

「小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答の解析」

2020

小森亮太

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

目次

要旨	3
略号一覧	4
緒言	6
第一章 紫外線による小胞体ストレス応答	
序論	14
結果	15
考察	20
実験手法	22
第二章 ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路	
序論	24
結果	29
考察	56
実験手法	60
結語	64
論文目録	65
参考文献	66
謝辞	72

要旨

真核生物の細胞には様々な細胞小器官が存在し、それぞれの細胞小器官は細胞の需要に応じて、その機能や量が調節されている。小胞体とゴルジ体は膜タンパク質や分泌タンパク質の合成と加工を行う細胞小器官であるが、合成されるタンパク質が増えるなどの要因によりその機能が不足すると、その需要に応じて機能や量が增強される。この機能不足状態をストレス状態といい、それを解消するための機構をストレス応答という。小胞体ストレス応答の分子機構についてはこれまでに明らかになってきたが、環境変化における生理的意義についてはよくわかっていなかった。そこで著者は、ヒトの皮膚細胞に紫外線を照射することにより、紫外線がヒトの細胞で小胞体ストレス応答を引き起こすことを見出した。このことにより、小胞体ストレス応答が特殊な条件下だけでなく、日常の生活の中でも起こりうることを明らかにした。また、著者はこれまでに未知であったゴルジ体ストレス応答の分子機構についての研究も行った。ゴルジ体にはいくつかの機能が存在し、それぞれの機能に応じて個別のストレス応答経路が存在する。著者はその中でもプロテオグリカン経路の解析を行った。プロテオグリカン経路はプロテオグリカンへの糖鎖修飾能力を增強する機構である。筆者はプロテオグリカン経路の分子機構を明らかにするために、プロテオグリカン経路の標的遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、プロテオグリカン経路の転写制御配列である PGSE (proteoglycan-type Golgi stress response element) を同定した。また、PGSE の解析を進めることにより、プロテオグリカン経路を制御する転写因子として KLF (Krüppel-like factor) family を同定した。

略号一覧

ER: endoplasmic reticulum

BiP : binding protein

GRP94 : glucose-regulated protein 94

PDI : protein disulfide isomerase

ERp72 : endoplasmic reticulum resident protein 72

PERK : PKR-like ER kinase

eIF2 α : Eukaryotic Initiation Factor 2 α

ATF6 : activating transcription factor 6

IRE1 : inositol-requiring protein 1

XBP1: X-box binding protein 1

ERAD : ER-associated degradation

S1P: site 1 protease

S2P: site 2 protease

ATF4: activating transcription factor 4

CHOP: C/EBP homologous protein

TFE3 : transcription factor E3

SIAT4A : sialyltransferase 4A

STX3A : syntaxin 3A

GCP60 : Golgi complex-associated protein of 60kDa

CREB3 : cAMP response element binding protein 3

HSP47 : heat shock protein 47kD

NHDF: Normal Human Dermal Fibroblasts

ERSE: ER stress response element

UPRE: unfolded protein response element

AARE: amino acid-response element

AGEs: advanced glycation end-products

GASE : Golgi apparatus stress response element

SDC2: Syndecan2

GAG : glycosaminoglycan

GlcA : glucuronic acid

Gal : galactose

Xyl : xylose

GalNAc : N-acetylgalactosamine

GlcNAc : N-acetylglucosamine

4MU-xyloside : 4-methyl umbelliferyl-beta-D-xyloside

NDST2 : N-deacetylase/N-sulfotransferase 2

4NP-xyloside : 4-nitrophenyl-beta-D-xyloside

CSGALNACT2 : Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2

GLCE : glucuronic acid epimerase

HS6ST1 : heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1

PGSE : Proteoglycan-type Golgi Stress response Element

KLF : Krüppel-like factor

緒言

細胞小器官の量的調節機構

真核生物の細胞の中には、分泌タンパク質や膜タンパク質のフォールディングを行う小胞体や、小胞体から運ばれてきたタンパク質の糖鎖修飾や小胞輸送を行うゴルジ体、細胞内で使用するエネルギー源となるATPを合成するミトコンドリアなどの細胞小器官が存在する。これらの細胞小器官の量や機能は厳密に調節されており、それらが不足した際には需要に応じて増強されている。実際、分泌タンパク質をあまり産生していない肝細胞では小胞体やゴルジ体はそれほど発達していないが、分泌タンパク質を大量に産生する粘液分泌細胞では、これらの細胞小器官は非常に発達していることが知られている（図1）（1）。需要に応じてこれらの細胞小器官の量や機能を調節するためには、その細胞小器官が不足しているという情報を核に伝える分子機構が必要である。実際に小胞体をはじめとしたいくつかの細胞小器官における、量的調節の分子機構に関する報告がされている（2）。本研究では、小胞体の量的調節機構である小胞体ストレス応答とゴルジ体の量的調節機構であるゴルジ体ストレス応答について述べる。

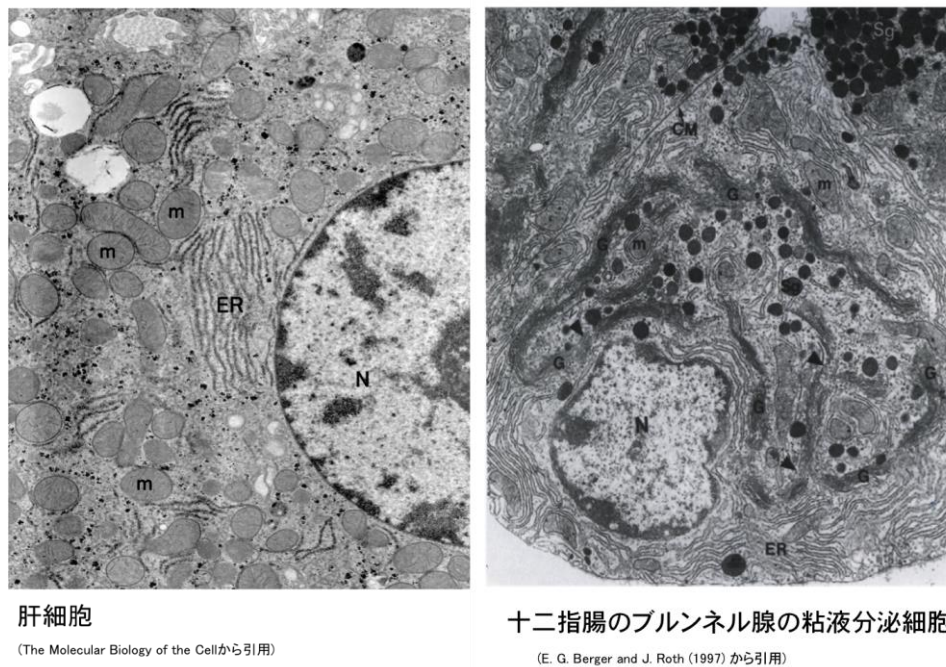


図1：需要に応じて細胞小器官の量は調節されている

ER：小胞体 G：ゴルジ体 m：ミトコンドリア CM：細胞膜 N：核

小胞体ストレス応答 –小胞体の量的調節機構–

小胞体の主な機能は、小胞体で合成された分泌タンパク質や膜タンパク質のフォールディングを行うことである。小胞体内にはBiPやGRP94などの分子シャペロンや、PDIやERp72などの立体構造形成に関わる酵素が存在しており、これらの機能により膜タンパク質や分泌タンパク質の正しいフォールディングが行われる(3,4)。しかし、小胞体で合成されるタンパク質の量が増えるなどの理由により小胞体の機能が不足してしまうと、フォールディング異常のタンパク質が小胞体に蓄積してしまう。このような小胞体の機能が不足する状態を小胞体ストレス状態という。小胞体での異常タンパク質の蓄積は細胞にとって極めて危険な状態であり、迅速にこの状態を解消する必要がある。

真核生物の細胞には、小胞体ストレスを解消するために小胞体ストレス応答という機構が存在する(図2)。ここでは哺乳類における小胞体ストレス応答について簡単に説明する。哺乳類の小胞体ストレス応答には、PERK経路、ATF6経路、IRE1経路という3つの経路が存在する。それぞれPERK, ATF6, IRE1が小胞体ストレスを感知するセンサー分子として働き、その情報を下流へと伝える。PERKに関しては、小胞体ストレス状態を翻訳開始因子であるeIF2 α へと伝え、新生タンパク質の翻訳抑制を行うことで小胞体への負担を軽減する。ATF6に関しては、小胞体ストレスのセンサー分子であるATF6自身が転写因子となり、核にストレス状態を伝え、小胞体シャペロン遺伝子の転写を誘導することでフォールディング機能を増強する。IRE1に関しては、転写因子XBP1にストレス状態を伝え、XBP1が核へとその情報を伝えることでERAD(小胞体関連分解)因子遺伝子の転写を誘導し、異常タンパク質の分解を促進させて小胞体ストレスを解消する。哺乳類では主にこの3つの経路により、小胞体ストレス状態を解消しようとする。各経路の概要を図3,4,5にまとめる。

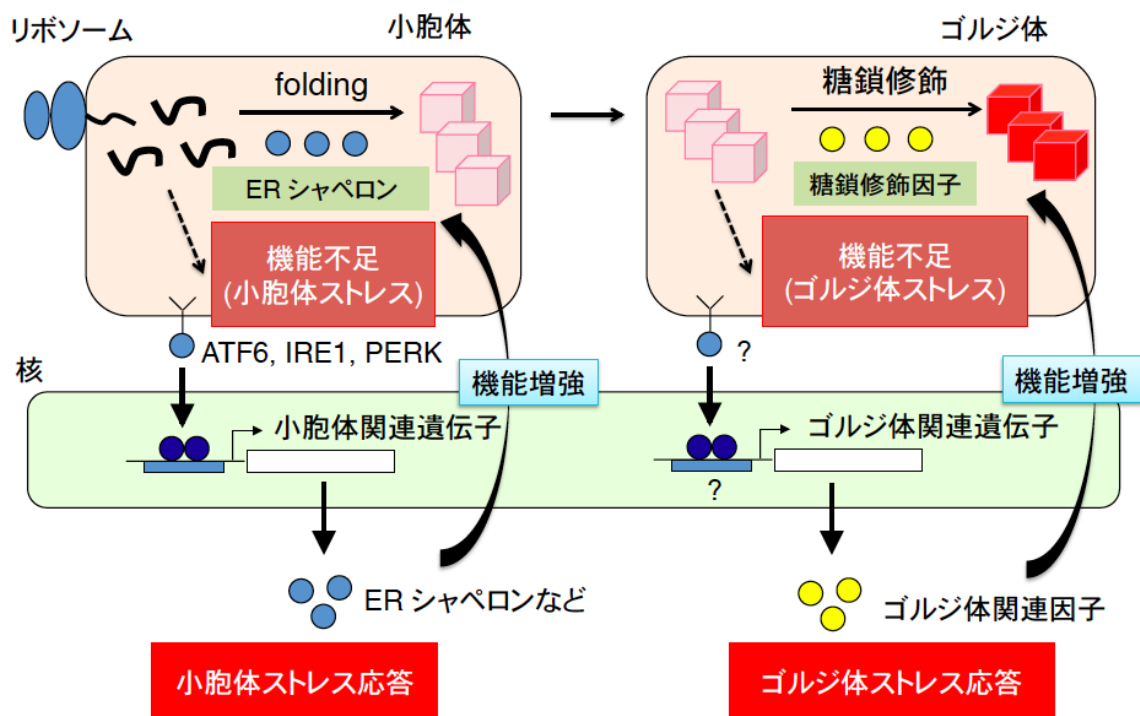


図 2 : 小胞体ストレス応答、ゴルジ体ストレス応答の概要

ATF6経路

ATF6経路では、センサー分子であるpATF6(P)が小胞体ストレスを感知し、経路の活性化を行う。小胞体ストレス非存在下では、pATF6(P)に分子シャペロンであるBiPが結合し、pATF6(P)のゴルジ体移行シグナルを覆うことで、pATF6(P)を小胞体に係留している(5-8)。しかし、小胞体ストレス時にはpATF6(P)からBiPが解離することで、pATF6(P)がCOP II小胞によりゴルジ体へと輸送される。ゴルジ体へと輸送されたpATF6(P)は、ゴルジ体内に存在するsite-1 proteaseとsite-2 proteaseによって切断され、pATF6(P)の細胞質側が膜から切り離される(9-11)。切り離されたpATF6(N)は核へと移行して、転写因子として働く。転写因子pATF6(N)は主に、小胞体シャペロンの転写を誘導しており、ATF6経路はこの機構により、小胞体のフォールディング機能を増強している(図3)。

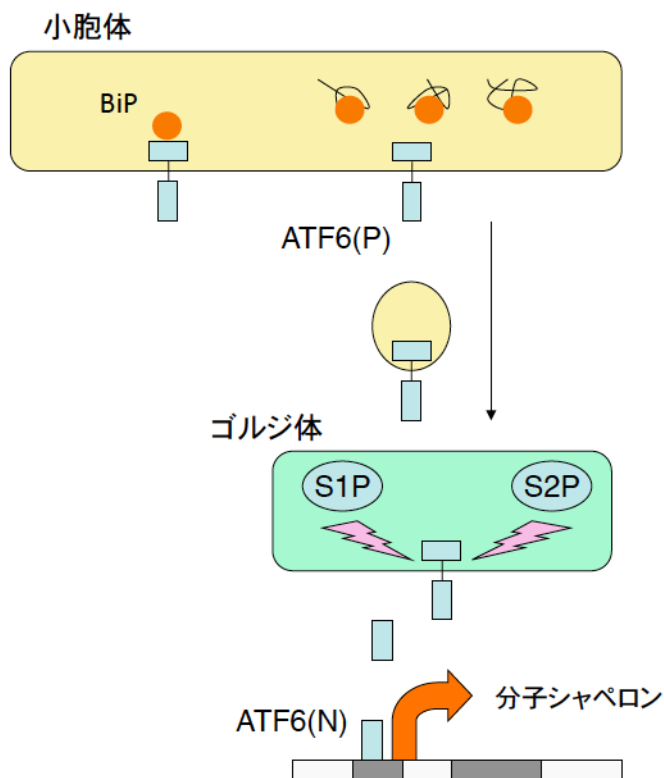


図3：小胞体ストレス応答 ATF6 経路の概要

IRE1 経路

IRE1 経路では、センサー分子である IRE1 が小胞体ストレスを感知し、経路の活性化を行う(11-13)。活性化された IRE1 はオリゴマー化し、細胞質に存在する未成熟型 *XBPI mRNA* のスプライシングを行う(14)。スプライシングされた成熟型 *XBPI mRNA* から翻訳された pXBPI(S)は転写因子として働き、ERAD に関連する遺伝子の転写を活性化させる(14)。この機構により、小胞体内に蓄積したフォールディング異常のタンパク質を分解し、小胞体ストレスを解消する (図 4)。

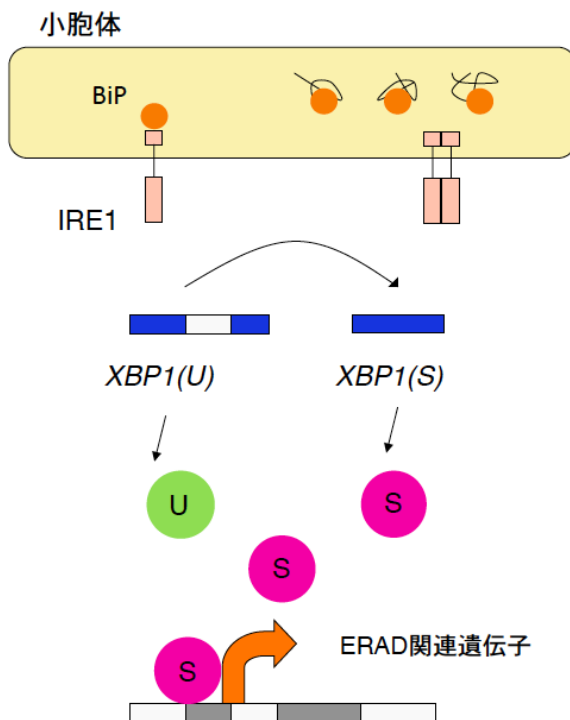


図 4 : 小胞体ストレス応答 IRE1 経路の概要

PERK 経路

PERK経路では、センサー分子であるPERKが小胞体内のフォールディング異常のタンパク質の蓄積を認識し、経路の活性化を行う。小胞体ストレス非存在下では、PERKに分子シャペロンであるBiPが結合しPERKを不活性化しているが、小胞体内にフォールディング異常のタンパク質が蓄積すると、BiPがそれらのタンパク質のフォールディングを助けるためにPERKから解離する(15)。このことがきっかけとなり、PERKがオリゴマー化する。オリゴマー化したPERKはキナーゼドメインが自己リン酸化を行うことにより、活性型のPERKとなる。そして活性型となったPERKは、そのキナーゼ活性により翻訳開始因子であるeIF2の α サブユニットをリン酸化する。eIF2による翻訳の開始は、eIF2に結合するGTPをGDPへと加水分解することにより行われるが、リン酸化されたeIF2 α は、結合したGDPからGDPへの再生を阻害するため、eIF2は不活性型の状態となり、タンパク質の翻訳が抑制される(15-17)。PERK経路は、このような機構により新たに合成されるタンパク質を抑制し、小胞体ストレスの軽減を担っている。また、eIF2 α のリン酸化は一般的なタンパク質の翻訳を抑制する一方で、ATF4などの一部のタンパク質の翻訳を促進する。翻訳されたATF4は、CHOP遺伝子などのアポトーシス関連遺伝子の転写を促進し、細胞死を引き起こすことが知られている(18)(図5)。

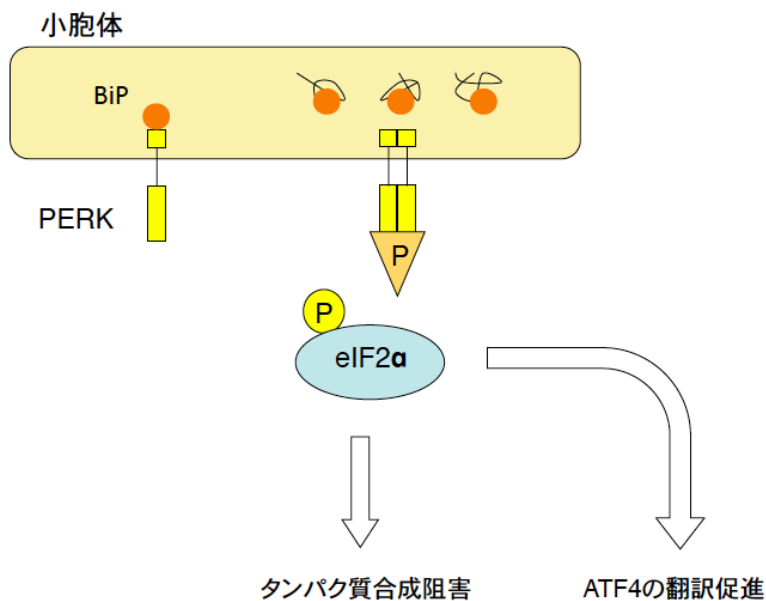


図5：小胞体ストレス応答 PERK 経路の概要

ゴルジ体ストレス応答 –ゴルジ体の量的調節機構–

小胞体から輸送されてきたタンパク質は、ゴルジ体内で糖鎖修飾などの様々な翻訳後修飾を受け、小胞輸送によりそれぞれの場所へと送られる。ゴルジ体でも小胞体のときと同様に、その機能が多く必要とされる細胞では、需要に応じて量や機能を増強していることが考えられる。実際、図1でも示したように、分泌タンパク質を多く産生する粘液分泌細胞では、ゴルジ体が非常に発達していることがわかる。このことから、細胞にはその需要に応じてゴルジ体の機能を増強する機構が存在すると考えて研究を行った。本研究では、ゴルジ体の機能が不足した状態をゴルジ体ストレス状態、不足したゴルジ体機能を増強する機構をゴルジ体ストレス応答と呼んでいる（図2）。

ゴルジ体ストレス応答については、まだまだ多くのことが未知であるが、これまでに我々の研究室で同定したTFE3経路について簡単に紹介する。ゴルジ体ストレスによりTFE3経路が活性化されると、SIAT4A, STX3, GCP60など糖転移酵素や小胞輸送因子、ゴルジ体構造タンパク質遺伝子の転写が誘導されることが明らかになっている。これらの標的遺伝子のプロモーター解析を行うことで、ゴルジ体ストレス依存的な転写を制御する転写制御配列としてGASE (Golgi Apparatus Stress response Element : ACGTGGC) を同定した(19)。さらに、GASE配列に結合して転写を活性化する転写因子であるTFE3を同定した(20)。TFE3は平常時には108番目のセリン残基が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、TFE3経路の活性化により脱リン酸化されて細胞質から核へと移行し、ゴルジ体関連遺伝子の転写を促進することが明らかになっている(図6)。しかし、ゴルジ体ストレスを感知し、TFE3経路を活性化するセンサー分子などについては未だに明らかとなっていない。ゴルジ体ストレス応答の研究は世界で我々の研究室だけがやっている新規の研究分野であったが、2013年に、ゴルジ体ストレス誘導剤BenzylGalNAcによって活性化されるHSP47経路(21)や、ゴルジ体ストレスによるアポトーシスを誘導すると考えられるCREB3経路(22)が報告されており、ゴルジ体ストレス応答の研究は世界に広まりつつある。

ゴルジ体の機能には、上記の経路によって制御されるもの以外にもいくつかの機能が存在し、そのためゴルジ体ストレス応答には他の経路が存在すると考えている。現在、その経路には同定されているものを除いて、少なくとも、プロテオグリカン経路、ムチン経路、コレステロール経路の3つの経路が存在すると考えている(図7)。本研究ではこれまでに同定したTFE3経路と、新規の経路であるプロテオグリカン経路に着目し、その分子機構を明らかにするために研究を行った。

