

博士論文審査報告書

氏名 Mohamad Ikhwan Bin Jamaludin
学位の種類 博士 (理学)
学位記番号 博理第125号
学位授与報告番号 甲第374号
学位授与年月日 令和2年3月24日
学位授与の要件 学位規則第4条1項該当
論文題目 Analysis of the mucin pathway of the mammalian Golgi stress response
「哺乳類のゴルジ体ストレス応答を制御するムチン経路の解析」
論文審査委員 (主査) 教授 西谷秀男
(副査) 教授 吉田秀郎
(副査) 教授 水島恒裕
(副査) 准教授 細川暢子
(京都大学 ウイルス・再生医科学研究所)
(副査) Associate Professor Ray Lu
(University of Guelph,)

1. 論文内容の要旨

細胞にはゴルジ体などの細胞小器官が存在しているが、その存在量は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機能するために必須の機構であり、その研究は細胞生物学の根本的命題の一つである。本研究で解析対象とするゴルジ体ストレス応答は、ゴルジ体の量的調節機構である。これまでの研究から、哺乳類のゴルジ体ストレス応答には、TFE3 経路と CREB3 経路、HSP47 経路、プロテオグリカン経路が存在することが知られていたが、ゴルジ体でのムチン型糖鎖修飾酵素の量を調節する機構(ムチン経路)は知られていなかった。ムチンは消化器官や気管の粘膜を構成する重要な糖タンパク質であり、ムチンの糖鎖修飾はゴルジ体の重要な機能の一つである。そこで、本研究課題ではムチ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か解析することにした。

まずはじめに、ムチン型糖鎖修飾能力が不足した時(ムチン型ゴルジ体ストレス)にムチン型糖鎖修飾酵素の発現が増強されるかどうか調べた。マイクロアレイ解析や RNA seq 解析などを行った結果、GALNT5 や GALNT8、GALNT18 等のムチン型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写が誘導されることがわかった。このことは、哺乳類細胞にムチン経路が確かに存在していることを示唆している。意外なことに、ムチン型ゴルジ体ストレス時に TFE3 経路を制御する転写因子 TFE3 の転写も誘導されることがわかった。TFE3 経路によっては TFE3 遺伝子

の転写は誘導されないことから、この知見はムチン経路から TFE3 経路にクロストーク経路があることを示唆している。そこで次に、TFE3 遺伝子の転写誘導を制御するエンハンサー配列を同定することにした。TFE3 遺伝子のプロモーター領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子に繋いだレポーターをヒト HT29 細胞に導入し、ムチン型ゴルジ体ストレスを与えたところ、ルシフェラーゼの発現が誘導された。このことは、単離したプロモーター領域に目的のエンハンサー配列が存在することを示している。そこで、このプロモーター領域の欠失変異体及び点変異体を作製して同様の解析を行った結果、転写誘導に必要なエンハンサー配列 (ACTTCC(N9)TCCCCA) を同定し、MGSE (Mucin-type Golgi Stress response Element) と命名した。MGSE は単独でもムチン型ストレスに応答して転写を誘導できること、また TFE3 プロモーターに存在する MGSE を破壊すると TFE3 プロモーターからの転写誘導が失われることを見出した。このことは、MGSE はムチン経路から TFE3 経路へのクロストーク経路を制御する主たるエンハンサー配列であることを示している。更に、ムチン経路によって TFE3 タンパク質の活性化機構も制御されているかどうか調べた。TFE3 は平常時にはリン酸化されて細胞質に繫留されているが、TFE3 経路が活性化すると TFE3 は脱リン酸化されて核へ移行し、エンハンサー配列 GASE に結合して標的遺伝子の転写を誘導することが知られている。解析の結果、細胞にムチン型ゴルジ体ストレスを与えると、TFE3 は脱リン酸化されて核へ移行するが、GASE からの転写までは誘導されないことを明らかにした。このことは、ムチン経路は TFE3 経路の活性化を促進するが、単独では TFE3 経路の完全な活性化までは至らないことを示している。

