

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31日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～ 2012

課題番号：23657136

研究課題名（和文） ゴルジ体ストレス応答経路群の網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of regulatory pathways controlling mammalian Golgi stress response

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を強化する機構であり、細胞が自律的に機能するために必須の調節機構である。これまでにゴルジ体ストレス応答の一経路である TFE3 経路を同定したが、ゴルジ体内でどのような分子的变化が起こって、ゴルジ体ストレス応答を活性化しているのかについては全く未解明であった。解析の結果、ゴルジ体で起こるべき糖鎖修飾がうまく起こらないことが活性化シグナルになっていることを見出した。

研究成果の概要（英文）： The Golgi stress response is an autoregulatory mechanism controlling the capacity of the Golgi apparatus in accordance with cellular demands. We analyzed what kinds of molecular changes activate the Golgi stress response, and revealed that deficiency of glycosylation in the Golgi apparatus is responsible for activation 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
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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、ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

細胞には小胞体やゴルジ体などの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。このような細胞の需要に応じた細胞小器官の量的調節機構の研究は細胞生物学の根幹に関わる重要な研究課題であるが、核を除いてほとんど行われてこなかった。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。更に、ゴルジ体の量的調節機構であるゴルジ体ス

レス応答機構の研究を開始し、ゴルジ体ストレス応答によって転写が制御されている標的遺伝子を検索するとともに、応答を制御する転写制御配列 GASE を同定し、GASE に結合して転写を制御する転写因子 TFE3 を単離した。転写因子 TFE3 の活性化機構を解析したところ、TFE3 は平常時にはリン酸化されることによって細胞質に繫留されているが、ゴルジ体ストレス時には TFE3 は脱リン酸化されて核へ移行し、ゴルジ体の機能を担う遺伝子の転写を活性化することを明らかにした。また、リン酸化されるアミノ酸残基を同定するとともに、リン酸化制御に関わるリン酸化酵素と脱リン酸化酵素の候補をいくつか単離

した。

しかしながら、小胞体ストレス応答には複数の応答経路があることから、ゴルジ体ストレス応答にも複数の応答経路が存在する可能性がある。特に、ゴルジ体は小胞体と違って性質の異なる層板から構成されており、それぞれの層板では異なった種類の翻訳後修飾が行われていることから、それぞれの層板に特異的な応答経路が存在し、それぞれの機能を調節している可能性がある。

また一方で、ゴルジ体内でどのような分子的变化が起こることによってゴルジ体ストレス応答が活性化されるのかについても、全く未解明であった。小胞体の場合は、何らかの理由によって小胞体シャペロンによるタンパク質のフォールディングがうまく行かなくなり、立体構造が異常なタンパク質が小胞体内に蓄積することが小胞体ストレス応答を引き起こす分子の実体であることが明らかになっている。ゴルジ体の機能は、糖鎖修飾などの翻訳後修飾と輸送詳細による選別輸送であることから、これらの機能の不全がゴルジ体ストレスを引き起こしている可能性が高いが、全く何もわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は2つある。1つめは、TFE3 経路以外に存在すると期待されるゴルジ体ストレス応答の応答経路を網羅的に同定し、その分子機構を明らかにすることである。ゴルジ体ストレス応答の全応答経路を明らかにすることによって、哺乳類のゴルジ体ストレス応答の全体像を明らかにしようと考えた。

2つめの目的は、どのような分子的变化がゴルジ体に起こることによってゴルジ体ストレス応答が活性化されるのか、すなわちゴルジ体ストレスの分子の実体を明らかにすることである。ゴルジ体ストレスの分子の実体を明らかにすることによってゴルジ体ストレスのセンサー分子の同定が容易となり、同定したセンサー分子を用いてゴルジ体ストレスの感知機構をあきらかにする。小胞体ストレス応答の場合は、構造異常タンパク質が直接センサー分子に結合して活性化するものと、センサーに結合して活性化を抑制している分子シャペロンに構造異常タンパク質が結合することで分子シャペロンがセンサー分子から解離し、その結果センサー分子が活性化するという2つのメカニズムが提唱されている。ゴルジ体ストレス応答においてもストレス感知機構の解明は極めて重要な研究課題である。

小胞体と様々な疾患、例えば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との関わりは既に明らかにされているが、ゴルジ体に関しては研究の基盤が確立されていないために疾患との関わりが未だ明確でない。しかしながら、ゴルジ体での糖鎖修飾異常が原因となって発症する疾患が知られるようになり、ゴルジ体と病態との関連に注目が集まりつつある。以上の2つの研究を行うことによって哺乳類のゴルジ体ストレス応答の分子機構を明らかにし、ゴルジ体が関与する様々な疾患とゴルジ体ストレス応答の関わりを研究することを可能として、病態解明や治療法の開発に資する基盤的研究を確立することを期待している。