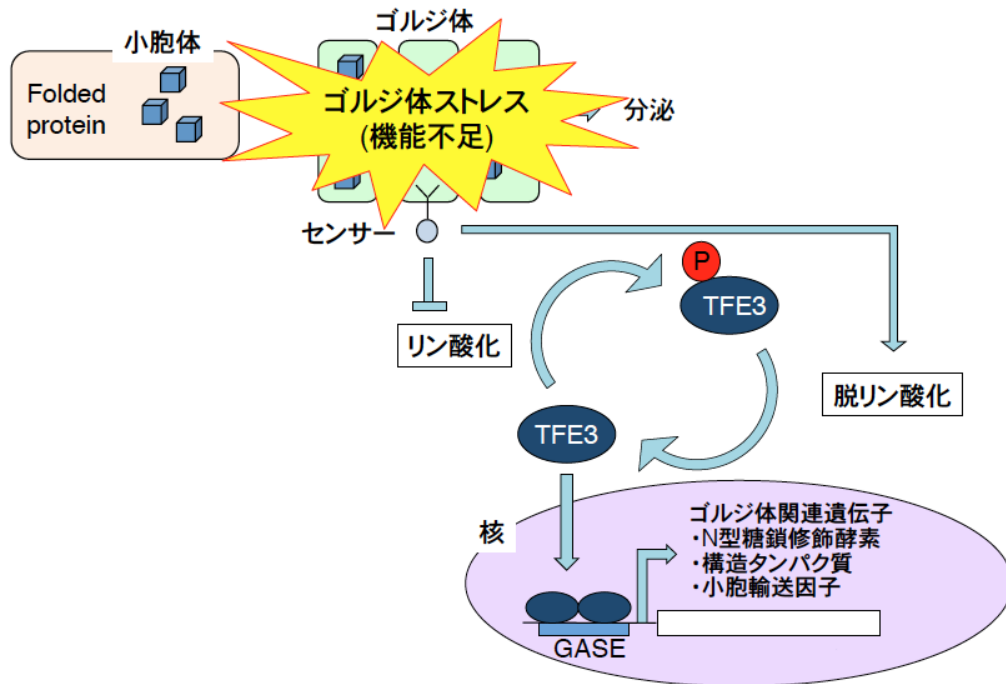


図 6 : TFE3 経路の分子機構

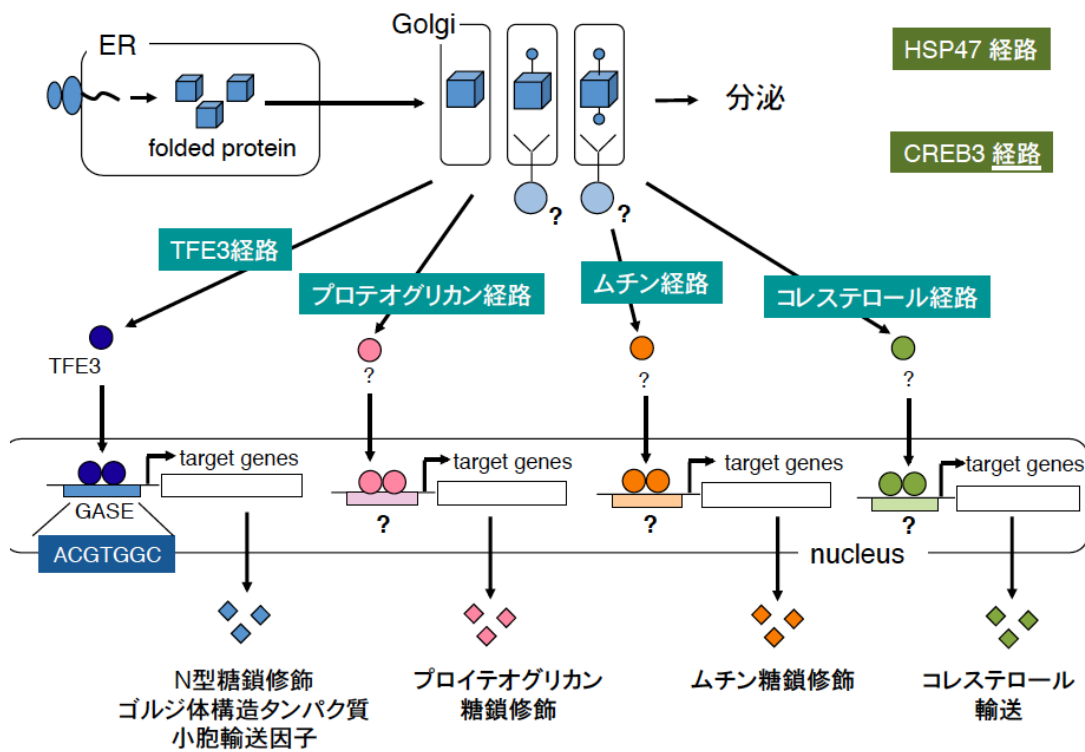


図 7 : ゴルジ体ストレス応答の経路

第1章 紫外線による小胞体ストレス応答

序論

小胞体ストレス応答の生理的意義

小胞体はタンパク質の合成・フォールディングを行う場であるため、さまざまな因子や環境の変化により、小胞体の機能が不足し、フォールディング異常のタンパク質が蓄積することがある。フォールディング異常のタンパク質の蓄積は、細胞のダメージにつながり、この状態が持続すると細胞死が引き起こされることも知られている。神経細胞での小胞体ストレスによる細胞死は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患とも関わっている(23)。また小胞体ストレスは糖尿病にも関わっていると言われている(24)。これら以外にも、小胞体ストレスはさまざまな疾患に関わっていると考えられている。さらに近年では、小胞体ストレス応答が細胞分化や発生、代謝などに関わっていることも報告されている。このように、小胞体ストレス応答はさまざまな疾患や、生理的な現象に関わることが報告されてきた。しかし、その一方で日常的な環境変化などによる外的要因と小胞体ストレスの関わりについてはほとんど研究が行われていなかった。そこで、本研究では日常的に起こりうる環境的な要因が、ヒトの細胞に小胞体ストレスを引き起こしているのかについて研究することにした。本研究では、ヒトの皮膚細胞に紫外線であるUVAを照射することで、小胞体ストレスが引き起こされるかどうか検討することにした。

紫外線照射による人体への影響

太陽から放射される紫外線にはUVA、UVB、UVCが存在する。UVA、UVB、UVCはそれぞれの波長が315nm-380nm、280nm-315nm、200nm-280nmとなっている。UVCに関しては、そのほとんどがオゾン層で吸収されてしまうため、ヒトの皮膚まで届かない。UVBはヒトの皮膚までは到達するが、ほとんどが表皮に吸収されるため、真皮には影響を与えない。しかし、UVAはヒトの真皮まで到達するため、細胞に様々な影響を与えていることが考えられる。

結果

UVA 照射による ATF6 経路の活性化

ヒト皮膚繊維芽細胞 NHDF に UVA を照射した際に、ATF6 経路が活性化しているかを調べた。NHDF 細胞に UVA ($0.05\text{J}/\text{cm}^2 \sim 10\text{J}/\text{cm}^2$) を照射し、6 時間培養後に、ウェスタンブロッティングにより ATF6 の切断が起きているかを調べた (図 8-A)。その結果、UVA の照射量が少ない細胞では、ほとんど ATF6 の切断は見られなかったが、UVA の照射量が増えると ATF6 の切断が見られるようになった。また、もともと ATF6 の切断が見られた $2\text{J}/\text{cm}^2$ の照射量で、時間変化による pATF6 (N) の量を調べた (図 8-B)。その結果、UVA 照射後 2h 経過した細胞で ATF6 の切断が見られはじめ、12h 経過後も ATF6 の切断が見られた。これらの結果から、UVA 照射が小胞体ストレスを引き起こし、ATF6 経路が活性化していることが示唆された。

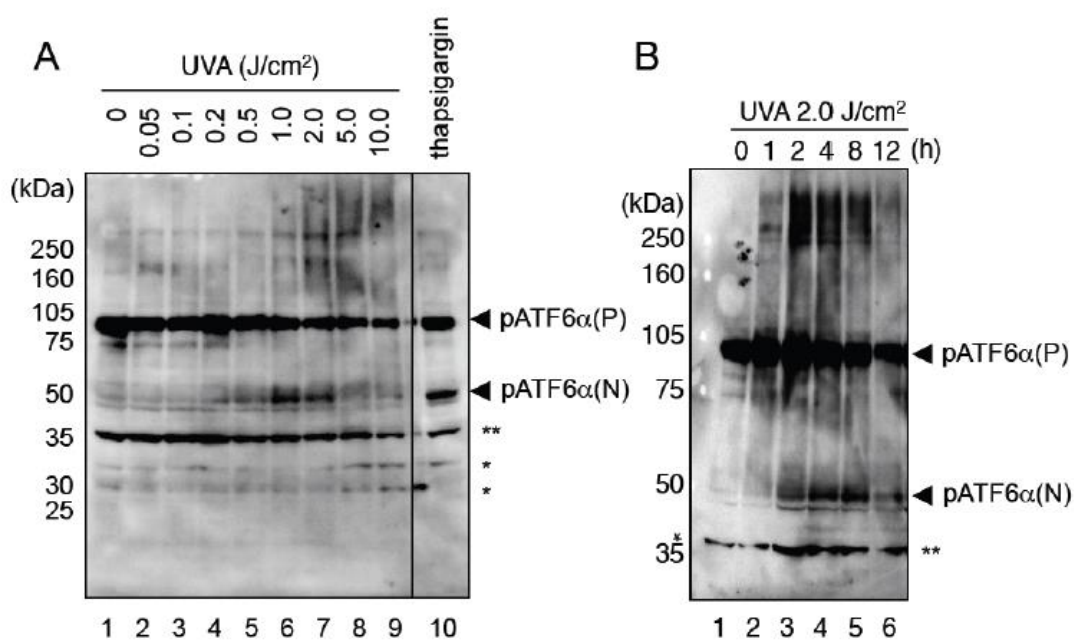


図 8 : UVA による ATF6 経路の活性化の解析

NHDF 細胞に UVA を照射後、細胞を回収してウェスタンブロッティングによる解析を行った。(A) lane 1. 何も処理をしていない細胞。lane 2-9 $0.05\text{J}/\text{cm}^2$ から $10\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA を細胞に照射後、6 時間培養した細胞。lane 10. 小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin を $1\mu\text{M}$ 処理後、6 時間培養した細胞。(B) $2.0\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA を照射後、0~12 時間培養した細胞。アスタリスクは非特異的なバンドを示している。

UVA 照射による IRE1 経路の活性化

NHDF 細胞に UVA を照射した際に、IRE1 経路が活性化しているかを調べた。NHDF 細胞に UVA ($0.1\text{J}/\text{cm}^2 \sim 10\text{J}/\text{cm}^2$) を照射し、4 時間培養後に、IRE1 による *XBPI* のスプライシングが起きているかを、RT-PCR を用いて調べた (図 9)。その結果、UVA の照射量が少ない細胞では、ほとんど成熟型の pXBPI(S)は見られなかったが、照射量が増えるにつれて XBPI (S) の量も増えた (図 9. lane1-6)。また、もっとも *XBPI* のスプライシングが起きていた $10\text{J}/\text{cm}^2$ の照射量で、XBPI (S) の量が時間とともにどのように変化するかを観察したところ、1h 経過から XBPI (S) が見られ始め、24h 経過後も XBPI (S) が見られることがわかった (図 9. lane7-12)。これらの結果から、UVA 照射が小胞体ストレスを引き起こし、IRE1 経路が活性化していることが示唆された。

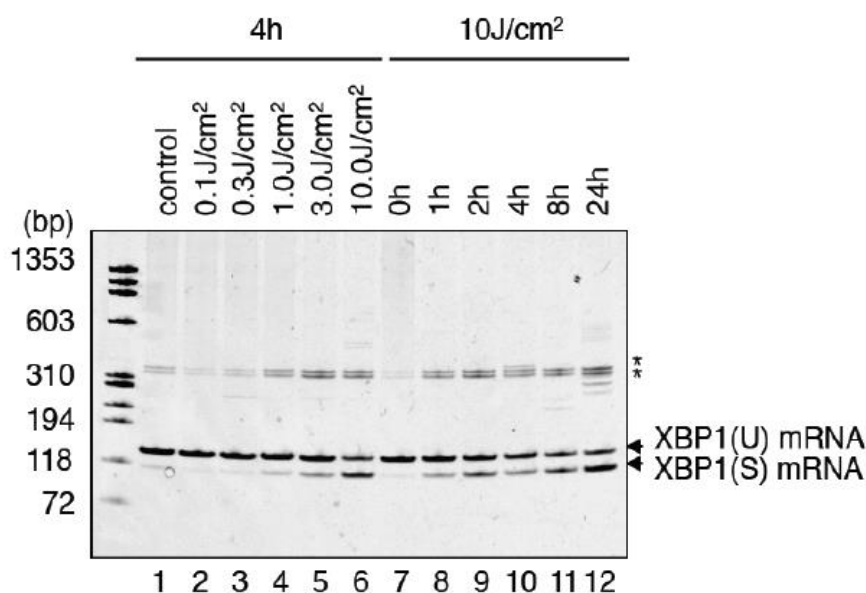


図 9 : UVA による IRE1 経路の活性化の解析

NHDF 細胞に UVA を照射後、細胞を回収して RT-PCR による解析を行った。lane1,7. 何も処理をしていない細胞。lane2-6 $0.05\text{J}/\text{cm}^2$ から $10\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA を細胞に照射後、4 時間培養した細胞。lane8-12. $2.0\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA を照射後、0~24 時間培養した細胞。アスタリスクは非特異的なバンドを示している。

UVA 照射による PERK 経路の活性化

NHDF 細胞に UVA を照射した際に、PERK 経路が活性化しているかを調べた。NHDF 細胞に UVA ($0.05\text{J}/\text{cm}^2 \sim 10\text{J}/\text{cm}^2$) を照射し、6 時間培養後に、ウエスタンブロッティングにより eIF2 α のリン酸化が起きているかを調べた (図 10)。その結果、UVA の照射量が少ない細胞では、リン酸化された eIF2 α の量は UVA を照射していない細胞と変化がなかったが、UVA の照射量が増えると eIF2 α のリン酸化が増加していることがわかった (図 10 上)。この結果から、UVA 照射が NHDF の小胞体ストレスを引き起こし、PERK 経路が活性化していることが示唆された。

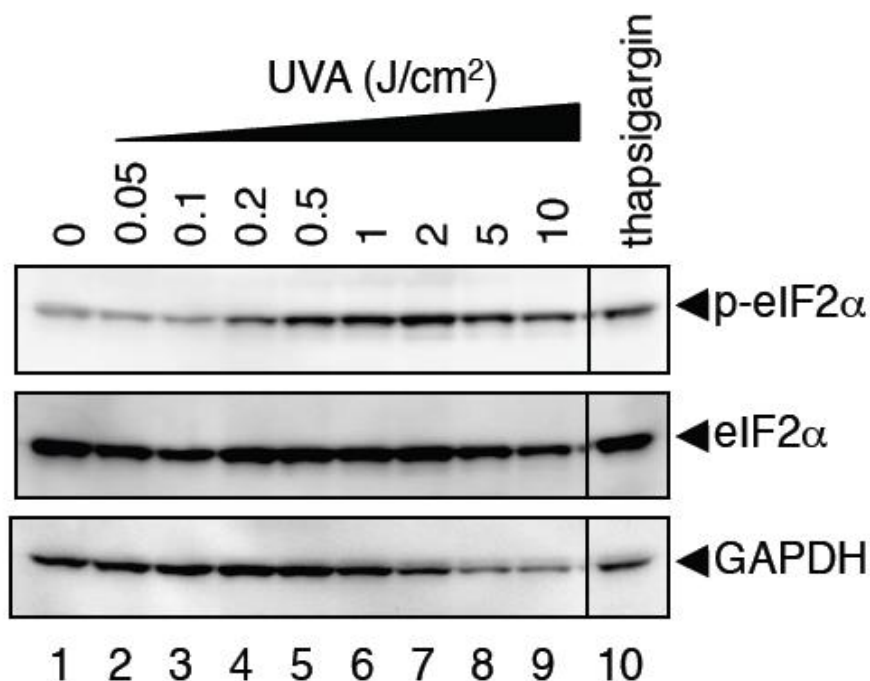


図 10 : UVA による PERK 経路の活性化の解析

NHDF 細胞に UVA を照射後、細胞を回収してウエスタンブロッティングによる解析を行った。lane1,7. 何も処理をしていない細胞。lane2-6 $0.05\text{J}/\text{cm}^2$ から $10\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA を細胞に照射後、6 時間培養した細胞。

UVA 照射による小胞体ストレス応答の転写制御配列からの転写の活性化

NHDF 細胞に UVA を照射した際に、小胞体ストレス応答の転写制御配列からの転写が活性化するかを調べた。まず、ヒトの小胞体ストレス応答の転写制御配列である ERSE、UPRE、AARE にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだものを作製し、NHDF 細胞に導入した。そして、UVA (2J/cm²) を照射し、6 時間培養後に発現したルシフェラーゼの活性を測定することにより、転写制御配列からの転写量を測定した。その結果、小胞体ストレスの誘導剤である thapsigargin を添加した際と同様に、UVA 照射により転写制御配列からの転写の活性化が起きていることがわかった (図 11)。この結果から、UVA 照射が NHDF 細胞の小胞体ストレスを引き起こし、小胞体ストレスにより、転写制御配列からの転写が活性化されることが示唆された。

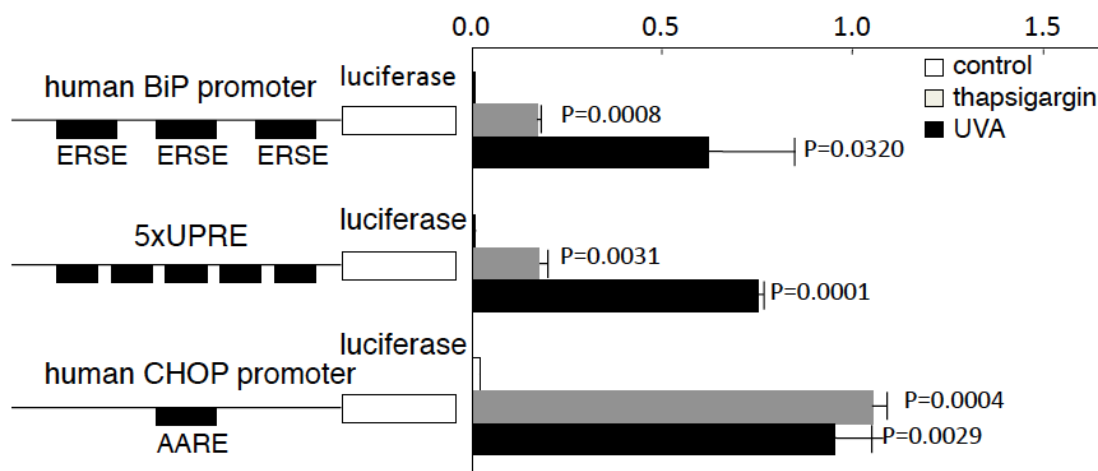


図 11 : UVA 照射による ERSE、UPRE、AARE の活性化の解析

ルシフェラーゼアッセイにより、UVA 照射による ERSE、UPRE、AARE のプロモーター活性を調べた。NHDF 細胞に ERSE、UPRE、AARE とルシフェラーゼ遺伝子を接続したベクターを導入し、プロモーターの活性を調べた。White bar. 処理なしの細胞。Gray bar. 小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin を 1μM 処理後、6 時間培養した細胞。Black bar. 2 J/cm² の UVA を照射したのち、6 時間培養をした細胞。

抗酸化剤による IRE1 経路、PERK 経路の抑制

UVA 照射による小胞体ストレスが、どのようにして引き起こされているのかを調べることにした。UVA が細胞に酸化ストレスを引き起こしている可能性を考え、NHDF 細胞に UVA を照射した際に活性化する IRE1 経路や PERK 経路が、抗酸化剤であるアスコルビン酸によってどのような影響を受けるのかを調べた。培地にアスコルビン酸を添加した状態で、NHDF 細胞に UVA ($2\text{J}/\text{cm}^2$) を照射し、それぞれの経路の活性化状態を調べた。IRE1 経路では、 0.10mM のアスコルビン酸添加により、*XBP1* のスプライシングの抑制が見られた (図 12-A)。PERK 経路では、 0.1mM のアスコルビン酸の添加により *eIF2 α* のリン酸化の抑制が見られ、アスコルビン酸の濃度を 0.25mM まで上げると、*eIF2 α* のリン酸化のさらなる抑制が見られた (図 12-B)。この結果から、UVA が NHDF 細胞に酸化ストレスを起し、小胞体ストレスが引き起こされていることが示唆された。

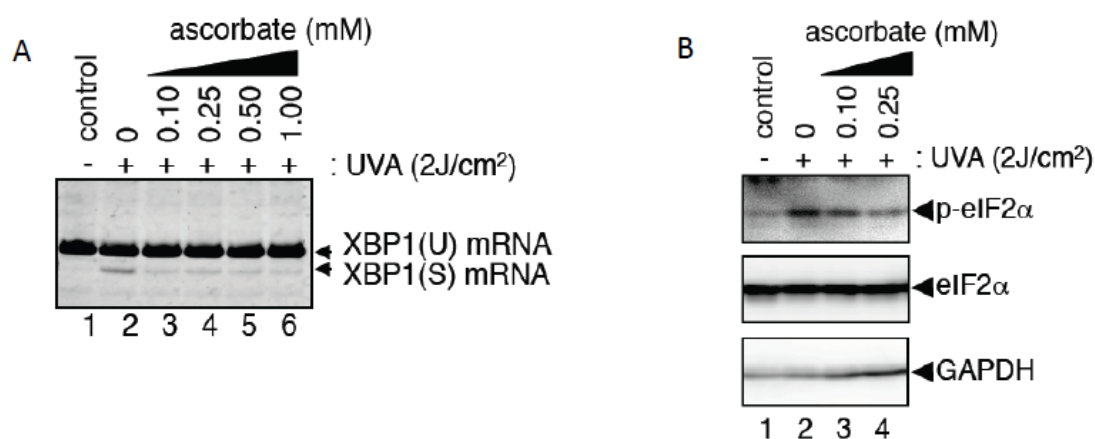


図 12 : アスコルビン酸添加による IRE1 経路、PERK 経路への影響

(A) 培地に $0\sim 1.00\text{mM}$ のアスコルビン酸を添加後、NHDF 細胞に $2\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA 照射を行い、4 時間培養した細胞を用いて、qRT-PCR により、mRNA の定量を行った。