以上の結果は、哺乳類細胞にゴルジ体ストレス応答のムチン経路が存在することを明らかにするとともに、ムチン経路から TFE3 経路へのクロストーク経路を発見し、その基本機構を解明したものである。

2. 論文審査結果

本研究は、これまで未知であったゴルジ体ストレス応答のムチン経路の存在を明らかにするとともに、ムチン経路から TFE3 経路へのクロストーク経路の分子機構を解明することを目的としている。解析の結果、最先端の分子生物学的な方法を駆使することによってムチン経路の存在を明らかにするとともに、ムチン経路から TFE3 経路へのクロストーク経路を見出し、そのエンハンサー配列を同定した。これらの結果はムチン経路の重要な部分を明らかにするものであり、その全貌を明らかにするための基盤となるものである。

細胞小器官の量的調節機構は細胞生物学の重要な研究課題の一つであり、小胞体の量的調節機構である小胞体ストレス応答の研究は、毎年のようにノーベル賞の候補として話題に上がる。本研究は、これまで知られていたゴルジ体ストレス応答の 4 経路に加えて、新たにムチン経路の存在を明らかにしたものであり、学術的にきわめて重要なものである。また、ムチンは様々な疾患と関連しており、本研究によって得られた知見は関連疾患の予防・診断・治療法の開発に役立つものと期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。また、令和 2 年 1 月 23 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

博士論文審査報告書

論文題目 : Analysis of the mucin pathway of the mammalian Golgi stress response
「哺乳類のゴルジ体ストレス応答を制御するムチン経路の解析」

申請者 : Mohamad Ikhwan Bin Jamaludin

1. 論文内容の要旨

細胞にはゴルジ体などの細胞小器官が存在しているが、その存在量は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機能するために必須の機構であり、その研究は細胞生物学の根本的命題の一つである。本研究で解析対象とするゴルジ体ストレス応答は、ゴルジ体の量的調節機構である。これまでの研究から、哺乳類のゴルジ体ストレス応答には、TFE3 経路と CREB3 経路、HSP47 経路、プロテオグリカン経路が存在することが知られていたが、ゴルジ体でのムチン型糖鎖修飾酵素の量を調節する機構(ムチン経路)は知られていなかった。ムチンは消化器官や気管の粘膜を構成する重要な糖タンパク質であり、ムチンの糖鎖修飾はゴルジ体の重要な機能の一つである。そこで、本研究課題ではムチ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か解析することにした。

まずはじめに、ムチン型糖鎖修飾能力が不足した時(ムチン型ゴルジ体ストレス)にムチン型糖鎖修飾酵素の発現が増強されるかどうか調べた。マイクロアレイ解析や RNA seq 解析などを行った結果、GALNT5 や GALNT8、GALNT18 等のムチン型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写が誘導されることがわかった。このことは、哺乳類細胞にムチン経路が確かに存在していることを示唆している。意外なことに、ムチン型ゴルジ体ストレス時に TFE3 経路を制御する転写因子 TFE3 の転写も誘導されることがわかった。TFE3 経路によっては TFE3 遺伝子の転写は誘導されないことから、この知見はムチン経路から TFE3 経路にクロストーク経路があることを示唆している。そこで次に、TFE3 遺伝子のプロモーター領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子に繋いだレポーターをヒト HT29 細胞に導入し、ムチン型ゴルジ体ストレスを与えたところ、ルシフェラーゼの発現が誘導された。このことは、単離したプロモーター領域に目的のエンハンサー配列が存在することを示している。そこで、このプロモーター領域の欠失変異体及び点変異体を作製して同様の解析を行った結果、転写誘導に必要なエンハンサー配列 (ACTTCC(N9)TCCCCA) を同定し、MGSE(Mucin-type Golgi Stress response Element) と命名した。MGSE は単独でもムチン型ストレスに応答して転写を誘導できること、また TFE3 プロモーターに存在する MGSE を破壊すると TFE3 プロモーターからの転写誘導が失われることを見出した。このことは、MGSE はムチン経路から TFE3 経路へのクロストーク経路を制御する主たるエンハンサー配列であることを示している。更に、ムチン経路によって TFE3 タンパク質の活性化機構も制御されているかどうか調べた。TFE3 は平常時にはリン酸化されて細胞質に繫留されているが、TFE3 経路が活性化すると TFE3 は脱リン酸化されて核へ移行し、エンハンサー配列 GASE に結合して標的遺伝子の転写を誘導することが知られている。解析の結果、細胞にムチン型ゴルジ体ストレスを与えると、TFE3 は脱リン酸

