

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 2日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657131

研究課題名（和文） ゴルジ装置の pH センサーと局在メカニズムに関する研究

研究課題名（英文） Study of Golgi pH sensor and the mechanism for the localization

研究代表者

前田 裕輔 (MAEDA YUSUKE)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：00294124

研究成果の概要（和文）：(1) ゴルジ装置の pH センサー分子かまたはそのすぐ下流に位置するタンパク質の同定のための重要な手がかりとして、強制発現にて GPHR 欠損細胞のタンパク輸送遅滞と糖鎖修飾異常の両方を抑える事の出来る細胞質タンパク質 A と、更にタンパク質 A と競合してその効果を阻害するタンパク質 B を発現クローニング法にて同定した。(2) 糖転移酵素の局在異常ではなく複合体形成異常が糖鎖修飾異常のメカニズムとして考えられた。

研究成果の概要（英文）：

(1) As an important clue to identify a Golgi pH sensor or its downstream factor, protein A whose overexpression corrects the mutant phenotypes such as delayed transport and impaired glycosylation, and protein B whose overexpression cancels the normalizing effect of protein A, were identified by expression cloning. (2) Impaired complex formation of glycosyltransferases but not their mis-localization in the Golgi seemed one of the mechanisms for impaired glycosylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：ゴルジ装置・pH ホメオスタシス・pH センサー

1. 研究開始当初の背景

ゴルジ装置、分泌小胞、分泌顆粒、エンドソーム、リソソームなどの分泌経路やエンドサイトーシス経路に位置するオルガネラは、酸性オルガネラと呼ばれ、その内腔側は pH 4.5～6.5 程度の酸性に保たれている。酸性オルガネラの pH は、液胞型プロトンポンプ、カウンターイオンチャネル、プロトンリークの三者のバランスで調節されていると考え

られている。プロトンポンプはオルガネラ内腔にプロトンを搬入させ酸性化するが、その結果プロトンの濃度勾配によって膜電位が生じ、更なるプロトンの搬入にとって負荷となる。カウンターイオンチャネルは、陰イオン（クロライドイオン）の流入か陽イオン（ナトリウムまたはカリウムイオン）の流出によってその膜電位を打ち消しプロトンポンプの効率を改善する役割を持つ。当研究課題申

請者はタンパク質の輸送を制御する因子の網羅的同定という研究の中で独創的なスクリーニング法を用いてゴルジ装置特異的に酸性化障害を示す初めての変異細胞株を樹立し、同時にその原因遺伝子 *GPHR* を発現クローニング法によって同定した。変異細胞株の解析により *GPHR* タンパク質が初めて同定されたゴルジ装置に局在するカウンターイオンチャンネルとしてゴルジ装置の内腔側の酸性化に寄与し、その欠損では、ゴルジ装置選択的な pH の上昇をプライマリーな障害として、2次的にタンパク質輸送障害、糖鎖修飾不全、ゴルジ装置の形態異常が引き起こされることを報告した。この事実は、ゴルジ装置が正常に機能するためにその内腔の酸性化が必要不可欠であることを明確に証明したが、ゴルジ装置酸性 pH によるタンパク質輸送・糖鎖修飾・ゴルジ装置の形態の調節機構についてはほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

ゴルジ装置の酸性 pH による調節機構の解明の突破口として、(1) pH 調節の情報伝達の開始点、即ち、ゴルジ装置の内腔側 pH を感受して細胞質側に情報を伝達する pH センサーならびにその下流分子の同定、(2) ゴルジ装置に局在するタンパク質の pH 依存的なゴルジ装置への局在メカニズムの解明を行なう。