(B) 培地に $0\sim 1.00\text{mM}$ のアスコルビン酸を添加後、NHDF に $2\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA 照射を行い、6 時間培養した細胞を用いて、ウエスタンブロッティングにより、*eIF2 α* のリン酸化状態を調べた。

考察

UVA による小胞体ストレス応答

今回、ヒトの真皮細胞に UVA を照射すると小胞体ストレスが引き起こされることを明らかにした。そこで、実際に人が生活する中で、ヒトの細胞で紫外線によって小胞体ストレス応答が起きているのかを考察する。今回の実験では $0.2\text{J}/\text{cm}^2$ - $10\text{J}/\text{cm}^2$ の強さの UVA を細胞に照射したが、東京で7月に降り注ぐ UVA は、一日平均で $150\text{J}/\text{cm}^2$ ほどである。今回の研究では、3つの小胞体ストレス応答の経路が、 $2.0\text{J}/\text{cm}^2$ 強さの UVA 照射で活性化していることがわかった。このことにより、人は野外で活動している際に、太陽からの紫外線を浴び、UVA による小胞体ストレスを受けていると考えられる。つまり、人は日常の中で環境などの外的要因により小胞体ストレスを受けており、それを解消するために小胞体ストレス応答を働かせていると考えられる (図 13)。

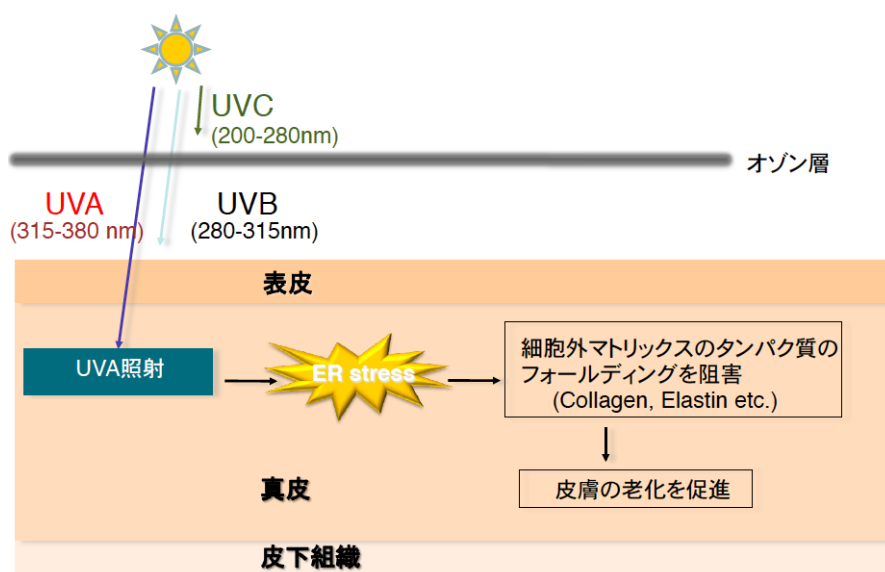


図 13: UVA はヒトの真皮まで届き、小胞体ストレスを引き起こす

UVA 照射に対する各経路の反応の違い

UVA を照射した際、ATF6 経路や IRE1 経路、PERK 経路で、それぞれの経路が活性化し始める UVA の強さや時間が異なっている。ATF6 経路では 0.2-0.5J/cm² の UVA 照射で経路が活性化し始め、5.0-10.0 J/cm² ではほとんど活性化していない。IRE1 経路では 1.0J/cm² で経路が活性化し始め、10.0J/cm² でも活性化している。PERK 経路では 0.2 J/cm² から経路が活性化し始め、2.0 J/cm² あたりでもっとも活性化している。また、活性化している時間に関しては、ATF6 経路では 12 時間経過すると経路の活性が減少し始めているが、IRE1 経路では 24 時間経過しても経路は活性化したままである。このように、3 つの経路ではそれぞれ UVA 照射に対する活性化の条件が異なっている。これは、より効率的に小胞体ストレスに対処するためだと想像される。ATF6 経路はシャペロンの増強、IRE1 経路は蓄積したタンパク質の分解、PERK 経路は翻訳抑制とそれぞれ異なった機能を増強している。ストレスの大きさやストレスが起きてからの時間などによって、どの機能をどれだけ必要なかが異なっており、それに対し効率的に対処するために、それぞれの経路が異なった条件で活性化しているのかもしれない。

UVA はどのようにして小胞体ストレスを引き起こすのか

UVA による小胞体ストレス応答の活性化の際に、培地に抗酸化剤を添加すると、ストレス応答が抑制された。このことから、UVA が酸化ストレスを介して小胞体ストレスを引き起こしていることが示唆された。そこで、どのようにして UVA が酸化ストレスを引き起こし、どのようにして小胞体ストレスが起きているのかを考察する。UVA は細胞内で活性酸素であるスーパーオキシドアニオンラジカルと一重項酸素を産生することが知られている。スーパーオキシドアニオンラジカルは、細胞内の NADPH oxidase の活性化とメイラード反応の生成物である AGEs (advanced glycation end-products) の光増感反応により産生され、一重項酸素はリボフラビン系やポリフィルリン系のクロモファーを介した光増感反応によって産生される(25,26)。活性酸素は生体内で酸化作用を持ち、細胞に酸化ストレスを与えることがわかっている(27)。活性酸素は、細胞内の酸化還元状態維持に重要であるグルタチオンを枯渇させることにより、小胞体内のレドックス環境を変化させ、タンパク質のミスフォールディングを引き起こしていると考えられている(28-30)。また、活性酸素は酸化作用を持ち、小胞体の恒常性維持に必要なタンパク質や脂質を酸化修飾してしまうことにより、小胞体ストレスを引き起こしている可能性もある。

実験手法

細胞の培養と UVA 照射

細胞は NHDF 細胞を用い、Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5 g/L グルコース) に 10 %FBS、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンをそれぞれの終濃度で添加し、37 °C、5 %CO₂ で培養した。そして、培地を phosphate-buffered saline (PBS) に交換した状態で UVA を照射した。照射後の培養は DMEM に 10%FCS、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンをそれぞれの終濃度で添加し、37 °C、5 %CO₂ で培養した。

ウェスタンブロッティング

6cm dish で培養した NHDF 細胞をラバーポリスマンで掻き取り、遠心して細胞を回収した。得られた沈殿を氷上で冷却した PBS (プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク) 及び 10 µM MG132 を含む) に懸濁したサンプルに 4×SDS 細胞溶解液 (200 mM Tris-HCl (pH6.8) , 400 mM DTT, 8 % SDS, 40 % glycerol) を加えて、100°C で 10 分間煮沸した。そして、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。泳動後、Hybind-P 膜 (GE ヘルスケア) に転写し、5%スキムミルク/PBS-T (0.1 % Tween-20 in PBS) で処理した。PBS-T で洗浄後、適当な抗体で反応させ、PBS-T で洗浄後、Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate (TaKaRa) と LAS-3000 (Fuji Film) でシグナルを検出した。

RT-PCR

全 RNA は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム抽出法により細胞から抽出した。このうち 10ug を M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) と Mighty Amo DNA polymerase (TaKaRa) を用いて逆転写、増幅を行なった。プライマーは、*XBPI mRNA* の 493 番目から 512 番目までの塩基 (CGCGGATCCGAATGAAGTGAGGCCAGTGG) と 834 番目から 853 番目までの塩基 (GGGGCTTGGTATATATGTGG) に対応したものを使用した。この逆転写によって増幅した *XBPI mRNA* を TAE-polyacrylamide gel で分離し、Gel Red (Biotium) で染色した後、LAS-3000 (Fuji Film) でシグナルを検出した。

プロモータープラスミド

ERSE、UPRE、AARE のルシフェラーゼアッセイ用のプラスミドに関しては、指導教官である吉田秀郎博士が以前の論文で使用していたものを使った。(31,32,33)

ルシフェラーゼアッセイ

24 well plate、もしくは 96 well plate で培養した HeLa 細胞に、レポータープラスミドと、トランスフェクション効率の差を補正するためのリファレンスプラスミドとして pRluc をリン酸カルシウム法で導入した。レポータープラスミドとリファレンスプラスミドを同時にトランスフェクトした 1 2 時間後、PBS で 1 回洗浄し、培地交換をした。そして、24 時間培養したのちに UVA を照射し、さらに培養し、細胞を回収した。細胞溶解およびルシフェラーゼ活性の測定には、ピッカジーン® デュアルシーパンジー発光キット（東洋インキ）を用いた。

第2章 ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路

序論

ゴルジ体ストレス応答の新規経路

これまでの研究から、ゴルジ体ストレス応答経路としてTFE3経路が同定されている。TFE3経路は、GCP60やSIAT4A、FUT1などのN型糖鎖修飾やゴルジ体構造形成に関わる遺伝子の発現を調節していることがわかっている(34)。しかし、ゴルジ体内で行われるタンパク質への修飾はその他にも存在し、TFE3経路だけでゴルジ体のすべてのゴルジ体の機能を調節しているわけではないことがわかってきた。例えば、ゴルジ体ではプロテオグリカン型の糖鎖修飾やムチン型の糖鎖修飾が起こるが、これらの糖鎖修飾を行う糖鎖修飾酵素の発現はTFE3経路によってはほとんど制御されていない。そこで本研究では、プロテオグリカン型糖鎖修飾酵素の発現を特異的に制御するゴルジ体ストレス応答の新規応答経路であるプロテオグリカン経路が存在するかどうか、またその分子機構はどのようなものであるかについて解析することにした。そして、プロテオグリカン経路の転写制御配列であるPGSE-A、PGSE-Bを同定することに成功した。また、PGSE-Aに結合し、プロテオグリカン経路の活性化を行う転写因子として、KLF familyタンパク質の同定をした。

プロテオグリカン

プロテオグリカンは、コアタンパク質にグルコサミノグリカン（GAG）が結合した糖タンパク質である（35）。その糖鎖の特徴により、非常に水和性に富んだタンパク質で、軟骨の主成分となり、骨同士の摩擦を軽減したりする。また、シグナル伝達などにも関わっており（36）、細胞の増殖や分化など様々な生命現象に必須の分子であることが明らかになっている。GAG は二糖の繰り返し構造が基本構成になっている。この二糖の構造の違いにより、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸などに分類される（図 14）。どの糖鎖が結合する場合でも、コアタンパク質に最初に結合する四糖、GlcA-Gal-Gal-Xyl（GlcA：グルクロン酸、Gal：ガラクトース、Xyl：キシロースを表す）は共通となっている。コンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸の糖鎖修飾過程について、図 15 にまとめた。

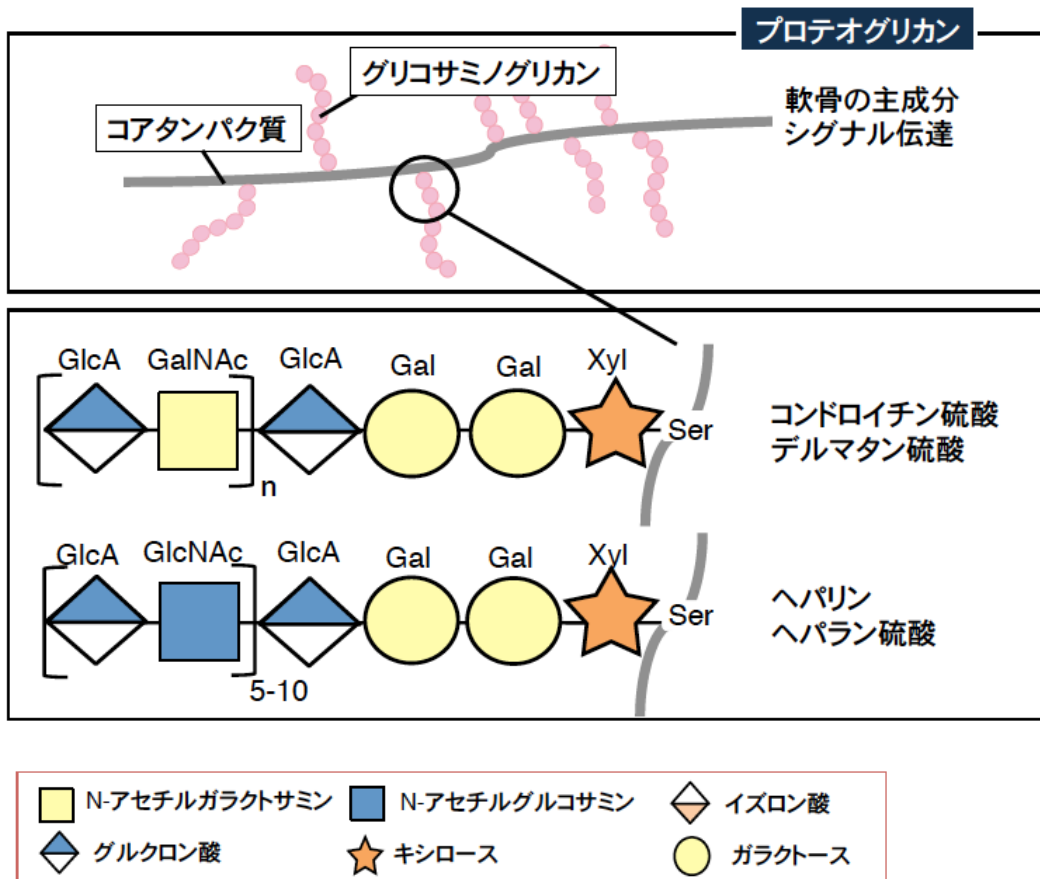


図 14：プロテオグリカンの基本構造

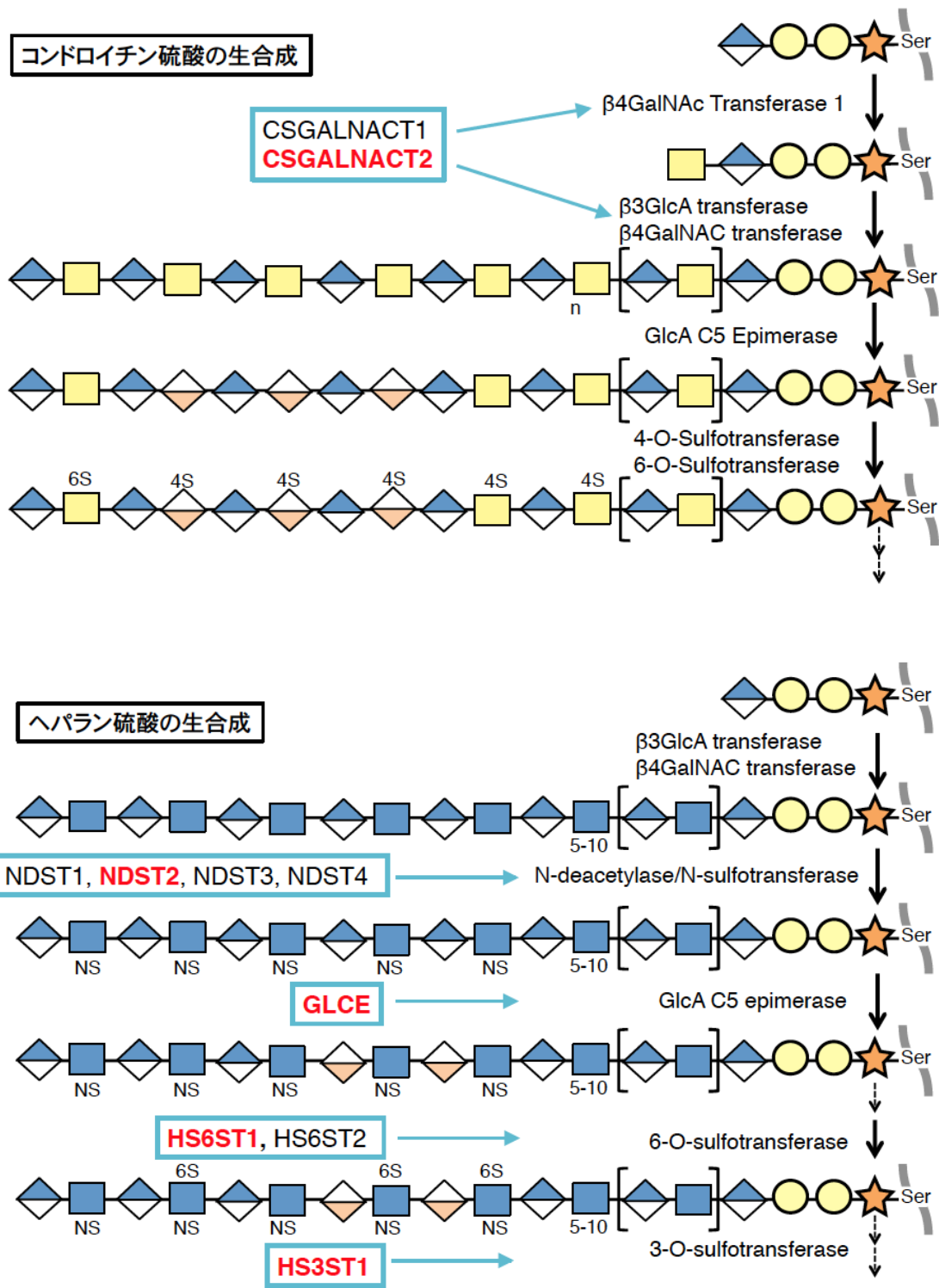


図 15 : コンドロイチン硫酸合成経路とヘパラン硫酸合成経路
赤文字は xyloside 処理により転写が誘導された遺伝子である。

プロテオグリカン経路の活性化

プロテオグリカン経路の解析を行うにあたり、人為的にプロテオグリカンを活性化する必要があり、そこで、本研究においてはプロテオグリカン経路の活性化する方法として、2種類の方法を用いた。まず、最初にプロテオグリカンのコアタンパク質であるSDC2をHeLa細胞に過剰発現させた。SDC2はゴルジ体においてプロテオグリカン型の糖鎖修飾を受けるタンパク質であるため、SDC2の過剰発現によりゴルジ体内のプロテオグリカン型の糖鎖修飾機能が不足する。また、次にプロテオグリカン型糖鎖修飾の阻害剤であるxylosideを用いた。xylosideはキシロースと非常によく似た構造をしており、ガラクトース転移酵素が作用しガラクトースやグルクロン酸などの糖が転移されていく。このことにより本来キシロースに転移されるべき糖鎖がxylosideに転移してしまうという競合阻害が起こり、プロテオグリカンの糖鎖修飾機能が不足する(図16)(37,38)。また、xyloside処理によって糖タンパク質がゴルジ体に蓄積するという報告もある(39)。本研究室の研究によって、SDC2過剰発現やxyloside処理によってゴルジ体が断片化することも確認されていることから(図17,18)、SDC2過剰発現やxyloside処理はゴルジ体に大きなストレスを与えることが期待された。