化されて核へ移行するが、GASE からの転写までは誘導されないことを明らかにした。このことは、ムチン経路は TFE3 経路の活性化を促進するが、単独では TFE3 経路の完全な活性化までは至らないことを示している。

以上の結果は、哺乳類細胞にゴルジ体ストレス応答のムチン経路が存在することを明らかにするとともに、ムチン経路から TFE3 経路へのクロストーク経路を発見し、その基本機構を解明したものである。

2. 論文審査結果

本研究は、これまで未知であったゴルジ体ストレス応答のムチン経路の存在を明らかにするとともに、ムチン経路から TFE3 経路へのクロストーク経路の分子機構を解明することを目的としている。解析の結果、最先端の分子生物学的な方法を駆使することによってムチン経路の存在を明らかにするとともに、ムチン経路から TFE3 経路へのクロストーク経路を見出し、そのエンハンサー配列を同定した。これらの結果はムチン経路の重要な部分を明らかにするものであり、その全貌を明らかにするための基盤となるものである。

細胞小器官の量的調節機構は細胞生物学の重要な研究課題の一つであり、小胞体の量的調節機構である小胞体ストレス応答の研究は、毎年のようにノーベル賞の候補として話題に上がる。本研究は、これまで知られていたゴルジ体ストレス応答の 4 経路に加えて、新たにムチン経路の存在を明らかにしたものであり、学術的にきわめて重要なものである。また、ムチンは様々な疾患と関連しており、本研究によって得られた知見は関連疾患の予防・診断・治療法の開発に役立つものと期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。
また、令和 2 年 1 月 23 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：西谷秀男



副査：吉田秀郎



：水島恒裕



：細川暢子



(京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 准教授)

： Ray Lu 印

(University of Guelph, Associate Professor)



COLLEGE OF BIOLOGICAL SCIENCE
Department of Molecular and Cellular Biology

Tuesday, January 21, 2020

Review by Ray Lu, Ph.D.; Professor
University of Guelph, Canada

"A crosstalk between the mucin pathway and the TFE3 pathway of the mammalian Golgi stress response"

by Ikhwan Jamaludin
Graduate School of Life Science, University of Hyogo.

Supervisor – Dr. Hiderou Yoshida
Professor, Graduate School of Life Science, University of Hyogo

EVALUATION REPORT

The capacity of each organelle is tightly regulated through autoregulation in accordance with cellular demand, the mechanism of which is a fundamental issue in cell biology. The Golgi stress response is an autoregulatory mechanism controlling capacity of the Golgi apparatus. The mammalian Golgi stress response consists of several response pathways, including pathways mediated by TFE3, proteoglycans, and mucin among others. The mucin pathway augments the expression of glycosylation enzymes of mucin core proteins. By analysis of the mucin pathway, Mr. Jamaludin found that the mucin pathway activates transcription of TFE3, the key modulator of the TFE3 pathway. He identified a novel enhancer element for transcriptional induction of the human TFE3 gene, named MGSE (mucin-type Golgi stress response element), with a consensus sequence of ACTTCA(N9)TCCCCA. Moreover, he discovered that, upon activation of the mucin pathway, TFE3 protein is converted from an inactive phosphorylated form localized in the cytosol to an activated dephosphorylated form concentrated in the nucleus. These findings strongly suggest the existence of crosstalk between the mucin to the TFE3 pathways, and will have profound impact on our understanding of the mammalian Golgi stress response.

Based on thorough evaluation, the reviewer recommends acceptance of Mr. Jamaludin's PhD thesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ray Lu". The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the end.