3. 研究の方法

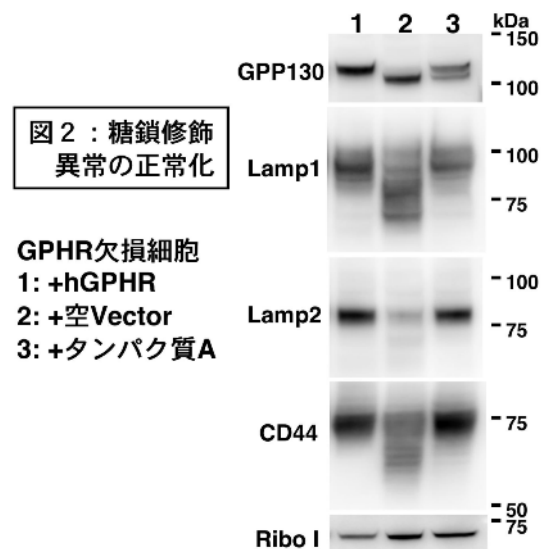
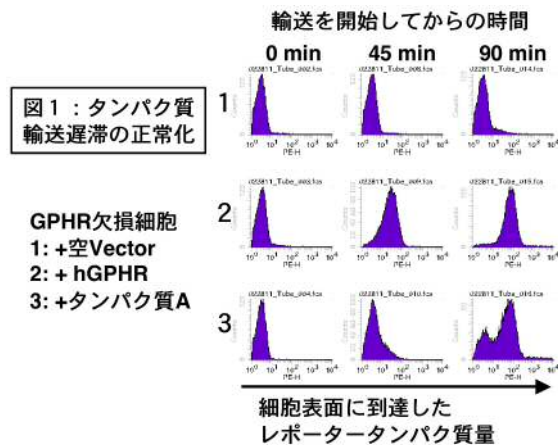
(1) ゴルジ装置の pH センサーならびにその下流分子の同定するために、① プロテオミクスによる pH 依存的にゴルジ膜に結合するタンパク質 (つまりセンサー分子の下流に位置すると思われる分子) の同定する、② cDNA ライブラリーを用いて強制発現によりゴルジ装置酸性化障害の変異表現型 (タンパク質輸送障害または糖鎖修飾不全) を正常化するタンパク質を発現クローニング法により同定する、という2通りの方法を用いた。(2) ゴルジ装置に局在するタンパク質の pH 依存的なゴルジ装置への局在メカニズムの解明のために、① 糖転移酵素と② GBF 1 の2種類のタンパク質の局在メカニズムを検

討した。

4. 研究成果

(1) ① ゴルジ装置の pH センサーならびにその下流分子の同定において、プロテオミクスによる pH 依存的にゴルジ膜に結合するタンパク質の同定は特筆できる成果を得ることはできなかった。その理由として、ショ糖密度勾配超遠心法等で分画精製されたゴルジ装置の純度の問題や、酸性環境を保持できるだけのインタクトネスを維持した条件での精製が困難であり、正常細胞と *GPHR* 欠損細胞間のゴルジ装置結合タンパク質の差異を効率的に分離するには不十分であったことであると考えられる。

② レトロウイルスに構築された cDNA ライブラリーを用いて細胞に遺伝子導入し恒常的に発現させることにより、ゴルジ装置酸性化障害 (*GPHR* 欠損細胞) の変異表現型であるタンパク質輸送障害を正常化した細胞をセルソーターで濃縮しその細胞から導入された

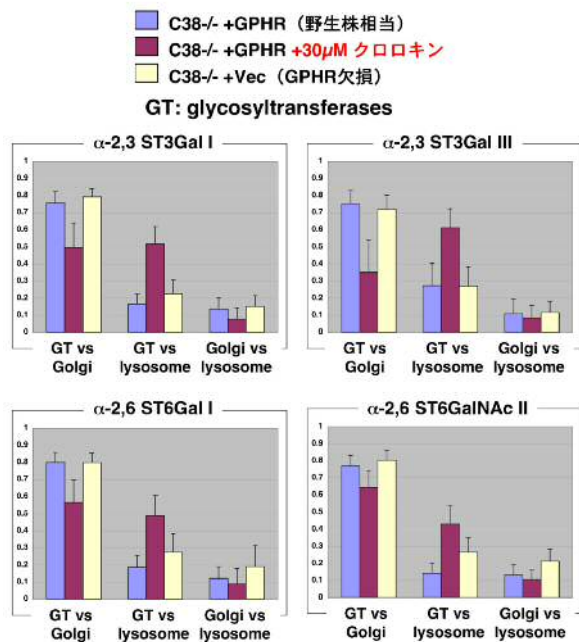


遺伝子を個別に再検討し、タンパク質輸送遅滞と糖鎖修飾異常の両方を正常化する遺伝子Aを同定する事が出来た(図1、2参照)。同定された遺伝子は細胞質タンパク質をコードしていたが全長ではなかった。非常に興味深いことに、まだプレリミナリーな結果ではあるが、細胞質タンパク質Aの強制発現はゴルジ装置内腔の酸性化障害の正常化を伴っていないようであり、にも拘らずタンパク質輸送遅滞と糖鎖修飾異常の異なった表現型の両方を正常化することから、