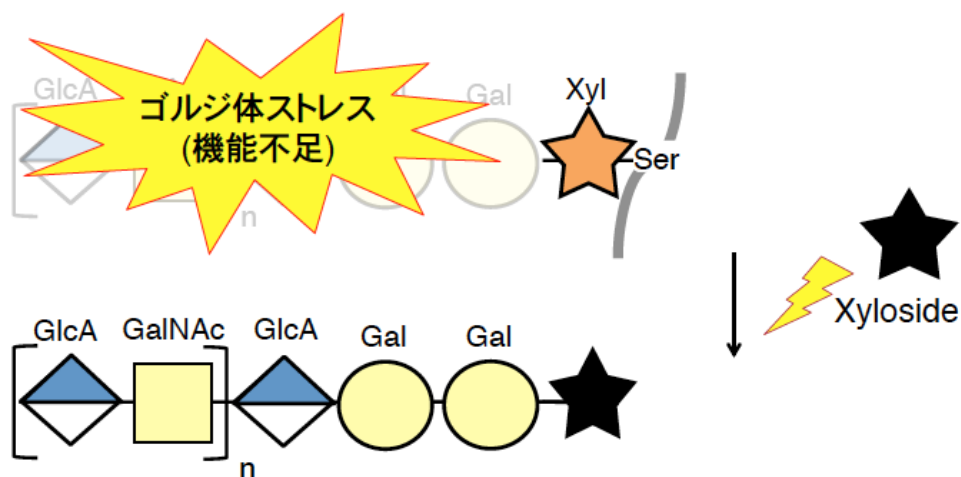


図16：糖鎖修飾阻害剤 xyloside による阻害の仕組み

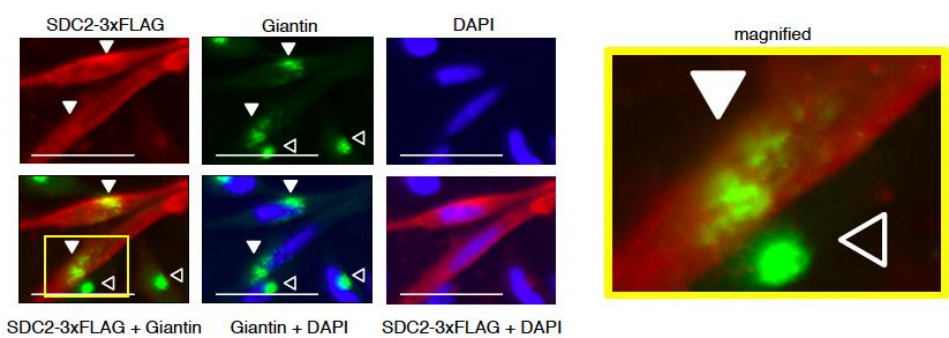


図 17 : SDC2 過剰発現によるゴルジ体の変化

HeLa 細胞に pCMV-3×FLAG-SDC2 を導入した後、免疫抗体染色により観察した。

red : FLAG green : Giantin (Golgi maker) blue : DAPI

白三角 : ゴルジ体ストレスにより断片化したゴルジ体

中抜け白三角 : 通常のゴルジ体

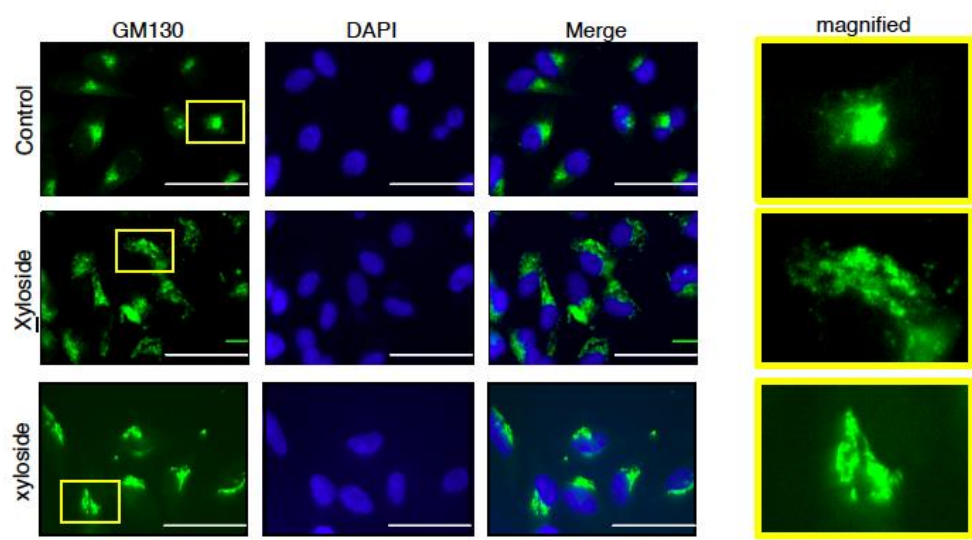


図 18 : xyloside 処理によるゴルジ体の変化

HeLa 細胞に Xyloside 処理した後、免疫抗体染色により観察した。

green : GM130 (Golgi maker) blue : DAPI

結果

1. プロテオグリカン経路の標的遺伝子群の同定

HeLa細胞をxyloside処理してゴルジ体ストレス状態（プロテオグリカン型糖鎖修飾能力を不足させた状態）を引き起こした際に、どのような遺伝子群の転写が誘導されるのかをマイクロアレイ解析により調べた。マイクロアレイではxyloside処理（7.5 mM、16時間）した細胞からRNAを抽出し、未処理の細胞との遺伝子の転写量を比較した。その結果、xyloside処理によってプロテオグリカンの糖鎖修飾に関わる遺伝子であるCSGALNACT2やGLCE、HS3ST1、HS6ST1、NDST2の転写量が有意に増加することがわかった（表1）。

次に、マイクロアレイ解析によって転写誘導が見られたプロテオグリカン型の糖鎖修飾遺伝子について、xyloside処理によって転写誘導をどの程度受けるかqRT-PCRを行って調べた。また、RNA sequencing解析においても同様の結果が得られることがわかった（図19）。マイクロアレイ解析を行ったときと同じ条件（7.5 mM xyloside、16時間）でHeLa細胞を処理し、それぞれの遺伝子のmRNA転写量をqRT-PCRにより調べたところ、プロテオグリカンの糖鎖修飾酵素遺伝子（GLCE, NDST2, HS6ST1,）の転写が上昇することがわかった（図20）。GLCEはヘパラン硫酸（以下 HS）合成においてグルクロン酸をイズロン酸に異性化する酵素(40)、NDST2はHS合成においてN-アセチルグルコサミンを脱アセチル化し硫酸化する最初の酵素(41,42)、HS6ST1はHS合成においてN-アセチルグルコサミンの6位の水酸基を硫酸化する酵素である（43）。

糖鎖修飾

Gene symbol	Full Gene Name	Fold induction	SD
CSGALNACT2	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	3.52	0.38
FUT1	galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 1	2.32	0.63
GALNT10	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase10(GalNAc-T10)	2.08	0.17
GALNT18	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4	3.18	1.81
GCNT4	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2	2.81	1.71
GLCE	glucuronic acid epimerase	2.40	0.17
HS3ST1	heparin sulfate(glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	2.24	0.20
HS6ST1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1	2.90	0.15
MAN2A1	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	2.13	0.23
MGAT4A	mannosyl(alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A	6.76	1.33
NDST2	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 2	2.66	0.15
SDC4	syndecan 4	2.22	0.24
SLC35A5	solute carrier family 35, member A5	2.01	0.04

小胞輸送

Gene symbol	Full Gene Name	Fold induction	SD
GET4	golgi to ER traffic protein 4 homolog (S. cerevisiae)	2.25	0.16
GOSR2	golgi SNAP receptor complex member 2	2.20	0.10
SORCS2	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2	3.15	2.61
SRCIN1	SNAP25-interacting protein	2.59	1.27
STX3	syntaxin 3	2.00	0.10
STX7	syntaxin 7	2.11	0.14
SYS1	Golgi-localized integral membrane protein homolog	2.35	0.05

表 1 : マイクロアレイ解析の結果

7.5 mM の xyloside で 16 時間処理した HeLa 細胞と未処理の HeLa 細胞で、マイクロアレイによる解析を行った。2 倍以上の誘導が見られた遺伝子のうち、ゴルジ体の機能に関与しているものを表に記す。赤文字で示したものは、プロテオグリカンの糖鎖修飾に必要な遺伝子である。各々、3 回の独立した実験の平均値である。

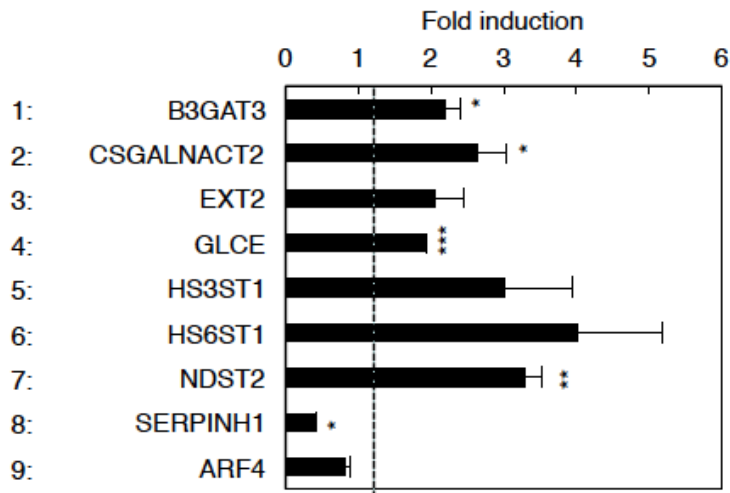


図 19 : RNA-sequecing 解析の結果

7.5 mM の xyloside で 16 時間処理した HeLa 細胞と未処理の HeLa 細胞で、RNA-sequecing による mRNA の解析を行った。各々、3 回の独立した実験の平均値である。

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

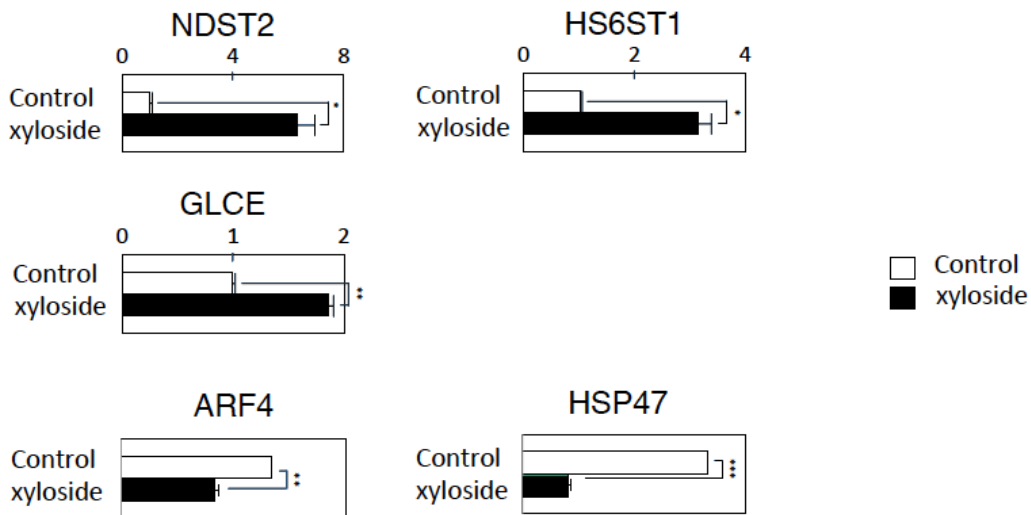


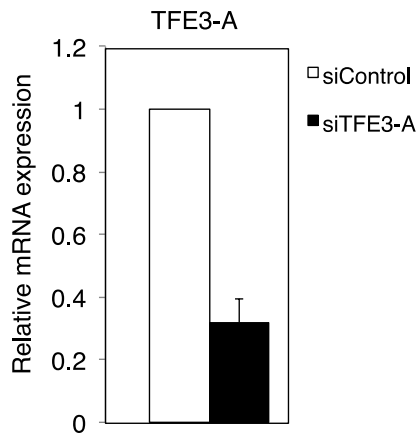
図 20 : xyloside による各標的遺伝子の発現誘導

HeLa 細胞を 7.5 mM の xyloside で処理し、qRT-PCR による mRNA の定量を行った。

各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

上記の実験で観察されたGLCEやNDST2、HS6ST1の転写誘導が、既知の経路であるTFE3経路ではなく新規の経路によって制御されているかどうかを調べた。TFE3経路の主要な制御因子である転写因子TFE3の発現をsiRNAにより抑制した状態（図21-A）で、細胞にxyloside処理（7.5 mM、16時間）によるゴルジ体ストレスを与え、qRT-PCRによりHS6ST1、NDST2、GLCEのmRNAの転写量を調べた。無関係なsiRNAを導入した細胞においては、図9で見られたようにxyloside処理によりこれら3つの遺伝子の転写量が増加した（図21-B lane1, 3, 6）。一方、TFE3を発現抑制した状態でもxyloside処理によりこれらの遺伝子の転写量が同等以上に増加することがわかった（図21-B lane2, 4, 6）。このことから、これら3つの遺伝子の転写誘導は、既知の経路であるTFE3経路による制御ではなく、新規の経路であるプロテオグリカン経路により制御されていることがわかった。

(A)



(B)

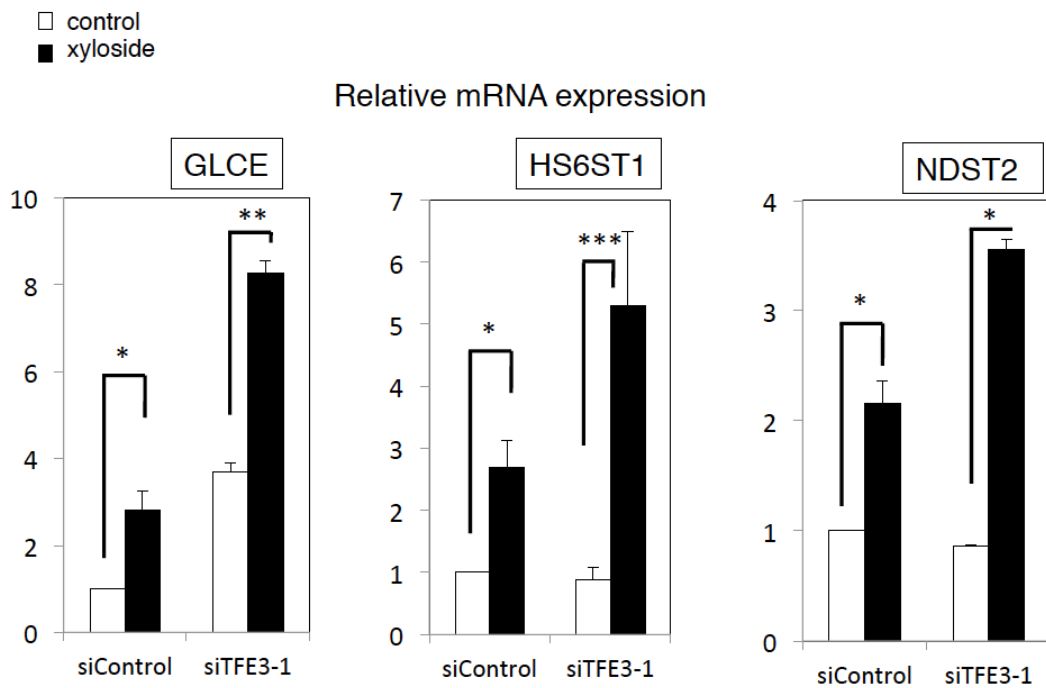


図 21 : 標的遺伝子の転写誘導の TFE3 経路依存性の解析

(A) siTFE3-A による TFE3 発現のノックダウン効率。

(B) TFE3 の発現を抑制した際の各標的遺伝子の転写誘導。

HeLa 細胞に siTFE3-A を導入した後、7.5 mM xyloside で 16 時間処理を行い、qRT-PCR によって各遺伝子の mRNA の転写量を測定した。各々、3 回の独立した実験の平均値である。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

2. プロテオグリカン経路の標的遺伝子の転写制御配列の探索

次に、プロテオグリカン経路の分子機構を明らかにするために、ゴルジ体ストレスによる標的遺伝子の転写を制御する転写制御配列を同定することにした。本研究では、その中でも HS6ST1 遺伝子、NDST2 遺伝子、GLCE 遺伝子のプロモーター解析を行い、転写制御配列の同定を試みた。

ヒトHS6ST1遺伝子のプロモーター解析

ヒトHS6ST1遺伝子のプロモーター領域の欠失変異体を複数作製し、それらとルシフェラーゼ遺伝子を繋いだものをHeLa細胞に導入した。これらの細胞にxyloside処理によるゴルジ体ストレスを与えたときと、ストレスを与えていないときのルシフェラーゼの酵素活性を比較することで、HS6ST1の転写活性を制御する領域を探索した。転写開始点の上流-1910 ntから下流+24 ntまでのプロモーター配列を持つ欠失変異体では、xyloside処理によって強い転写誘導が見られた(図22-A lane2)。転写開始点の上流-346 ntまでを欠失させても転写活性はほとんど低下しなかったが、-254 ntまで欠失させると、転写活性が大きく減少した(図22-A lane 7)。このことは、転写制御配列の上流側の端が、転写開始点上流-346 nt~-254 ntに存在することを示している。次に、下流側から削った欠失変異体を作製した。下流側から削った欠失変異体では、作製した全ての変異体で、細胞にxyloside処理をすることで未処理の細胞と比べて、転写の大きな誘導が見られた(図22-B)。

次に、これらの変異体の中でも、領域が十分に短くて特に大きな転写誘導が見られた転写開始点上流-346 nt~-306 ntの欠失変異体(図 22-B lane6)のすべての塩基に対して点変異を導入しその影響をしらべることによって、この領域に存在する転写制御配列を明らかにすることにした。転写開始点上流-346 nt~-306 ntの欠失変異体の点変異体にルシフェラーゼ遺伝子をつないで細胞に導入してその転写活性を調べたところ、いくつかの点変異体(図 23 lane 4, 14-16, 18, 20,25-29, 31-33)では野生型と比べ、有意に転写誘導能が低下した。また、その中でも連続して転写活性の低下が見られた2つの配列をRegion-A、Region-Bとした。

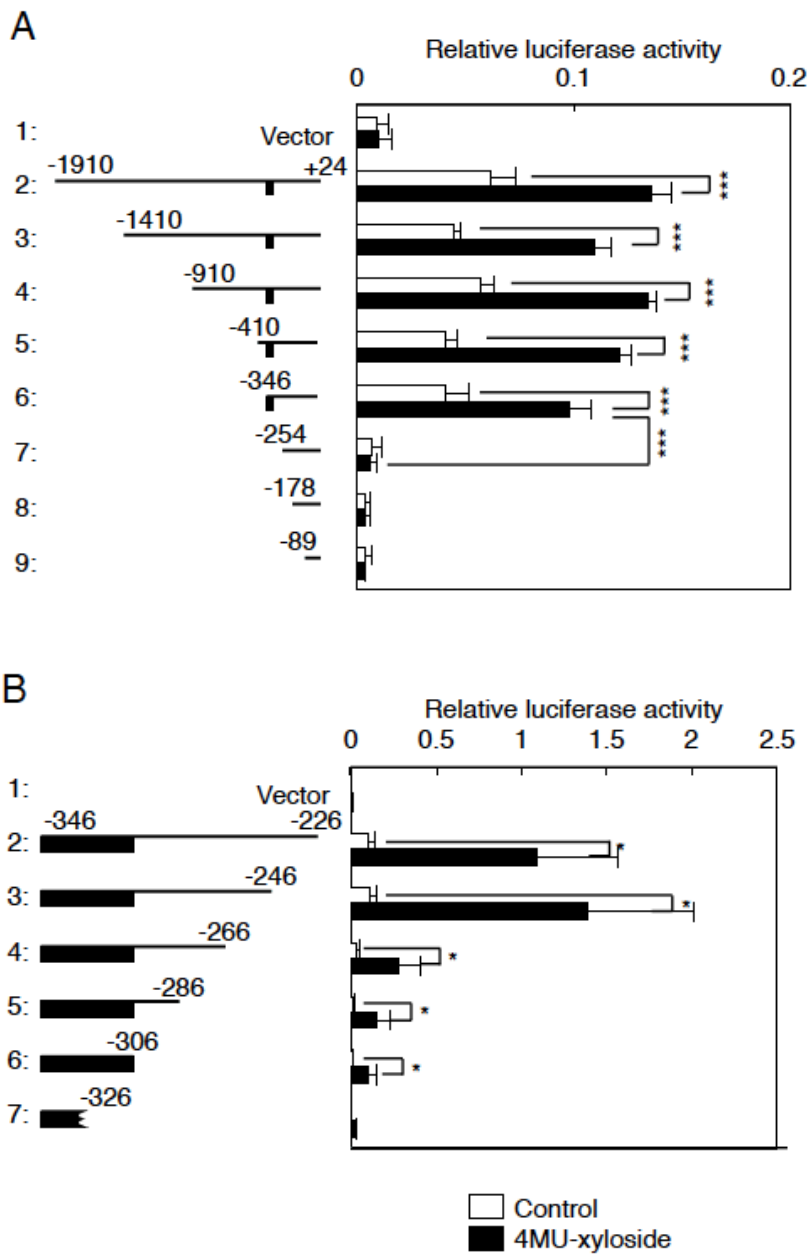


図 22 : HS6ST1 のプロモーター解析

図に示す長さの HS6ST1 プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の upstream に接続し、HeLa 細胞に導入した。転写開始点からの位置を図中に示す。xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(A) HS6ST1 のプロモーター全長(1934 nt)を上流から削った欠失変異体。

