K., Siu, K. Y., Ng, W. Y., Chan, H. C., Tanner, J. A., Yu, S. PLoS One 7, e29995 (2012).
- 9) Chen, L., Kasai, T., Li, Y., Sugii, Y., Jin, G., Okada, M., Vaidyanath, A., Mizutani, A.,

Satoh, A., Kudoh, T., Hendrix, M. J., Salomon, D. S., Fu, L., Seno, M. PLoS One 7, e33544 (2012).

- 10) Koreishi, M., Honjo, Y., Satoh, A. Antibody Technology Journal 2011, 5-11 (2011). 他

[学会発表] (計5件)

- 1) 第32回日本糖質学会年会, Aug 5, 2013, 大阪国際交流センター, ゴルジ体形成と分泌におけるゴルジタンパク質の機能解析, 佐藤あやの
- 2) 第65回日本細胞生物学会大会, Jun 19, 2013, ウィンクあいち(愛知県産業労働センター), The golgin tether Giantin regulates the secretory pathway by controlling stack organization within Golgi apparatus, Satoh A
- 3) 第52回アメリカ細胞生物学会年会, Dec 15, 2012, San Francisco, CA, USA, The role of CK2 in Sec31 phosphorylation and membrane trafficking, A. Satoh
- 4) 第35回日本分子生物学会年会, Dec 11, 2012, 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡, Sec31 のリン酸化と膜輸送におけるCK2の機能解析, A. Satoh
- 5) 第84回日本生化学会大会, Sep 21, 2011, 京都国際会議場, Function of Golgin family proteins in trafficking and Golgi biogenesis, A. Satoh

[産業財産権]

出願状況 (計3件)

- (1) 名称: Giantin を標的とする RNAi 誘導性核酸及び分泌機能改善剤
発明者: 佐藤あやの
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2012-547615

出願日: 25年11月22日

国内外の別: 国内

(2) 名称: 細胞死抑制剤及び新規化合物

発明者: 佐藤あやの・仁科勇太

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/55532

出願日: 26年3月5日

国内外の別: 国際出願

(3) 名称: 細胞死抑制剤及びその製造方法

発明者: 佐藤あやの・仁科勇太

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/55533

出願日: 26年3月5日

国内外の別: 国際出願

[その他]

ホームページ等

<http://www.biotech.okayama-u.ac.jp/labs/satoh>

6、研究組織

(1) 研究代表者

佐藤あやの (Ayano Satoh)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号: 40303002