i) ゴルジ装置内腔側で起こる酸性化障害は、pHセンサーを介して細胞質側に伝わり、タンパク質輸送障害や糖鎖修飾異常を引き起こす。これは、輸送に関するマシナリーの多くが細胞質側に存在することと符合する、
 ii) 細胞質に存在するタンパク質Aの過剰発現は pH センサー分子そのものかまたは細胞質側でそのすぐ下流に位置し、両方のシグナルが分岐する前のタンパク質に結合しそれらを活性化または不活化することで正常化する、という可能性を強く示唆していると考えられる。更に、タンパク質Aの標的タンパク質が過剰発現されれば再び異常表現型(タンパク質の輸送遅滞)が出現すると仮定し、cDNA ライブラリーを用いた発現クローニング法にてその標的タンパク質を同定することを試みた結果、小胞体に局在する膜タンパク質Bを同定することができた。タンパク質Bはカルシウムの調節に関与していることが示唆されており、興味深い。現在、両者の機能的相互関係の解析によって pH ホメオスタシスの制御機構の解明を試みており、今後、進展が期待される。(2) ① 糖鎖修飾異常は、これまでのプロトンポンプ阻害剤などの薬剤を用いた実験から糖転移酵素の局在異常によると考えられていたので、糖転移酵素を pH 依存的なゴルジ装置局在メカニズムの解明のためのモデルタンパク質として用いることにした。しかしながら、GPHR 変異細胞において糖転移酵素とゴルジ装置またはリソソームマーカータンパク質との共局在の度合いを共焦点顕微鏡画像でピアソンの相関係数を測定して調べたところ、すべての酸性オルガネラに対して酸性化障害をもたらすクロロキンでは、これまで報告されているよ

うに糖転移酵素のリソソームへのミスローディングが見られたが、ゴルジ装置選択的酸性化障害では糖鎖修飾不全が見られるにも拘らず糖転移酵素の局在異常はほとんど起きていないことが判明した(下図参照)。そこで次に糖転移酵素の複合体形成に注目

糖転移酵素とゴルジ装置またはリソソームマーカータンパク質との共局在を示すピアソンの相関係数



した。タンパク質の糖鎖修飾は多種類の糖転移が時空間的に正しく行なわれることが必要であり、そのため糖転移酵素は複合体を形成しこの問題に対処していると考えられているからである。実際、ネイティブゲルを用いた観察から糖転移酵素の複合体形成が部分的ではあるが損なわれており、これが糖鎖修飾異常の原因の一つであると考えられた。また前述のタンパク質Aの強制発現がこの複合体形成を正常化するかどうか現在検討中である。

② GBF1 のゴルジ膜への局在は、PI4P への結合が重要であるというこれまでの知見から、PI4P に選択的に結合すると考えられている FAPP1 タンパク質の PH ドメインに蛍光タンパク質を結合したものをプローブとして用いた。FAPP1-PH とゴルジ装置との共局在の度合いを共焦点顕微鏡画像でピアソンの相関係数を測定して PI4P の局在を検討した。その結果、GPHR 変異細胞では、ゴルジ膜での PI4P

量の有意な減少を認めた。つまりゴルジ装置内腔側の酸性化障害で観察される GBF1 のゴルジ装置局在低下の原因が、GBF1 のゴルジ膜への結合パートナーである PI4P のゴルジ装置での濃度低下であると考えている。現在、この PI4P の濃度低下の分子メカニズムの解明を試みている。PI4P は、ゴルジ装置において多くのタンパク質の局在や機能（とくにタンパク質・脂質輸送）に関わっている事が知られており、今後の発展が期待される。

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)

[学会発表] (計3件)

1. ゴルジ装置の酸性環境による細胞内コレステロールの生合成・輸送の調節：前田裕輔，奥崎 大介，木下タロウ、第 85 回日本生化学会大会、2012. 12. 14-16、福岡国際会議場（福岡）
2. The mechanisms by which Golgi acidic pH regulates glycosylation：前田 裕輔、New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences、2012. 9. 27-28、東京大学（東京）
3. ゴルジ装置の pH 環境による糖鎖修飾の制御メカニズム；前田 裕輔、第 84 回日本生化学会大会(招待講演)、2011. 9. 22、国立京都国際会館（京都）

[その他]

ホームページ等

免疫不全疾患研究分野へようこそ!

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 裕輔 (MAEDA YUSUKE)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：00294124