(B) HS6ST1 のプロモーター (上流側を-346 nt で固定) を下流側から削った変異体。

各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

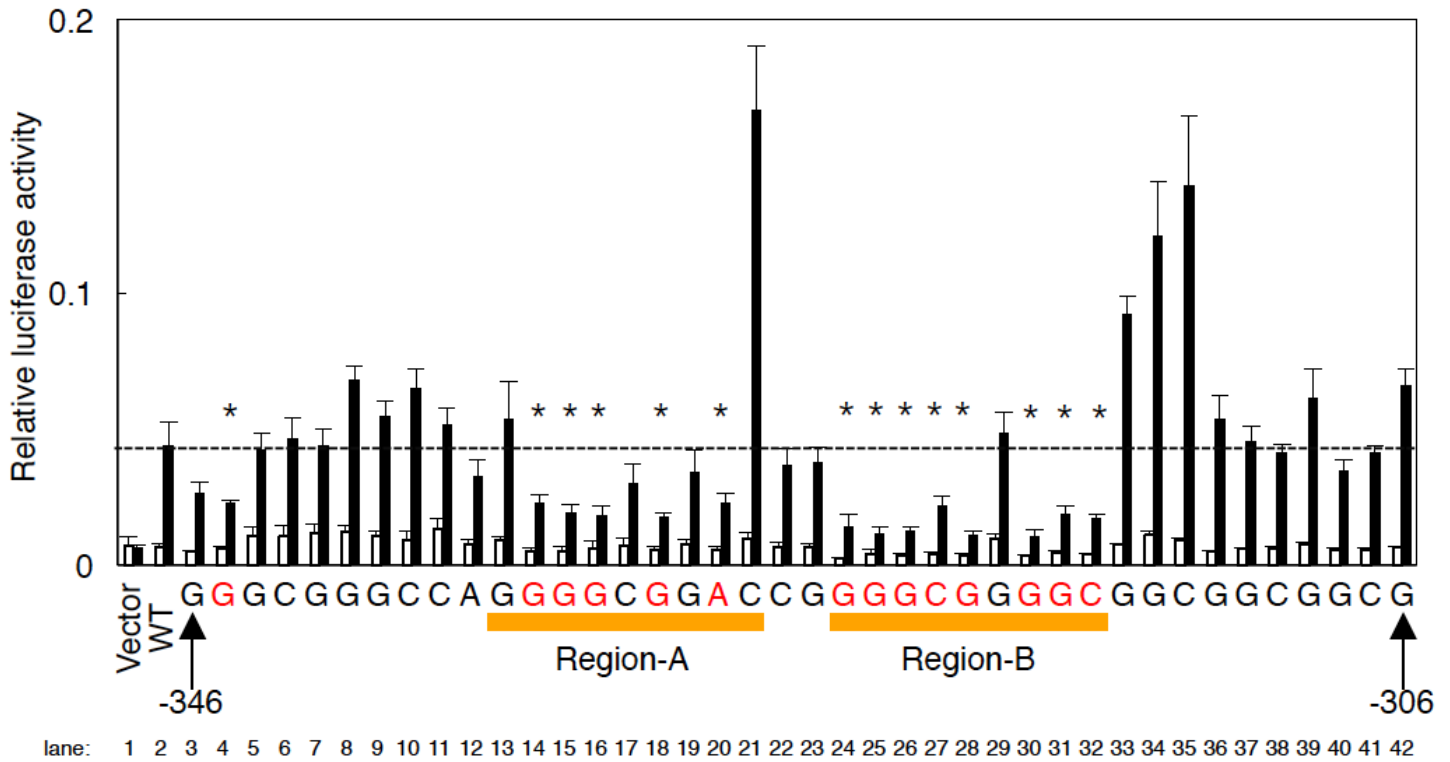


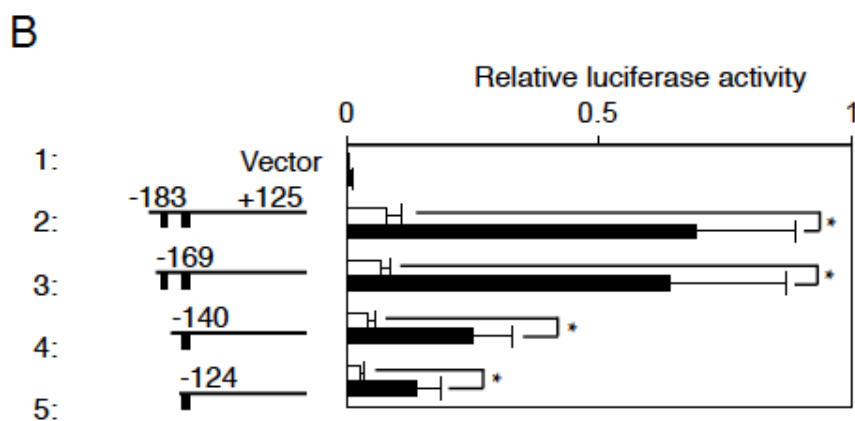
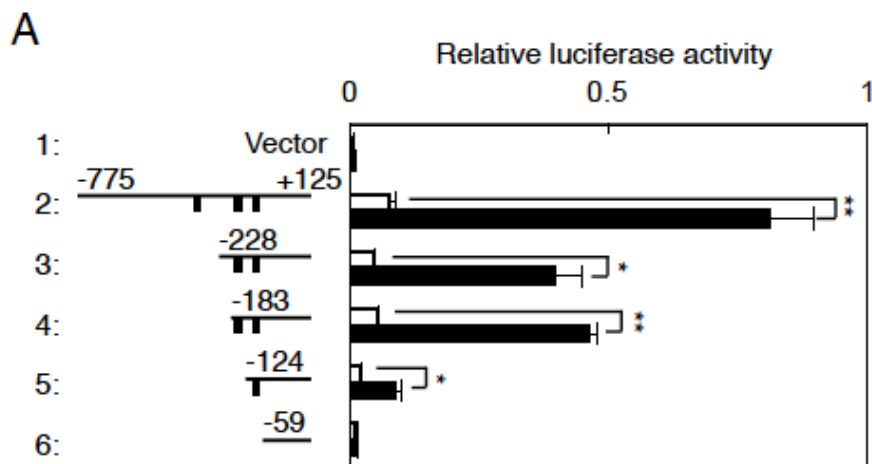
図 23 : HS6ST1 の点変異体でのプロモーター解析

図 11 lane6 で用いた欠失変異体に 1 塩基ずつ変異を入れた点変異体をルシフェラーゼ遺伝子上流に接続し、HeLa 細胞に導入した。xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。lane2 は wild type での活性、それ以降は転写開始点上流側から 1 塩基ずつ変異を入れた変異体での活性である。変異はそれぞれ A を C、T を G、G を T、C を A へと変えた。各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

ヒトNDST2遺伝子のプロモーター解析

ヒトNDST2のプロモーター解析に関しても、HS6ST1と同様のルシフェラーゼアッセイにより行った。NDST2遺伝子のプロモーター領域の欠失変異体を複数作製し、それらとルシフェラーゼ遺伝子を繋いだものをHeLa細胞に導入した。これらの細胞にxyloside処理によるゴルジ体ストレスを与えたときと、ストレスを与えていないときのルシフェラーゼの酵素活性を比較することで、NDST2の転写活性を制御する領域を探索した。転写開始点の上流-775ntから下流+125 ntまでのプロモーター配列を持つ欠失変異体では、xyloside処理によって強い転写誘導が見られた (図24-A lane2)。転写開始点の上流-228ntまで欠失させると、転写活性が大きく減少した (図24-A lane7)。さらに、-124、-159まで欠失させた変異体でもそれぞれ転写活性の低下が見られた。この結果から、転写開始点上流-183 nt~-124ntの間に少なくとも1つ以上の転写制御配列が存在すると考え、その間の領域を削った欠失変異体を作製した。転写開始点上流-183 nt~-124ntの間を削った欠失変異体では、転写開始点の上流-169ntまで欠失させた変異体では転写活性はほとんど低下しなかったが、-140まで欠失させると転写活性が低下し、-124で欠失させると転写活性がさらに低下した (図24-B)。このことから、転写制御配列が、転写開始点上流-169 nt~-140nt、-140-124の間に1つずつ存在することが示唆された。

次に、転写開始点上流-161nt~-119ntの欠失変異体 (図24-B lane6) のすべての塩基に対して点変異を導入しその影響をしらべることによって、この領域に存在する転写制御配列を明らかにすることにした。転写開始点上流-169 nt~-124 ntの欠失変異体の点変異体にルシフェラーゼ遺伝子をつないで細胞に導入してその転写活性を調べたところ、いくつかの点変異体 (図25 lane 16-18, 20-24, 28, 34-35, 25-29, 38, 41, 43) では野生型と比べ、有意に転写活性が低下した。その中でも連続して転写活性の低下が見られた2つの配列GCCCGCCC、GTCCCGCCTCCをRegion-C、Region-Dとした。この配列は、HS6ST1のプロモーター解析から得られたRegion-A、Region-Bと類似した配列である。



□ Control
 ■ 4MU-xyloside

図 24 : NDST2 のプロモーター解析

図に示す長さの NDST2 プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の upstream に接続し、HeLa 細胞に導入した。転写開始点からの位置を図中に示す。xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(A) NDST2 のプロモーターを上流から削った欠失変異体。

(B) NDST2 のプロモーターを上流側から -183 から -124 の間で削った変異体。

各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

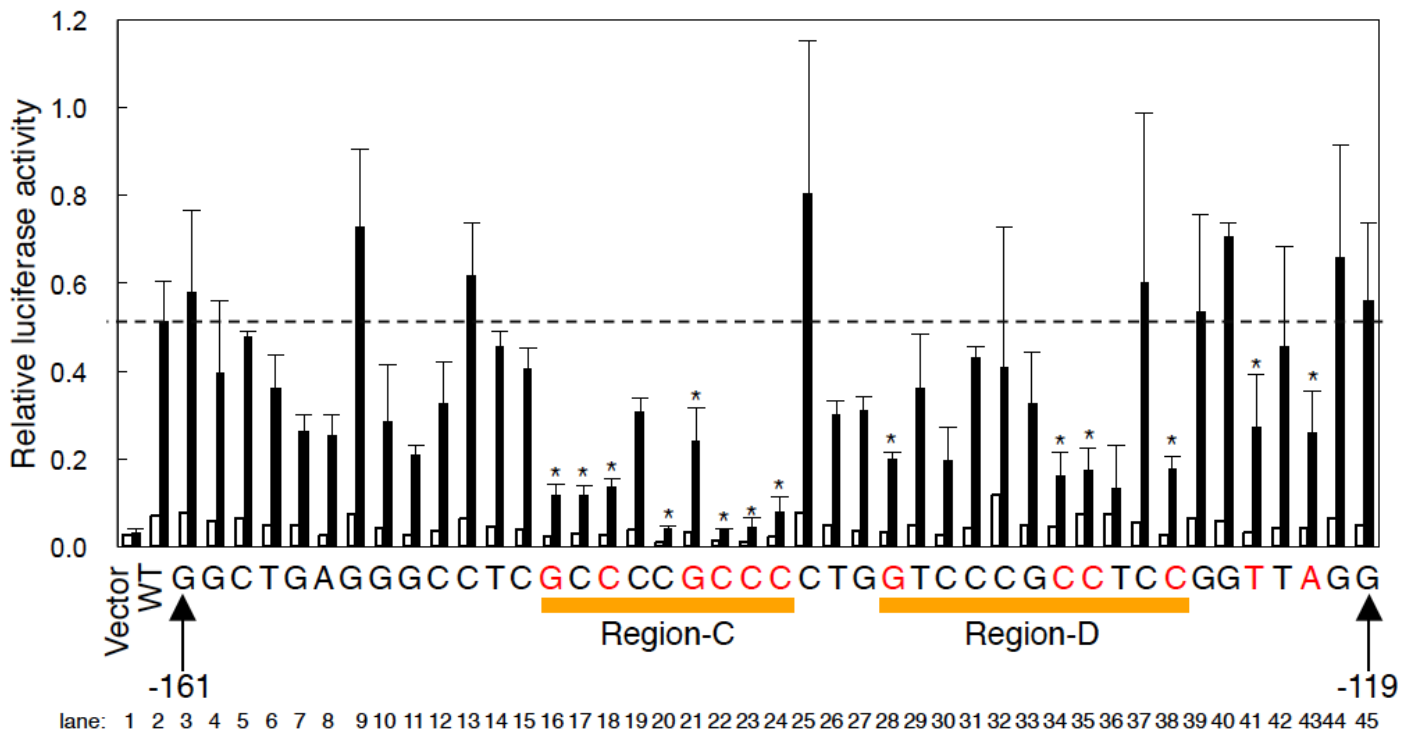


図 25： NDST2 の点変異体でのプロモーター解析

図 11 lane6 で用いた欠失変異体に 1 塩基ずつ変異を入れた点変異体をルシフェラーゼ遺伝子上流に接続し、HeLa 細胞に導入した。xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。lane2 は wild type での活性、それ以降は転写開始点上流側から 1 塩基ずつ変異を入れた変異体での活性である。変異はそれぞれ A を C、T を G、G を T、C を A へと変えた。各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

ヒトGLCE遺伝子のプロモーター解析

ヒトGLCEのプロモーター解析に関しても、HS6ST1と同様に行った。ヒトNDST2遺伝子のプロモーター領域の欠失変異体を複数作製し、それらとルシフェラーゼ遺伝子を繋いだものをHeLa細胞に導入した。これらの細胞にxyloside処理によるゴルジ体ストレスを与えたときと、ストレスを与えていないときのルシフェラーゼの酵素活性を比較することで、GLCEの転写活性を制御する領域を探索した。転写開始点上流-1135 ntから下流+160 ntまでのプロモーター配列を持つ欠失変異体では、xyloside処理によって強い転写誘導が見られた（図26-A lane2）。転写開始点上流-83 ntまでを欠失させても転写活性はほとんど低下しなかったが、-124ntまで欠失させると、転写活性が大きく減少した（図26-A lane7）。このことは、転写制御配列の上流側の端が、転写開始点上流-275 nt~-83 ntの領域に存在することを示している。また、転写開始点上流-83 ntから下流+160 ntまでの欠失変異体でも、転写活性は見られた。このことから、転写開始点上流-83 ntから下流+160 ntの領域にも転写制御配列が存在することが示唆された。さらに、転写開始点上流-235 nt~-135 nt、-115 nt~-15 ntの領域の欠失変異体を作製した。どちらの領域でも転写活性が確認され、特に-235 nt~-135 ntの領域では強い転写活性が見られた。次に転写開始点上流-235 nt~-135 ntの領域の欠失変異体を上流側から削った欠失変異体を作製した。これらの欠失変異体では、徐々に転写活性の低下が見られた。また、転写開始点上流-175 ntまで削った領域でも、転写活性が見られたため、転写開始点上流-175 nt~-135 ntの領域に少なくとも1つ以上の転写制御配列が存在することが示唆された。

次に、転写開始点上流-175nt~-135ntの欠失変異体（図26-B lane6）のすべての塩基に対して点変異を導入しその影響をしらべることによって、この領域に存在する転写制御配列を明らかにすることにした。転写開始点上流-175 nt~-135 ntの欠失変異体の点変異体にルシフェラーゼ遺伝子をつないで細胞に導入してその転写活性を調べたところ、いくつかの点変異体（図27 lane 3, 5-9, 11, 32,34, 36-42）では野生型と比べ、有意に転写活性が低下した。その中でも連続して転写活性の低下が見られた2つの配列 GCCCGCCC、GTCCGCCTCCをRegion-E、Region-Fとした。Region-Eは、HS6ST1、NDST2のプロモーター解析から得られた配列と類似した配列であった。Region-Fに関しては、他の配列とは異なった配列であった。

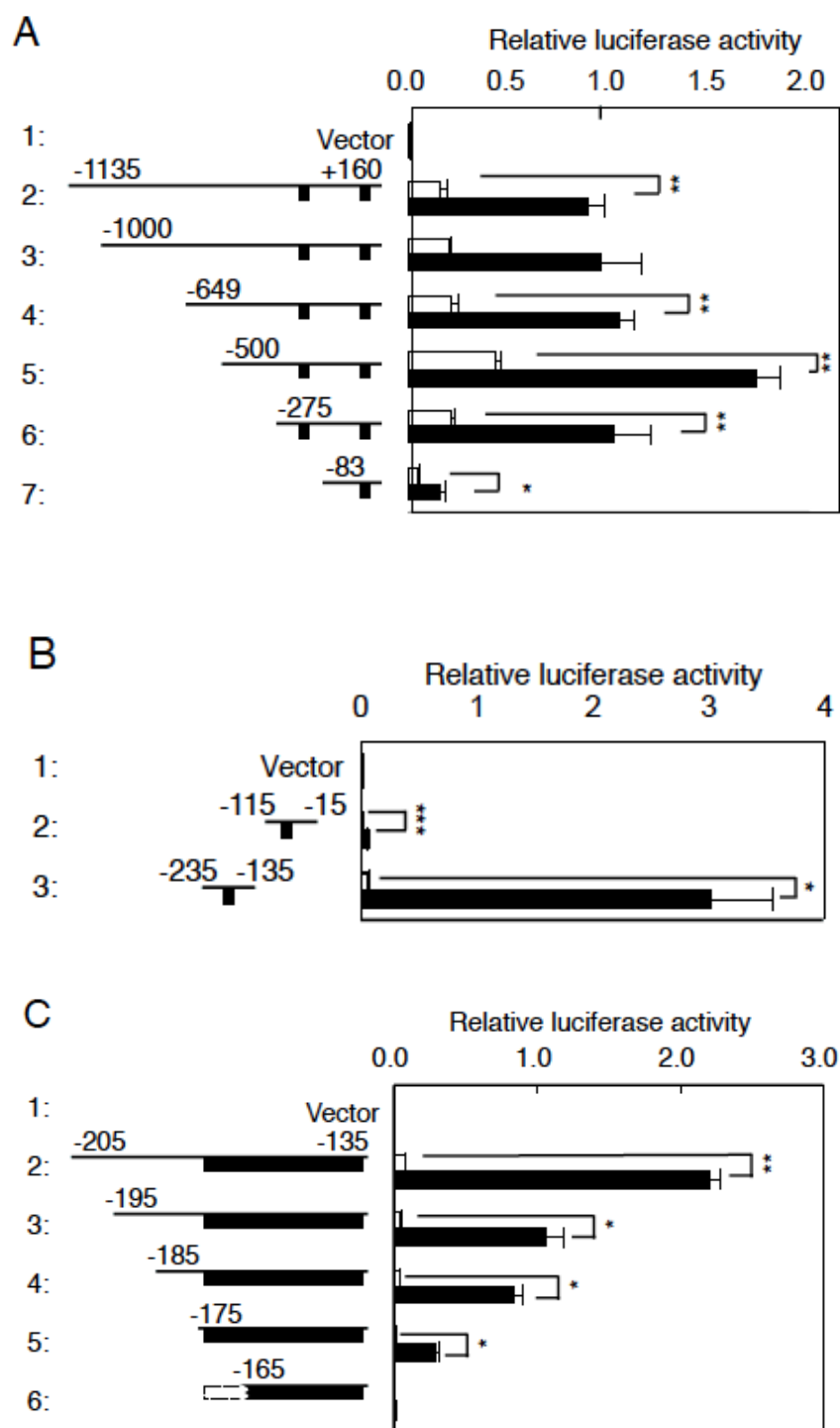


図 26 : GLCE のプロモーター解析

図に示す長さの GLCE プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の upstream に接続し、HeLa 細胞に導入した。転写開始点からの位置を図中に示す。xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05

P<0.01 *P<0.001

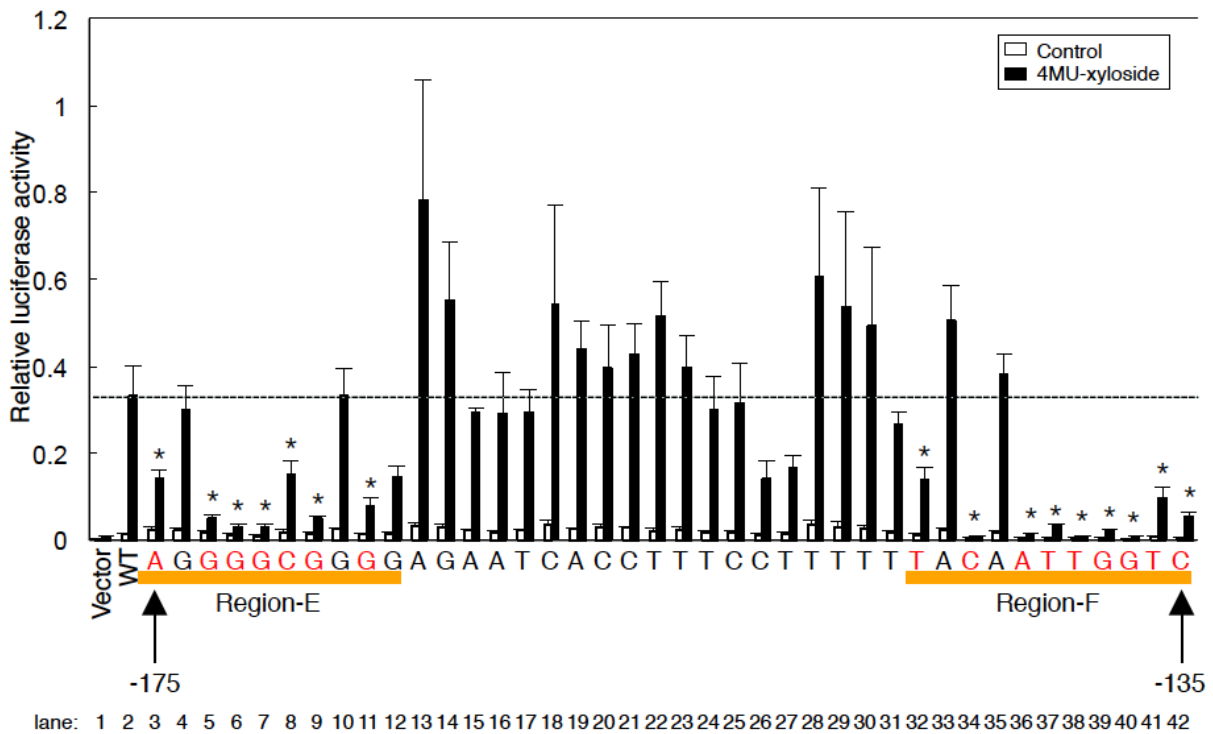


図 27 : GLCE の点変異体でのプロモーター解析

図 11 lane6 で用いた欠失変異体に 1 塩基ずつ変異を入れた点変異体をルシフェラーゼ遺伝子上流に接続し、HeLa 細胞に導入した。xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。lane2 は wild type での活性、それ以降は転写開始点上流側から 1 塩基ずつ変異を入れた変異体での活性である。変異はそれぞれ A を C、T を G、G を T、C を A へと変えた。各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写制御配列の同定

HS6ST1、NDST2、GLCE のプロモーター解析の結果から得られた Region-A~Region-F を並べた (図 28-A)。その結果、Region-A~RegionE に関しては、コンセンサスな配列が見られた。また、GLCE から得られた Region-F に関しては、他の Region とは異なる配列ではあったが、他の哺乳類の GLCE のプロモーター領域と比較したところ、他の哺乳類の DNA 上でも保存されていることがわかった (図 28-B)。

A

Human	HS6ST1	Region-A	CAGGGGCGGACCG
Human	HS6ST1	Region-B	CCGGGGCGGGGCG
Human	NDST2	Region-A	CAGGGGCGGGGCG
Human	NDST2	Region-B	CGGAGGCGGGACC
Human	GLCE	Region-A	AAGGGGCGGGGAG
Human	GLCE	Region-B	TTTACAATTGGTC
		Consensus	CAGGGGCGGGGCG

B

Human	TTTTACAATTGGTC
Chimpanzee	TTTTGCCATTGGCC
Orangutan	TTTTACAAGTGGTC
Lemur	TTTTGCAATTGGTC
Mouse	TTTTGCAATTGGTC
Rat	TCTTACAATTGGTC
Mole rat	TTTTACAAC TGGTC
Dog	TTTTACAATTGGTC
Consensus	TTTTACAATTGGTC

図 28 : プロモーター解析から得られた転写制御配列の比較

- (A) HS6ST1、NDST2、GLCE のプロモーター解析から得られた各配列の比較。
- (B) NDST2 のプロモーター解析から得られた Region-F と他の哺乳類の NDST2 のプロモーター領域の比較。