3. 研究の方法

上記の解析のために、哺乳類細胞に様々な処理を行ってゴルジ体の機能不全を起こし、TFE3 経路が活性化されるかどうかを検討した。具体的な方法としては、第1に、ゴルジ体構造タンパク質であるGCP60のドミナントネガティブ体 (GCP60-DN) を発現させてゴルジ体の機能を失わせることを試みた。GCP60はゴルジ体の機能を担うタンパク質 Giantin がゴルジ体に局在するために必須であり、GCP60-DNを発現させると Giantin がゴルジ体に局在化できなくなるとともにゴルジ体が断片化し、ゴルジ体での小胞輸送が阻害されることが知られている。

第2に、mucin 型糖鎖修飾の阻害剤である Benzyl-GalNAC で処理することを試みた。mucin 型糖鎖で一番最初に取り込まれる糖は GalNAc であるため、Benzyl-GalNAC が細胞内に大量に存在すると、GalNAc 以降の糖鎖はほとんどが Benzyl-GalNAC にとられてしまい、mucin core protein にほとんど糖鎖が付加されない状態になることが知られている。

第3に、プロテオグリカンの糖鎖修飾阻害剤である Xyloside で処理することも試みた。プロテオグリカンのコアタンパク質に付加される最初の糖は xylose である。従って、細胞内に xyloside が大量に存在すると xylose 以降の糖鎖がほとんど xyloside にとられてしまい、プロテオグリカンの糖鎖修飾がほとんど起こらなくなることが知られている。Xyloside としては、4-MU Xyloside と 4-NP Xyloside の2種類を用いた。

第4に、シアル酸をゴルジ体に輸送するトランスポーターの発現を RNA 干渉法によって阻害することを行った。ゴルジ体膜にはゴルジ体にシアル酸を輸送するためのトランスポーターである SLC35A1 が存在する。SLC35A1 を RNA 干渉法によって阻害すると、ゴルジ体でのシアル酸付加が起こらなくなることが

知られている。RNA 干渉法による実験と並行して、SLC35A1 の変異体である細胞株 Lec2 を用いた実験も行った。

第5に、小胞輸送を制御する因子群の発現を RNA 干渉法によって阻害することによって既知の TFE3 経路が活性化されるかどうか調べた。ポスト・ゴルジ区画における小胞輸送に関わる因子として、protein kinase D や phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) や phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)、phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve)、YSK1 などの発現抑制を試みた。

これらの処理によって TFE3 経路が活性化されるかどうかをまず調べ、TFE3 経路を阻害しないものについてマイクロアレイ解析や次世代 DNA シークエンサーを用いた deep sequencing を行って、どのような応答経路であるか解析した。TFE3 経路を活性化するものに関しては、更に解析を行い、ゴルジ体内のどのような分子的变化が TFE3 経路を活性化するかについて解析を進めた。

4. 研究成果

GCP60-DN を細胞に発現させたところ、ゴルジ体が断片化するとともに、TFE3 経路が活性化されることがわかった。このことは、TFE3 の活性化シグナルが機能不全のゴルジ体由来であることを示している。Benzyl-GalNAc や Xyloside で処理したところ、やはり TFE3 経路の活性化が見られた。このことは、mucin 型糖鎖修飾やプロテオグリカンの糖鎖修飾のようなゴルジ体での O 型糖鎖修飾の不全がゴルジ体ストレス応答の活性化に重要であることを示唆している。また、シアル酸のトランスポーターの発現を抑制しても TFE3 経路の活性化が起こった。このことは、トランスゴルジで起こる N 型糖鎖へのシアル酸付加の不全もゴルジ体ストレス応答の活性化に関与していることを示している。小胞輸送因子群の発現抑制に関しては、まだ現在検討中である。また、Xyloside を用いたマイクロアレイ解析も進行中である。

以上の結果は、ゴルジ体での糖鎖修飾不全がゴルジ体ストレスの分子の実体である可能性を示唆している。今後は、TFE3 経路以外の応答経路の検索を継続すると同時に、ゴルジ体ストレスのセンサー分子の同定を試み、ゴルジ体ストレスの感知機構を明らかにしたいと考えている。

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 1 2 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

〔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