次に、これらの保存された配列を複数回繋いだ反復配列を作製し、それらのゴルジ体ストレス時の転写活性能を調べた。Region-A～Region-Eに関しては、HS6ST1のRegion-Aから得られた9塩基を複数繋いだ変異体と、13塩基を複数回繋いだ変異体を作製し、Xyloside処理によりゴルジ体ストレスを与えた際の転写活性能を調べた。その結果、9塩基を繋いだものでも反復の数が増えるにつれ転写活性能の上昇が見られたが、13塩基を繋いだものではさらに強い転写活性能の上昇が見られた(図29-A)。このことから、この13塩基がゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写制御を行う配列PGSE-Aであることが示唆された。また、GLCEから得られたRegion-Fに関しても、複数回繋いだものを作製し、Xyloside処理によりゴルジ体ストレスを与えた際の転写活性能を調べた。その結果、Region-Fを複数回繋いだものでもゴルジ体ストレス時に強い転写活性能の上昇が見られた(図29-B)。このことから、Region-Fがゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写制御を行う配列PGSE-Bであることが示唆された。また、この結果は、薬剤であるXyloside処理によるゴルジ体ストレス応答による転写活性を調べたものである。そこで、薬剤ではなくプロテオグリカンのコアタンパク質であるsyndecan2を細胞内で過剰発現することによってゴルジ体にストレスを与えた際も、PGSE-A、PGSE-Bが転写活性能を示すか調べた(図29-C,D)。その結果、PGSE-A、PGSE-BがSDC2を過剰発現した場合でも、Xyloside処理によるゴルジ体ストレスを与えた際と同様に、転写活性能を示すことがわかった。

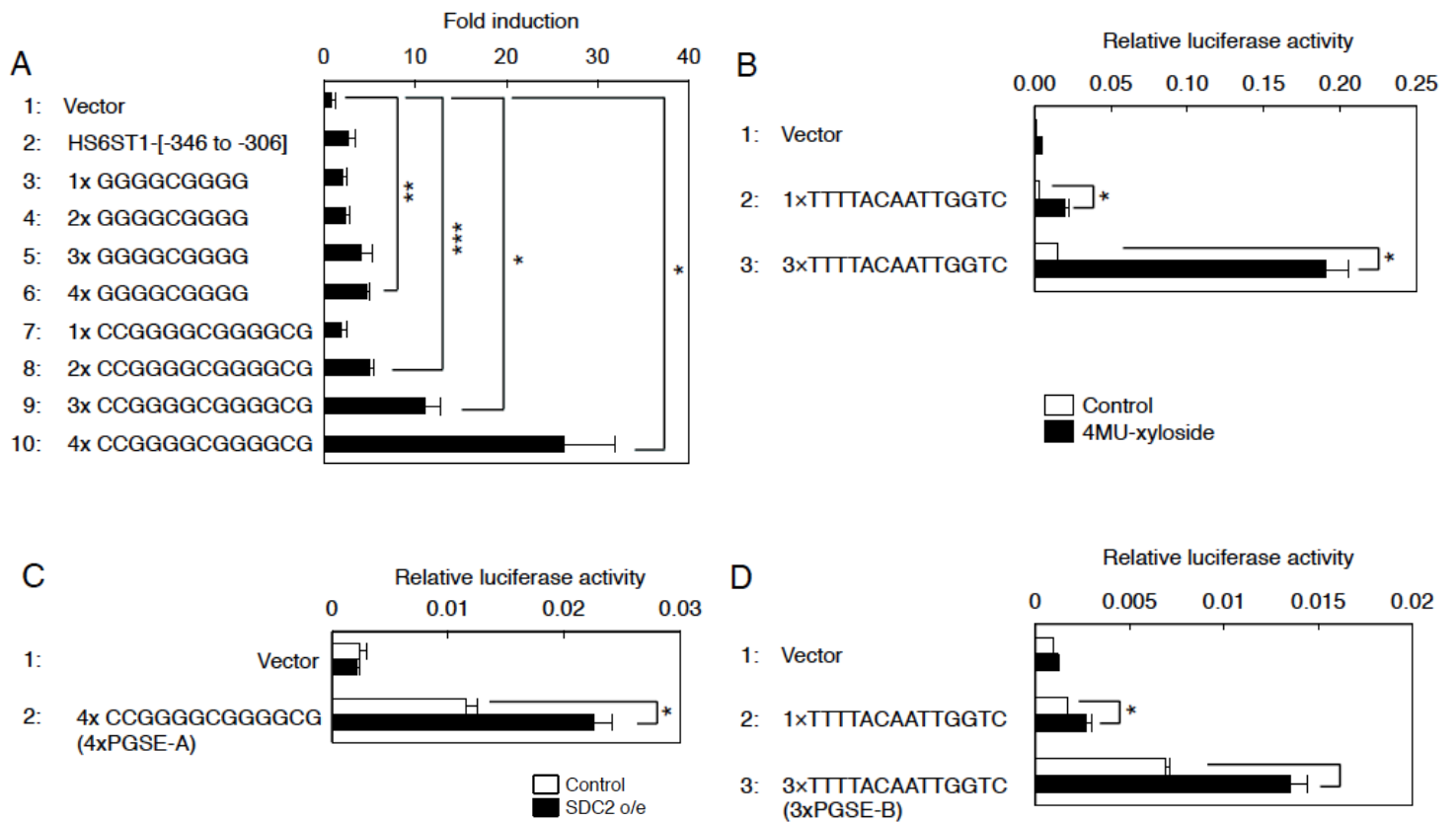


図 29： PGSE-A、PGSE-B の反復配列の転写活性能

xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(A) PGSE-A の 9 nt、13 nt の反復配列を HeLa 細胞に導入し、xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(B) PGSE-B の反復配列を HeLa 細胞に導入し、xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(C) PGSE-A の 13 nt の反復配列を HeLa 細胞に導入し、SDC2 を過剰発現し、18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(D) PGSE-B の反復配列を HeLa 細胞に導入し、SDC2 を過剰発現し、18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。

各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

次に、PGSE-A と PGSE-B がどれだけゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写活性に寄与しているかを調べるために、HS6ST1 と NDST2 のプロモーター領域の PGSE-A と PGSE-B を欠失させた変異体を作製し、ゴルジ体ストレス時の転写活性を調べた。HS6ST1 に関しては、転写開始点上流-346 nt~+24 nt の配列を用いて、PGSE-A を 1 つ変異させた変異体、2 つ変異させた変異体を作製し、ゴルジ体ストレス時の転写活性を調べた (図 30-A)。その結果、野生型に比べ、PGSE-A を 1 つ変異させた変異体では転写活性が減少し、2 つ変異させた変異体ではほとんど転写活性はなくなった。また GLCE では、転写開始点上流-235 nt~+160 nt の配列を用いて、3 つの PGSE-A を変異させた変異体と 1 つの PGSE-B を変異させた変異体、全ての PGSE を変異させた変異体を作製し、ゴルジ体ストレス時の転写活性を調べた (図 30-B)。その結果、野生型に比べ、3 つの PGSE-A を変異させた変異体では転写活性が減少し、1 つの PGSE-B を変異させた変異体でも転写活性が減少した。また、全ての PGSE を変異させた変異体では、その転写活性は大きく減少した。これらの結果から、PGSE-A、PGSE-B がともにゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写誘導を制御する主たるエンハンサー配列であることがわかった。

以上、図 22 から図 30 までの結果から、プロテオグリカン経路の転写制御配列として PGSE-A 及び PGSE-B を同定することができた。

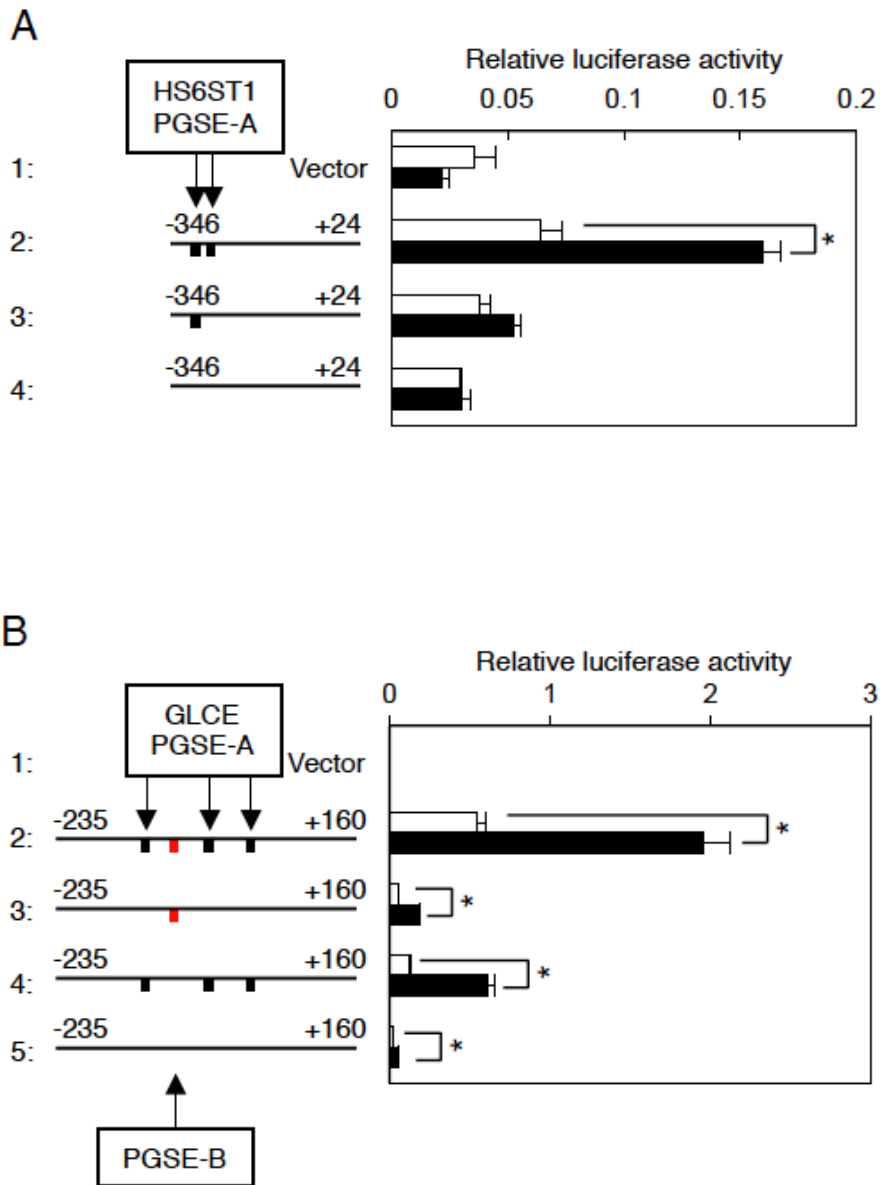


図 30 : PGSE-A、PGSE-B を変異させたプロモーターでの転写活性能

図に示す長さのプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に接続し、HeLa 細胞に導入した。転写開始点からの位置を図中に示す。xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。各々、3 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05

P<0.01 *P<0.001

(A) HS6ST1 の PGSE-A を変異させたプロモーター領域での転写活性能

(B) NDST2 の PGSE-A、PGSE-B を変異させたプロモーター領域での転写活性能

3. ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写因子の探索

データベースによる転写因子候補の探索

ここまでのプロモーター解析の結果から、PGSE-A と PGSE-B がゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写制御配列であることがわかった。そこで、PGSE-A を用いて、PGSE-A に結合して転写制御を行う転写因子を探索することにした。既知の転写因子の結合配列を集めたデータベース JASPER (jasper.genereg.net) を用いて、PGSE-A に結合する転写因子を検索したところ、KLF family タンパク質が PGSE-A に結合する転写因子である可能性が示唆された(表 2)。

(A)					(B)				
Matrix ID	Name	Score	Relative score	Predicted sequence	Matrix ID	Name	Score	Relative score	Predicted sequence
MA0599.1	KLF5	15.4658	1.0000000205	GCCCCGCCCC	MA0635.1	BARHL2	4.18991	0.844589456301	CCTAACCGGA
MA0599.1	KLF5	11.452	0.948938596926	GCCTCGCCCC	MA0475.1	FLI1	6.71358	0.843098299656	ACCGAGGCGG
MA0741.1	KLF16	14.2942	0.944612291893	GCCCCGCCCT	MA0760.1	ERF	8.30758	0.842950884457	ACCGAGGCG
MA0876.1	BSX	6.88359	0.910299998547	CCGGTTAG	MA0028.2	ELK1	5.89091	0.839568699708	ACCGAGGCG
MA0599.1	KLF5	7.98493	0.904832363248	GTCCCGCCTC	MA0764.1	ETV4	6.85578	0.839512686822	ACCGAGGCG
MA0162.2	EGR1	11.0205	0.898199948869	GTCCCGCCTCCGGT	MA0762.1	ETV2	7.72282	0.838396832512	AACCGAGGCG
MA0162.2	EGR1	10.0095	0.887373029846	GCCCCGCCCTGGT	MA0156.2	FEV	5.68269	0.83366644042	ACCGAGGCG
MA0765.1	ETV5	8.37424	0.885623935526	ACCGAGGCG	MA0740.1	KLF14	8.38933	0.83428066633	CGCCCCCCTGG
MA0098.3	ETS1	8.40878	0.874841527772	ACCGAGGCG	MA0763.1	ETV3	7.53296	0.828333287786	ACCGAGGCG
MA0024.2	E2F1	6.8186	0.870605648873	GAGCGGGACC	MA0028.1	ELK1	6.36918	0.823902902429	TAACCGAGG
MA0076.2	ELK4	7.81221	0.862378690537	CCGCCTCCGGT	MA0098.1	ETS1	3.83867	0.817405680008	CCTCCG
MA0471.1	E2F6	6.86806	0.862351594132	AGCGGGACCA	MA0470.1	E2F4	4.56024	0.817026784442	GGCGGGGCGA
MA0076.1	ELK4	9.5849	0.861891557793	ACCGAGGC	MA0759.1	ELK3	6.09444	0.816356062321	ACCGAGGCG
MA0741.1	KLF16	8.80435	0.85486841073	GTCCCGCCTCC	MA0645.1	ETV6	5.15906	0.816332136474	ACCGAGGCG
MA0875.1	BARX1	4.58917	0.854830092217	CCGGTTAG	MA0820.1	FIGLA	5.01658	0.816101413466	CGCCCTGGT
MA0475.2	FLI1	5.91113	0.854711176319	ACCGAGGCG	MA0740.1	KLF14	6.73547	0.811860251192	GGCCTCGCCCCGCC
MA0761.1	ETV1	7.52222	0.854074376582	ACCGAGGCG	MA0154.2	EBF1	-0.098268	0.806664168472	CGCCCTGGTC
MA0062.1	GABPA	9.14658	0.849973340811	ACCGAGGCG	MA0136.2	ELF5	4.91536	0.805486458371	AACCGAGGCG
MA0474.2	ERG	6.5427	0.849812116945	ACCGAGGCG	MA0162.2	EGR1	2.34491	0.805292074149	CCCTTGGTCCGCC
MA0470.1	E2F4	6.33696	0.845162880308	AGCGGGACCA	MA0824.1	ID4	4.15739	0.804830529668	CGCCCTGGT

(C)

Matrix ID	Name	Score	Relative score	Predicted sequence
MA0079.3	SP1	16.3406	0.986723524873	GCCCCGCCCT
MA0079.3	SP1	13.9917	0.957172347662	GTCCCGCTCC
MA0003.1	TFAP2A	8.73515	0.945939101245	GCCCTCAGC
MA0746.1	SP3	12.9263	0.943033417086	GCCCCGCCCT
MA0516.1	SP2	16.0667	0.942074072229	GCCCCGCCCTGGTC
MA0079.2	SP1	12.0232	0.934090691987	CCCCGCCCT
MA0516.1	SP2	14.3907	0.919329241319	GTCCCGCTCCGGTT
MA0003.1	TFAP2A	7.25872	0.897759949527	GCCTCCGGT
MA1122.1	TFDP1	10.4044	0.894964526234	AGCGGGACCA
MA0057.1	MZF1(var.2)	8.51931	0.890569555804	GGAGGCGGA
MA0079.1	SP1	8.59829	0.886785037923	GGGGGGGGC
MA0079.2	SP1	9.94725	0.881809776071	TCCCGCTCC
MA0003.1	TFAP2A	6.76813	0.881751041522	GCCCTGGT
MA0014.3	PAX5	10.0594	0.871719046465	AGCGGGACCAG
MA0814.1	TFAP2C(var.2)	7.70659	0.871470036792	AACCGAGGCG
MA0003.3	TFAP2A	7.21533	0.868223165704	AACCGAGGCG
MA0685.1	SP4	11.0802	0.861718255345	CTGCCCGCCCTGGT
MA0746.1	SP3	8.69818	0.859766065237	GTCCCGCTCC
MA0686.1	SPDEF	7.9207	0.858527715569	AACCGAGGCG
MA0079.3	SP1	6.12509	0.858201291238	GCCTGCCCGG

(D)

Matrix ID	Name	Score	Relative score	Predicted sequence
MA0830.1	TCF4	4.54273	0.856905570567	CGCCCTGTGT
MA0812.1	TFAP2B(var.2)	6.97789	0.855966293603	AACCGAGGCG
MA0003.3	TFAP2A	6.37764	0.855054788681	GCCTCCGGTT
MA0516.1	SP2	9.64627	0.854944129475	GCCTGCCCGCCC
MA0003.1	TFAP2A	5.92738	0.854315735109	GCCCGCCC
MA0814.1	TFAP2C(var.2)	6.48558	0.851887509981	GCCTCCGGTT
MA0746.1	SP3	8.15714	0.849111222715	GCCTGCCCGG
MA0812.1	TFAP2B(var.2)	6.40487	0.847279052458	GCCTCCGGTT
MA0747.1	SP8	8.99419	0.845960929646	GCCTGCCCGC
MA0747.1	SP8	8.89221	0.844065682338	GCCCGCCCTG
MA0522.2	TCF3	4.27749	0.841399734847	CGCCCTGTGT
MA0003.1	TFAP2A	5.3366	0.835037084781	GCCTGCC
MA0801.1	MGA	4.92634	0.831780774973	AGCGGGGA
MA0597.1	THAP1	5.25762	0.828542580046	AGGCCTCA
MA0719.1	RHOXF1	1.17042	0.82684424066	CTGGTCCC
MA1122.1	TFDP1	7.21219	0.825747805823	GGCGGGGCGA
MA0807.1	TBX5	6.09953	0.825431760312	AGCGGGGA
MA0014.3	PAX5	7.77512	0.823713829886	GGGAGGCGCT
MA0003.3	TFAP2A	4.03271	0.818192585907	GCCCTCAGCC
MA0810.1	TFAP2A(var.2)	4.16757	0.817644127644	TAACCGAGGCG

(E)

Matrix ID	Name	Score	Relative score	Predicted sequence
MA0079.2	SP1	7.39882	0.8176293959	CCTGCCCGG
MA0803.1	TBX15	4.66537	0.814527021719	AGCGGGGA
MA0806.1	TBX4	4.40763	0.813590640174	AGCGGGGA
MA0811.1	TFAP2B	4.55959	0.81266493225	TAACCGAGGCG
MA0597.1	THAP1	4.69906	0.811447944648	CCGCCCTG
MA0597.1	THAP1	4.54555	0.806749592716	TCGCCCGC
MA0511.2	RUNX2	4.27582	0.8036845405	TAACCGAG
MA0684.1	RUNX3	4.60661	0.803015371898	TAACCGAGG
MA0524.2	TFAP2C	4.17996	0.802101554687	TAACCGAGGCG
MA0524.1	TFAP2C	2.96942	0.801607792626	CCTAACCGAGGCGG
MA0057.1	MZF1(var.2)	5.67132	0.800480303603	GGCGGGGCGA

(F)

Matrix ID	Name	Score	Relative score	Predicted sequence
MA0750.2	ZBTB7A	9.37747	0.849680204846	AACCGAGGCGGG
MA0103.2	ZEB1	5.24055	0.834379794042	CCGCCCTG
MA0753.1	ZNF740	7.51686	0.830080544084	GCCCGCCC
MA0753.1	ZNF740	6.83169	0.817450224048	CCCCGCCCT
MA0724.1	VENTX	2.662	0.810306925504	TCCGGTTAG
MA0528.1	ZNF263	5.95255	0.803613167353	GGAGCGGGACCAGGGCGGG

表 2 : Jasper で解析された転写因子の候補

jasper(jasper.genedeg.net)によって、転写調節領域である PGSE-A を含む *NDST2*(-169 ~ -119)の塩基配列を用いて転写因子の探索を行った。

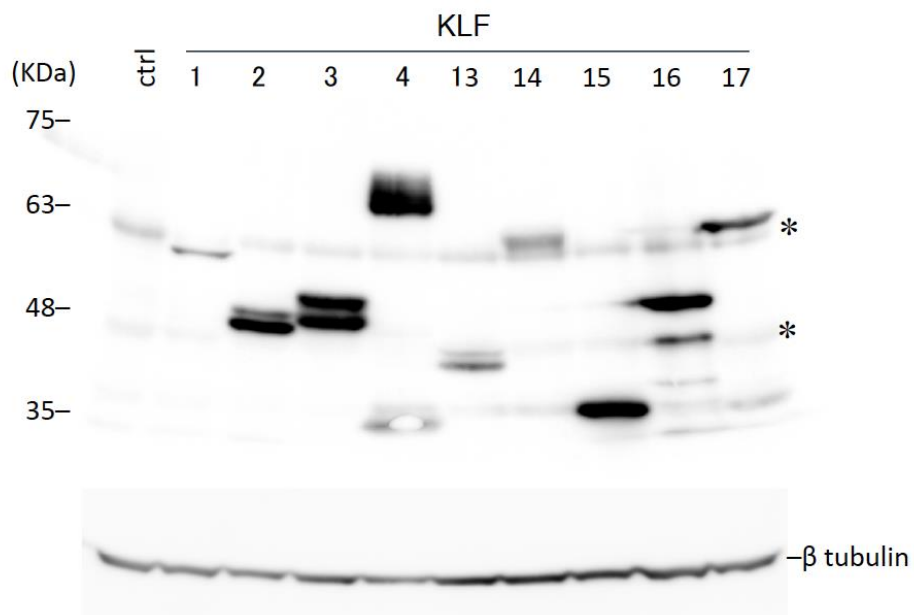
KLF family タンパク質の過剰発現による PGSE-A の転写活性能

次に、KLF family タンパク質を過剰発現したときに PGSE-A からの転写が誘導されるかどうかを調べた。各 KLF family 遺伝子の N 末端に myc を付加し、これを過剰発現用のプラスミドに挿入した。これを HeLa 細胞に導入し、まず、各 KLF が過剰発現しているかどうかウエスタンブロッティングを用いて調べた(図 31)。その結果、KLF1-5/7/9/13-17 で過剰発現を確認することができた。次に、PGSE-A を用いたプロモーターアッセイを行った。この結果、KLF2/4/8/14 を過剰発現したときに PGSE-A からの転写が誘導されることがわかった。このことは、これらのタンパク質が PGSE-A に結合して転写活性を行う転写因子であることを示唆している(図 32A/B)。

KLF family 遺伝子の mRNA 量の解析

次に、KLF family タンパク質について、ゴルジ体ストレス時の mRNA の転写量を調べた。xyloside 処理によりゴルジ体ストレスを与えた細胞を用い、RNA-sequencing を行ったところ、KLF2 および KLF-4、KLF6、KLF7 で mRNA の転写量の上昇が見られた(図 33)。そこで、RNA-sequencing で mRNA の転写量が増加し、さらに、過剰発現の際に PGSE-A の転写活性を誘導した KLF2 と KLF4 について、qRT-PCR によりゴルジ体ストレス時の mRNA の発現量を確認した(図 34)。その結果、KLF2、KLF4 のどちらでも、mRNA の転写量が増加していることがわかった。

A



B

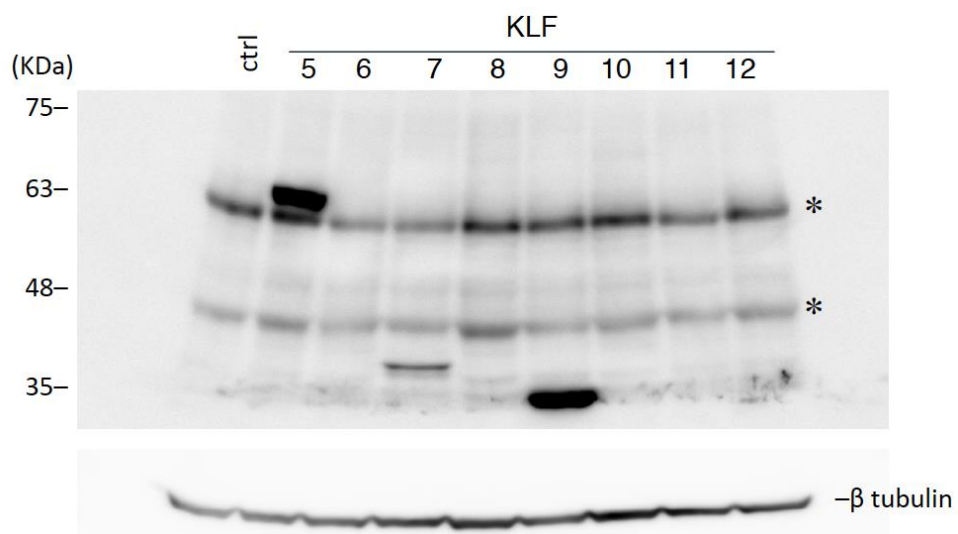


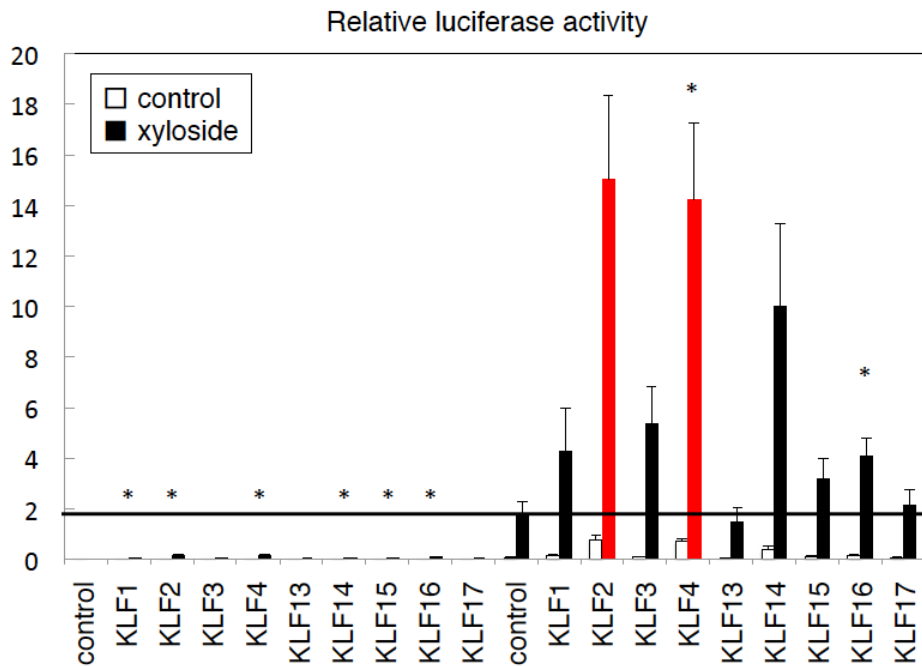
図 31 : KLF 過剰発現時の KLF タンパク質の発現量

HeLa 細胞に各 KLF のプラスミドを導入して過剰発現させた後、ウエスタンブロッティングを行って抗 myc 抗体で検出した。アスタリスクは非特異的なバンドを示している。

(A)KLF1-4/13-17 の過剰発現

(B)KLF5-12 の過剰発現

A



B

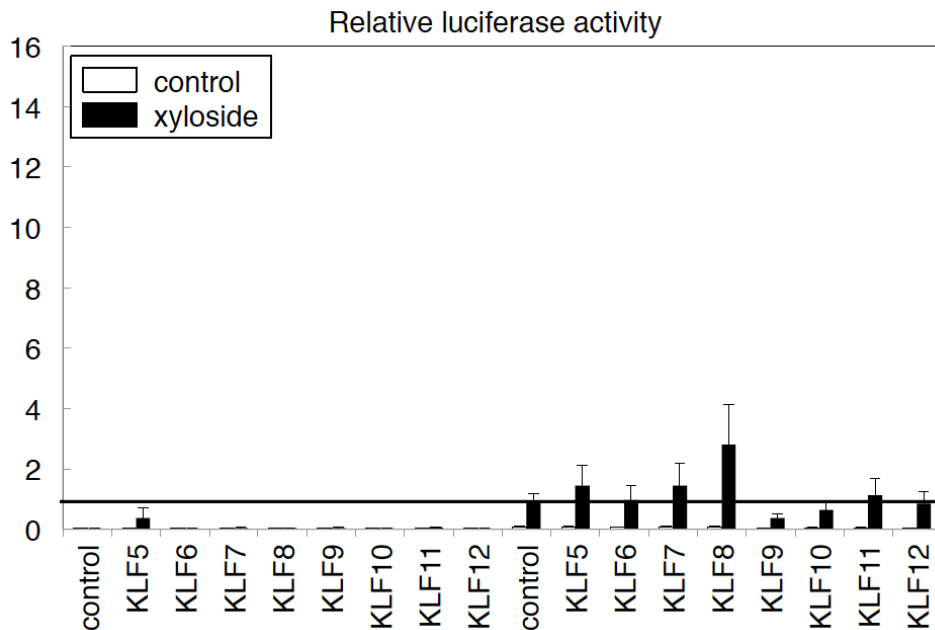


図 32 : KLF family タンパク質を過剰発現したときの PGSE-A の転写活性能

図 23 で使用した *NDST2* プロモーターの欠失変異体と各 KLF 遺伝子を持つプラスミドを HeLa 細胞に導入した。Xyloside 7.5 mM で 18 時間処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。各々、3 回の独立した実験の平均値である。 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

(A) KLF1-4/13-17 の過剰発現

(B) KLF5-12 の過剰発現

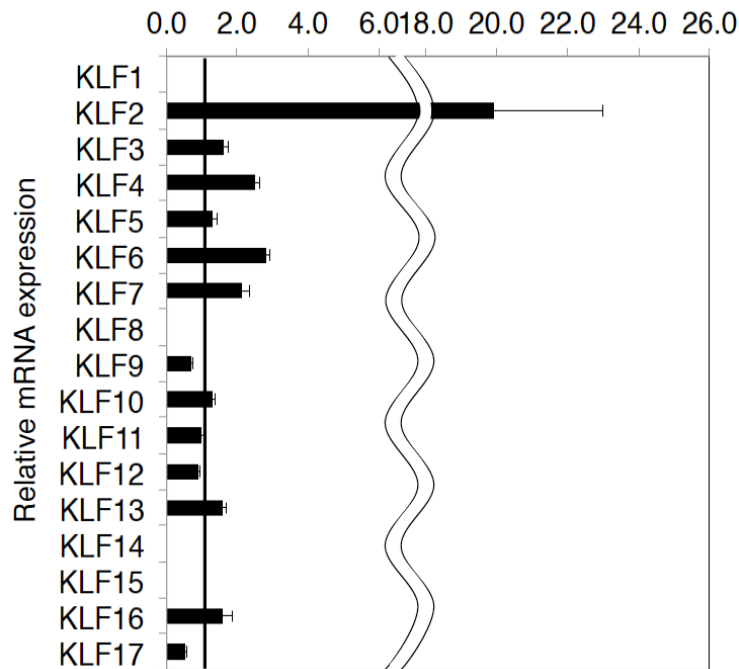


図 33 : HeLa 細胞にゴルジ体ストレスを与えた際の各 KLF family mRNA の転写量

HeLa 細胞に 7.5mM xyloside を 16 時間処理した後、RNA-sequencing を用いて mRNA の転写量を解析した。

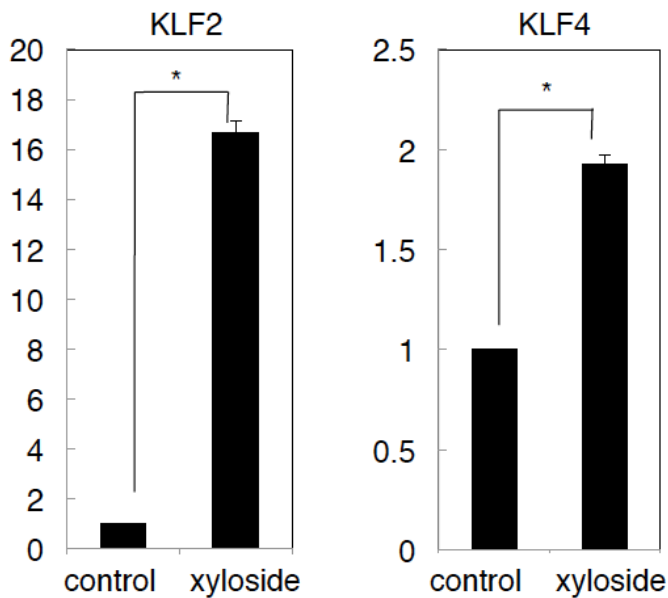
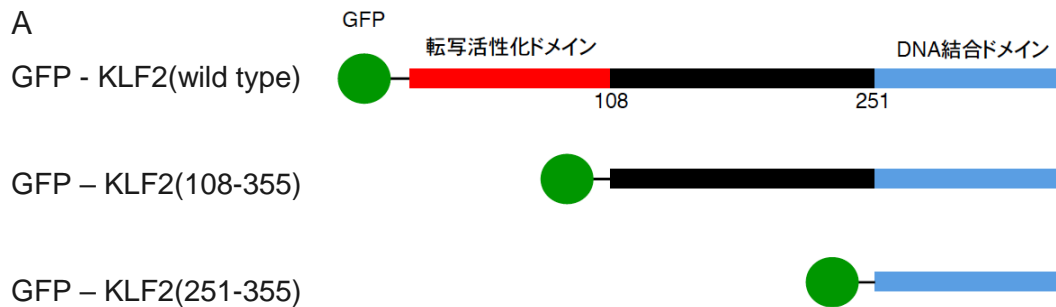


図 34 : HeLa 細胞に xyloside を添加した時の各 KLF family mRNA の転写量

HeLa 細胞を 7.5 mM の xyloside で処理し、qRT-PCR による mRNA の定量を行った。各々、2 回の独立した実験の平均値である。*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

変異体による KLF2 の活性抑制

転写因子の候補として得られた KLF2 について、そのドミナントネガティブ変異体を作製し過剰発現することで、ゴルジ体ストレスへの影響について調べた。まず、GFP に KLF2 の野生型あるいは 108-355 番目のアミノ酸（転写活性ドメイン欠失体）、251-355 番目のアミノ酸（DNA 結合ドメイン）を繋いだものを作製した(図 35A)。そして、HeLa 細胞にこのプラスミドを導入し、xyloside によるゴルジ体ストレスを与えたときの、PGSE-A からの転写の誘導を調べた。その結果、KLF2 の変異体を導入していない細胞(図 35B. lane4) と比べて、108-355 番目のアミノ酸を過剰発現させた細胞(図 35B. lane5) 251-355 番目のアミノ酸を過剰発現させた細胞(図 35B. lane6) では、PGSE-A の転写活性が抑制された。この結果は、KLF2 の転写活性化ドメインを欠失させた変異体が内在性の KLF2 に対して競合的に PGSE-A に結合することで、KLF2 による PGSE-A の転写活性を抑制したことが示唆される。このことから、KLF2 はゴルジ体ストレス時に PGSE-A に結合して、プロテオグリカン経路の活性を制御する転写因子であることが示唆された。



B

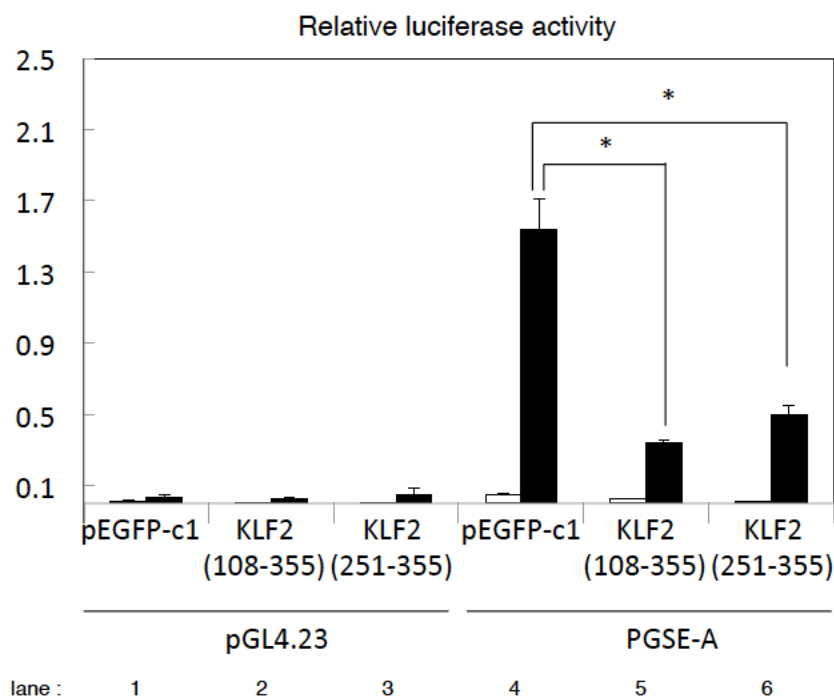


図 35：ドミナントネガティブ変異体によるゴルジ体ストレスへの影響

HeLa 細胞に KLF2 変異体を導入し、ゴルジ体ストレス時の PGSE-A からの転写誘導を調べた。7.5 mM の xyloside で処理し、ルシフェラーゼアッセイによる転写活性の測定を行った。各々、3 回の独立した実験の平均値である。 $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$

(A) 導入した KLF2 変異体

(B) ルシフェラーゼアッセイの結果

考察

プロテオグリカン経路の標的遺伝子について

今回のマイクロアレイ解析の結果からは、プロテオグリカン経路の標的遺伝子として、プロテオグリカンに関わる糖鎖修飾遺伝子の中で CSGALNACT2, NDST2, GLCE, HS3ST1, HS6ST1 などの遺伝子が同定された。しかし、それ以外の多くのプロテオグリカンに関わる糖鎖修飾遺伝子の転写誘導は見られなかった。これは、(1) これら以外の遺伝子の発現が低く、今回のマイクロアレイや RNA-sequence では検出できなかった可能性や、(2) プロテオグリカンに関わる糖鎖修飾遺伝子の中でも遺伝子ごとに異なるプロテオグリカン経路による制御を受けている可能性がある。例えば、蓄積するコアタンパク質の種類によって活性化する経路が異なる可能性も考えられる。(1) の場合は、解析方法を変えるなどの必要がある。また、細胞の種類や組織によって、発現している遺伝子が異なることもあるので、実験に用いる細胞を変えるなどして調べることで、他の標的遺伝子を同定できる可能性もある。また、今回の研究で得られた PGSE-A、PGSE-B の配列を用いて、標的遺伝子の候補を推定することもできる。(2) の場合は、xyloside 処理による実験では、今回活性化した経路しか活性化できないので、別の薬剤や方法を用いて細胞にストレスを与える条件を考える必要がある。

PGSE-A と PGSE-B

HS6ST1 及び NDST2、GLCE のプロモーター解析の結果から、プロテオグリカン経路の転写制御配列 PGSE-A と PGSE-B を同定した。PGSE-A については、HS6ST1、NDST2、GLCE で共通であり、B3GAT3 や CSGALNACT2 などの他の標的遺伝子にも同様の配列が存在する。このことから、PGSE-A はプロテオグリカン経路の活性制御において、多くの関連遺伝子の転写を制御する重要な配列であることが示唆された。PGSE-B については、HS6ST1 や NDST2 には存在しておらず、現在のところ他の標的遺伝子でも存在の確認ができていない。しかし、GLCE から得られた PGSE-B を複数回繋げた配列を用いて、ゴルジ体ストレス時のプロモーター活性を測定すると、転写活性の大きな上昇が見られる。また、他種の哺乳類の GLCE のプロモーター領域にも PGSE-B が保存されていることから、PGSE-B がプロテオグリカン経路にとって重要な役割を果たしている可能性は高いと思われる。PGSE-B のプロテオグリカン経路における役割を証明するためには、PGSE-B に結合する転写因子を同定し、その転写因子を用いてさらなる解析を進める必要があると考えている。

プロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF family

データベースを用いた検索により、PGSE-A に結合する転写因子の候補として KLF family が挙げられた。KLF family は、ショウジョウバエの形態形成遺伝子 Kruppel と相同性をもつ転写因子のファミリータンパク質である(44)。KLF family は 17 の遺伝子群で構成されており、細胞分化、がん、生活習慣病などさまざまな生理現象に関与していることが報告されている(45-49)。今回の研究では、HeLa 細胞の中で十分に発現しており、ゴルジ体ストレスにより mRNA の転写量が増加し、さらに過剰発現により PGSE-A の転写活性を上昇させた KLF2 と KLF4 に焦点を当てて研究を進めた。KLF2 については、変異体の過剰発現を用いた実験で、野生型の転写活性を抑制することがわかった。KLF2 が単量体で PGSE-A に結合するのか、二量体を形成して結合するのかなどはわかってはいないが、活性部位を欠失した変異体で PGSE-A のゴルジ体ストレスに対する転写活性が抑制されることから、KLF2 がプロテオグリカン経路を制御する転写因子の 1 つであると考えられる。また、KLF4 についても同様の実験を行い、プロテオグリカン経路を制御する転写因子であるかを調べる計画である。また、KLF2 と KLF4 は、自身のプロモーター領域に PGSE-A を持っているため、ゴルジ体ストレス時に転写が誘導され、ポジティブフィードバックによる制御を受けていると考えられる。このことも、KLF2、KLF4 がプロテオグリカン経路の転写因子であることを裏付けている。

また、KLF2、KLF4 以外にも、プロテオグリカン経路の転写を制御している可能性がある。KLF family は組織によって発現している遺伝子が異なっているため、それぞれの組織によってプロテオグリカン経路の転写因子として働く遺伝子が異なっている可能性がある。その場合、それぞれの KLF が結合する制御配列も少しずつ異なっており、そのことにより組織特異的な遺伝子の転写制御が行われているのかもしれない。また、KLF family の中には、転写を抑制的に制御する遺伝子も存在しており(47)、ゴルジ体ストレスが起きていないときや、ゴルジ体ストレスの収束時に、それらの抑制的に働く KLF が関わっている可能性も考えられる。

ゴルジ体ストレスの感知機構

本研究では、xyloside という薬剤を用いてプロテオグリカンへの糖鎖修飾不全を引き起こすことで、ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路を活性化した。それでは、細胞はどのようにしてプロテオグリカンの糖鎖修飾不全を感知しているのだろうか。ゴルジ体ストレス応答でのストレス感知機構についてはほとんどのことがわかっていないので、研究が進んでいる小胞体ストレス応答を例に考えてみる。

小胞体ストレス応答では、小胞体内に変性タンパク質が蓄積してストレス状態となったときに (a) シャペロンの一種である BiP がセンサー分子から離れて活性化する場合と (21)、(b) センサー分子に変性タンパク質が直接結合する場合 (22) が報告されている。(a) と同様の機構でプロテオグリカン経路が活性化している場合、ゴルジ体内に存在するセンサー分子が、普段は糖鎖修飾酵素などが結合し不活性化されているが、ゴルジ体内に糖鎖修飾不全のタンパク質が蓄積したとき、糖鎖修飾酵素が糖鎖修飾不全のタンパク質に奪われ、センサー分子が活性化すると考えられる。(b) と同様の機構によりストレスを感知する場合、ゴルジ体内のセンサー分子に蓄積した糖鎖修飾不全のタンパク質が直接結合し、それがスイッチとなりセンサー分子を活性化していることが考えられる。

また、これらはゴルジ体内に糖鎖修飾不全のタンパク質が蓄積する場合に考えられる機構である。文献では、xyloside 処理によりゴルジ体内に糖鎖修飾不全のプロテオグリカンが蓄積することが報告されているが、本研究では、実際にゴルジ体にプロテオグリカンが蓄積することを確認する実験を行っていない。プロテオグリカンのコアタンパク質にはいくつもの種類があり、結合する糖鎖の数も様々である。多くの異なったプロテオグリカンにおいて、どのように糖鎖修飾不全を感知してゴルジ体に繫留しているのか、もしくは本当にゴルジ体内に糖鎖修飾不全のタンパク質が蓄積しているのか、ゴルジ体ストレスの感知機構を明らかにするためには、これらの解析する必要があると考えている。

プロテオグリカン経路と細胞の分化

グリア細胞は神経系を構築する神経細胞以外の細胞である。その中でも、アストロサイトは中枢神経系に特異的な細胞である。また、アストロサイトはプロテオグリカンの産生が盛んな細胞であることも知られている。これまでの我々の研究室の研究で、C6細胞がアストロサイトへと分化する際にプロテオグリカン経路が活性化することがわかっている。また、これまでに他の研究室から KLF family がさまざまな細胞の分化に関与していることが報告されている (51-54)。このことから、様々な細胞の分化において、プロテオグリカン経路が役割を持っている可能性が考えられる。また、C6細胞がアストロサイトへと分化する際にプロテオグリカン経路だけでなく TFE3 経路も活性化することがわかっている。また、別の経路ではあるが、最近の報告で、TFE3 が胚性幹細胞の分化を制御しているという報告があった(55)。以上のことから、ゴルジ体ストレス応答が細胞の分化において重要な役割を担っていることが考えられる。

プロテオグリカン経路の生理的意義

プロテオグリカンは、基本四糖構造の後に、二糖構造が 50~100 回繰り返し結合した構造をしている。プロテオグリカンのヘパラン硫酸は、多くの細胞で細胞膜及び細胞外マトリックスの両方に存在している。細胞外マトリックス中では他の分子と相互作用することで、細胞間のシグナル伝達や細胞接着、形態形成、機能維持の制御などで重要な役割を担っていることがわかっている(56,57,58,59)。また、プロテオグリカンに結合した糖鎖は、硫酸化酵素によって硫酸化される。しかし、この硫酸化は糖鎖全体で均一に行われるわけではない。この硫酸基のパターンが、シグナル分子との結合に関わっている報告もされている(60,61)。

プロテオグリカンの産生は軟骨細胞やアストロサイトにおいて活発であることが知られている。軟骨細胞では、プロテオグリカンはその糖鎖に性質により、保水性や粘弾性を保持する役割を担っている。また、アストロサイトでは脊髄損傷時に、損傷部位周辺において反応性アストロサイトという状態となり、大量のプロテオグリカンを産生することで神経軸索の損傷部位への侵入を防いでいる(62,63)。

このようにプロテオグリカンは、生体内の様々な生理現象に関わっており、その糖鎖修飾酵素の転写を制御するプロテオグリカン経路は、生体内で非常に重要な役割を担っていると考えられる。

実験手法

細胞の培養と薬剤処理

細胞は HeLa 細胞を用い、Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5 g/L グルコース) に 10 %FBS、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンをそれぞれの終濃度で添加し、37 °C、5 %CO₂ で培養した。ゴルジ体ストレス誘導剤である 4-methylumbelliferyl-β-D-xyloside (4MU-xyloside) を各実験法において 7.5 mM で 16 時間~18 時間処理を行った。コントロールとして、溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) で同時処理を行った。

マイクロアレイ

6 cm dish で培養した HeLa 細胞を、PBS で 1 回洗浄した後、sepaSol-RNA I Sugar G (ナカライテスク株式会社) を 1 ml 加えて RNA を抽出した。その total RNA を RNeasy Mini column (Qiagen) で精製し、primeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa : PR047A) を用いて cDNA に逆転写した。このサンプルにおいて、qRT-PCR (SYBR Premix Ex Taq II) と 1.2 %ホルムアルデヒドアガロース電気泳動で、品質の確認を行った。独立した 3 回の実験試料でマイクロアレイ解析を委託した。

RNA-sequencing

6 cm dish で培養した HeLa 細胞を、PBS で 1 回洗浄した後、RNeasy Mini Kit(Qiagen) で RNA を抽出した。その後、Ion Proton System for NextGeneration Sequencing with PI chips(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて RNA-sequencing を行なった。独立した 3 回の実験試料で解析した。

qRT-PCR

6 cm dish で培養した HeLa 細胞を、PBS で 1 回洗浄した後、sepaSol-RNA I Sugar G (ナカライテスク株式会社) を 1 ml 加えて RNA を抽出した。そこへ、クロロホルム 200 µl 添加し、ボルテックスを約 2 分行った後、遠心 (4 °C、30 min、14000 rpm) した。上清を 600 µl 取り、2-プロパノールを等量加えて、ボルテックス後、遠心 (室温、10 min、

14000 rpm) し、上清を捨て、100 %エタノールで洗浄し、遠心 (室温、1 min、14000 rpm) した後、沈殿を乾燥させた。それを Nuclease-Free water (Ambion) 10 μ l に溶解し、熱処理を行い、NanoDrop-1000 V3.8.1 (Thermo Fisher Scientific K.K.) によって RNA 量を定量した。このサンプルを primeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa : PR047A) を用いて cDNA に逆転写した。cDNA 溶液 (50 ng) は 1.56 ng、3.125 ng、6.25 ng、12.5 ng、25 ng に希釈して検量線を引き、Unknown サンプルは、3.125 ng、6.25 ng、12.5 ng に希釈した。これらは、マイクロアレイ用では SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) を使用し、それ以外では Power SYBR[®] Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific K.K.) を使用して、qRT-PCR サンプルとして完成させた。qRT-PCR 用プライマー (SIGMA-ALDRICH) は、終濃度 0.3 μ M で使用し、7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem) を用いて 20 μ l の系で解析を行った。qRT-PCR 時に使用したプライマーを以下に記す。

GAPDH

Fw 5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3'

Rv 5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'

TFE3

Fw 5' ACTGGGCACTCTCATCCCTAAGTC 3'

Rv 5' TTCAGGATGGTGCCCTTGTTTC 3'

GLCE

Fw 5' GGCTACAATGTGGAAGTCCGAGA 3'

Rv 5' CTGGATTGGATAGAAATAGCCTTGA 3'

HS6ST1

Fw 5' TCACCTTCACCATGGGCTTC 3'

Rv 5' GACTGAGACAAGACCCGTGCTTC 3'

NDST2

Fw 5' CCTGTGATGACAAGAGGCACAAA 3'

Rv 5' TGCAGGCTCAGGAAGAAGTGAAT 3'

KLF2

Fw 5' AAGACCTACACCAAGAGTTCGCA 3'

Rv 5' TCTGAGCGCGCAAACCTCC 3'

KLF4

Fw 5' GGGCGAATTTCCATCCACAG 3'

Rv 5' AAGAGTTCCCATCTCAAGGCACA 3'

プロモータープラスミド

ルシフェラーゼアッセイに使用したレポータープラスミドは、以下に示す範囲を PCR により増幅してベクターに組み込んだ。

まず、HeLa ゲノム DNA、または作製した pT7-blue2-T-vector, pMD19-vector から切り出したインサートをテンプレートとして、KOD-Plus-Neo (TOYOBO) キットを用いて必要領域を PCR で増幅した。その産物を TA クローニングした後、pT7-blue2-T-vector または pMD-19 vector に挿入した。数字は転写開始点からの距離を示す。

pT7-blue2-T-vector または pMD-19 vector に挿入したインサートを両側の Bgl II 切断サイトで切断し、pGL4.10 (Promega) または pGL4.23 (Promega) の Bgl II サイトに導入した。点変異体のコンストラクト、PGSE-A、PGSE-B の反復配列を挿入したコンストラクトの作製に関しては一本鎖 oligo DNA の 5'末端をリン酸化したのち二本鎖へとアニーリングし、pGL4.23 (Promega) の Bgl II サイトに導入した。

点変異体の oligo DNA は HS6ST1 (-346 nt ~ -306 nt) の oligo DNA の 5'側の 6 番目から 45 番目の塩基を、それぞれ A を C、T を G、G を T、C を A へと変えたものを用いた。

部分特異的変異体プロモータープラスミド

インサートが挿入された pT7-blue2-T-vector を鋳型として用いた。変異させる塩基それぞれ A を C、T を G、G を T、C を A へと変えた primer を用い、KOD-Plus-Neo (TOYOBO) キットを使用してプラスミド全体を増幅した。このサンプルを Dpn I 消化したのち、変異の入ったインサートを Bgl II 切断サイトで切断し、pGL4.10 (Promega) の Bgl II サイトに導入した。

細胞へのトランスフェクション

細胞へのプラスミド導入は、ルシフェラーゼアッセイではリン酸カルシウム法を用いて、siRNA のトランスフェクションは RNAi MAX (Life Technologies) を用いた。

リン酸カルシウム法によるトランスフェクション

レポータープラスミドとトランスフェクション効率の差を補正するためのリファレンスプラスミドとして pRluc (0.1 µg/µl)、2.5 mM CaCl₂、H₂O を合わせた溶液を vortex で攪拌しながら 2×HBS の中に滴下し、30 分後に培養していた HeLa 細胞に加え、48 時

間培養した。

RNAi MAX によるトランスフェクション

6 cm dish に細胞をまいた。Opti-mem 500 μ l にそれぞれの siRNA を 2.5 μ l 加え混和した。また、Opti-mem 500 μ l に RNAi MAX (Life Technologies) 8 μ l を加えて混和し、5 分間静置した。RNAi MAX の入った溶液を siRNA の入った溶液に加え、20 分間静置した。その間に培地を 1 ml 除いた。静置後、混合液を 1 ml 加え、48 時間培養した。

ルシフェラーゼアッセイ

24 well plate、もしくは 96 well plate で培養した HeLa 細胞に、レポータープラスミドと、トランスフェクション効率の差を補正するためのリファレンスプラスミドとして pRluc をリン酸カルシウム法で導入した。レポータープラスミドには、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を持つ pGL4-Basic-vector (Promega) あるいは pGL4.23-vector (Promega) を用いた。pGL4-Basic-vector は転写開始点を含むプロモーター領域を組み込む際に使用し、転写開始点を含まないプロモーター領域の場合 pGL4.23-vector を使用した。レポータープラスミドとリファレンスプラスミドを同時にトランスフェクトした翌朝、PBS で 1 回洗浄し、培地交換をした。その後、7.5 mM xyloside で 18 時間処理し、測定を行った。細胞溶解およびルシフェラーゼ活性の測定には、ピッカジーン® デュアルシーパンジー発光キット (東洋インキ) を用いた。

ウェスタンブロッティング

3cm dish で培養した HeLa 細胞をラバーポリスマンで掻き取り、遠心して細胞を回収した。得られた沈殿を氷上で冷却した PBS (プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク) 及び 10 μ M MG132 を含む) に懸濁したサンプルに 4 \times SDS 細胞溶解液 (200 mM Tris-HCl (pH6.8) , 400 mM DTT, 8 % SDS, 40 % glycerol) を加えて、100 $^{\circ}$ C で 10 分間煮沸した。そして、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。泳動後、Hybind-P 膜 (GE ヘルスケア) に転写し、5%スキムミルク/PBS-T (0.1 % Tween-20 in PBS) で処理した。PBS-T で洗浄後、適当な抗体で反応させた。抗体の希釈には Can Get Signal (TOYOBO) を用いた。PBS-T で洗浄後、Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate (TaKaRa) と LAS-3000 (Fuji Film) でシグナルを検出した。

結語

細胞小器官の量的調節機構は細胞がその恒常性を維持するために必要であり、これらのストレス応答の疾患への関連や生理的意義などが注目されている。小胞体ストレス応答、ゴルジ体ストレス応答の全容を解明することは、これらを原因とした種々の疾患の予防や治療にも繋がると考えている。

本研究により、以下のことが明らかとなった。

第1章 紫外線による小胞体ストレス応答

小胞体ストレス応答の分子機構や疾患との関係については多くの報告があったが、環境変化における生理的意義についてはほとんど研究が進んでいなかった。本研究では、紫外線によりヒトの細胞が小胞体ストレスを引き起こされていることがわかった。このことで、小胞体ストレス応答が特殊な条件下だけでなく、日常の生活の中でも起こりうることを明らかにした。

第2章 ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路

ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路の分子機構についてはほとんどわかっていなかった。本研究では、新規のゴルジ体ストレス応答の経路として、プロテオグリカン経路を同定し、さらにその標的遺伝子、転写制御配列、転写因子を同定した。

論文目録

本研究は以下の論文に公表した。

1. Ryota Komori, Mai Taniguchi, Yoshiaki Ichikawa, Aya Uemura, Masaya Oku, Sadao Wakabayashi, Kazuhiko Higuchi, Hiderou Yoshida

Ultraviolet a induces endoplasmic reticulum stress response in human dermal fibroblasts

Cell Structure and Function 37(2012)49-53

2. Kanae Sasaki, Ryota Komori, Mai Taniguchi, Akie Shimaoka, Sachiko Midori, Mayu Yamamoto, Chiho Okuda, Ryuya Tanaka, Miyu Sakamoto, Sadao Wakabayashi, Hiderou Yoshida

PGSE Is a Novel Enhancer Regulating the Proteoglycan Pathway of the Mammalian Golgi Stress Response

Cell Structure and Function 44(2019)1-19

参考文献

1. E.G.Berger, J.Roth (1997) Topology of glycosylation in the Golgi apparatus. The Golgi Apparatus (eds E.G.Berger & J.Roth) ,pp.131-161.
2. Sasaki K, Yoshida H (2015) Organelle autoregulation-stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. *J Biochem.* 157:185-95.
3. Gething MJ, Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355, 35-45.
4. Huppa JB, Ploegh HL. (1998) The eS-Sence of -SH in the ER. *Cell* 92 , 145-148.
5. Chen X, Dhen J, Prywes R. (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.* 277(15):13045-13052.
6. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 3(1):99-111.
7. Shen J, Prywes R. (2004) Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6. *J Biol Chem.* 279(41):43046-43051.
8. Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. (2005) Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol.* 25(3):921-932.
9. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 10(11):3787-3799.
10. Okada T, et al. (2003) A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J Biol Chem.* 278(33):31024-31032.
11. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. (1998) A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12(12):1812-1824.
12. Wang XZ, et al. (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 17(19):5708-5717.

13. Iwawaki T, et al. (2001) Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol.* 3(2):158-164.
14. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 107(7):881-891.
15. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2(6):326-332.
16. Harding HP, Zhang Y, Ron D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 397(6716):271-274.
17. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell.* 5(5):897-904.
18. Harding HP, et al. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 11(3):619-633.
19. Oku M, Tanakura, S, Uemura, A, Sohda, M, Misumi Y, Taniguchi M, Wakabayashi S, and Yoshida H. (2011) Novel cis-acting element GASE regulates transcriptional induction by the Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.* 36, 1-12
20. Taniguchi M, Nadanaka S, Tanakura S, Sawaguchi S, Midori S, Kawai Y, Yamaguchi S, Shimada Y, Nakamura Y, Matsumura Y, Fujita N, Araki N, Yamamoto M, Oku M, Wakabayashi S, Kitagawa H, Yoshida H. (2015) TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.* 40, 13-30.
21. Miyata S, et al. The endoplasmic reticulum-resident chaperone heat shock protein 47 protects the Golgi apparatus from the effects of O-glycosylation inhibition. (2013) *PLoS One.* 8:e69732.
22. Reiling JH, et al. A CREB3-ARF4 signalling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens. (2013) *Nat Cell Biol.* 15:1473-1485.
23. Yoshida H (2007) ER stress and diseases. *FEBS J.* 274, 630-658.
24. Harding HP, et al. (2001) Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* 7, 1153-1163.
25. Valencia A, Kochevar IE. (2008) Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 128(1):214-222.

26. Masaki H, Okano Y, Sakurai H. (1999) Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochim Biophys Acta.* 1428(1):45-56.
27. Kamata H, Hirata H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 11(1):1-14.
28. Malhotra JD, Kaufman RJ. (2007) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 9(12):2277-2293.
29. Zhang K. (2010) Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int J Clin Exp Med.* 3(1):33-40.
30. Miura H, et al. (2008) A carbazole derivative protects cells against endoplasmic reticulum (ER) stress and glutathione depletion. *J Pharmacol Sci.* 108(2):164-171.
31. Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. (2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem.* ;275(35):27013-27020.
32. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* 273(50):33741-33749.
33. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 20(18):6755-6767.
34. Oku, M., Tanakura, S., Uemura, A., Sohda, M., Misumi, Y., Taniguchi, M., Wakabayashi, S. and Yoshida, H. (2011) Novel cis-acting element GASE regulates transcriptional induction by the Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.* 36, 1-12
35. Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada, and Kazuyuki Sugahara. Human Genetic Disorders and Knockout Mice Deficient in Glycosaminoglycan. (2014) *Biomed Res Int.* 2014:495764.
36. Ai X, Do AT, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CP Jr. QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. (2003) *J Cell Biol.* 162:341-351.
37. Hamati HF, Britton EL, Carey DJ. Inhibition of proteoglycan synthesis alters extracellular matrix deposition, proliferation, and cytoskeletal organization of rat aortic smooth muscle cells in culture. (1989) *J Cell Biol.* 108:2495-2505.

38. Robinson J, Gospodarowicz D. Effect of p-nitrophenyl-beta-D-xyloside on proteoglycan synthesis and extracellular matrix formation by bovine corneal endothelial cell cultures. (1989) *J Biol Chem.* 259:3818-3824.
39. Kanwar YS, Rosenzweig LJ, Jakubowski ML. Xylosylated-proteoglycan-induced Golgi alterations. (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:6499-6503.
40. Li JP, Gong F, El Darwish K, Jalkanen M, Lindahl U. (2001) Characterization of the D-glucuronyl C5-epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulfate. *J Biol Chem.* 276(23):20069-20077.
41. Eriksson I, Sandbäck D, Ek B, Lindahl U, Kjellén L.(1994) cDNA cloning and sequencing of mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase, an enzyme involved in the biosynthesis of heparin. *J Biol Chem.* 269(14):10438-10443.
42. Aikawa J, Esko JD. (1999) Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparinGlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family. *J Biol Chem.* 274(5):2690-2695.
43. Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada, and Kazuyuki Sugahara. Human Genetic Disorders and Knockout Mice Deficient in Glycosaminoglycan. (2014) *Biomed Res Int.* 2014:495764.
44. McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. (2007) The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays.* 29(6):549-557.
45. Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R. (2005) Vascular implications of the Krüppel-like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(6):1135-1141.
46. Shindo T, et al. (2002) Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med.* 8(8):856-863.
47. Aizawa K, et al. (2004) Regulation of platelet-derived growth factor-A chain by Krüppel-like factor 5: new pathway of cooperative activation with nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem.* 279(1):70-76.
48. Oishi Y, et al. (2005) Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 1(1):27-39.

49. Jain MK, Sangwung P, Hamik A. (2014) Regulation of an inflammatory disease: Krüppel-like factors and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(3):499-508.
50. McConnell BB, et al. (2010) Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev.* 90(4):1337-1381.
51. Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. (2005) Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood.* 105(2):635-637.
52. Jiang J, et al. (2008) A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 10(3):353-360.
53. Manabe I, et al. (1997) Isolation of the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb/NMHC-B) gene and characterization of its 5'-flanking region. *Biochem Biophys Res Commun.* 239(2):598-605.
54. Watanabe N, et al. (1999) BTEB2, a Krüppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res.* 85(2):182-191.
55. Villegas F, et al. (2018) Lysosomal Signaling Licenses Embryonic Stem Cell Differentiation via Inactivation of Tfe3. *Cell Stem Cell.* 24(2):257-270.e8.
56. Shimokawa K, et al. (2011) Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo. *Dev Cell.* 21(2):257-272.
57. Häcker U, Nybakken K, Perrimon N. (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(7):530-541.
58. Yan D, Lin X. (2009) Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(3):a002493.
59. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 446(7139):1030-1037.
60. Perrimon N, Bernfield M. (2000) Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature.* 404(6779):725-728.
61. Ai X, et al. (2003) QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J Cell Biol.* 162(2):341-351.
62. Takeuchi K, et al. (2013)

Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nat Commun.* 2013;4:2740.

63. Bradbury EJ, et al. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature.* 416(6881):636-640.

謝辞

はじめに、本研究を遂行する機会を与えてくださった兵庫県立大学生命理学研究科生体物質科学Ⅱ吉田秀郎教授に心からの感謝を申し上げます。吉田教授には、非常に恵まれた研究環境を与えていただき、そのおかげで何不自由のない研究生活を過ごすことができました。また、吉田教授には実験手技のみならず、発表方法や研究文書の書き方、他にも様々なことを教えていただき、多くのことを学ばせていただきました。吉田教授には研究面だけでなく、他の様々な相談にも乗っていただき、現在の私があるのは吉田教授のおかげであります。深く感謝の意を表します。さらに、多くのご助言を頂戴いたしました同研究室の若林貞夫准教授、佐々木桂奈江助教授、谷口麻衣前助教授（現京都大学）に深く感謝いたします。谷口麻衣前助教授には、修士過程の間、様々な実験手技を直接教えていただきました。重ねて感謝いたします。

また、UVA による小胞体ストレスに関する研究において、共同研究として共に研究をしてくださった花王株式会社 スキンケア研究所の樋口和彦様に深く感謝いたします。

本論文中の研究は、兵庫県立大学生命理学研究科生体物質科学Ⅱ分野の先輩方や後輩と共に実験を行ったものであり、共に研究をしてくださった研究室の方々に深く感謝の意を表します。また、研究室の方々とは研究生活でも、日常生活でも多くの時間を共に過ごし、様々なことを学ばせていただきました。また、日頃から親切にいただき、楽しく充実した研究生活を送ることができました。深く感謝いたします。

多くの方々に支えていただき、このような研究を行うことができました。皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、大学生活を送るにあたって、精神的にも経済的にも支えてくれた父 清一、母 千秋、兄 洋輔、妹 あすかに心からの感謝を申し上げます。