

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06167

研究課題名(和文) Crinophagy研究基盤の創出と生理機能解析

研究課題名(英文) Analysis and establishment of crinophagy research

研究代表者

板倉 英祐 (Itakura, Eisuke)

千葉大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：90754218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類動物の血液や体液にはタンパク質が豊富に存在する。一方でストレスを受けたタンパク質は変性する。細胞内ではタンパク質品質管理経路が異常タンパク質を分解することでタンパク質恒常性を保つことがわかっているが、細胞外のタンパク質恒常性維持機構はよくわかっていなかった。細胞外異常タンパク質の分解経路を探索したところ、細胞外シャペロンが細胞外異常タンパク質を選択的に分解へ導く Chaperone and Receptor mediated Extracellular protein Degradation(CRED)経路の同定に至った。この経路が血液内タンパク質恒常性維持に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外へのタンパク質沈着は神経変性疾患などの疾患の要因となることが知られている。しかし細胞外タンパク質を除去するシステムはよくわかっていない。本研究成果は、細胞外変性タンパク質を選択的にリソソーム分解するシステムを世界で初めて明らかにした。このことはタンパク質分解関連学術分野に新しい知見を導入し、当該分野が新しい方向性へも発展することが期待される。今後このシステムを応用することで、疾患の原因となる異常タンパク質を選択的に取り除く新規疾患治療方法の開発へと発展し、いまだ治療法の開発に至っていない難治性の神経疾患への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)： There are abundant proteins in extracellular spaces including blood and body fluid in mammals. On the other hand, the stress induce protein denature. It is well known that intracellular protein degradation systems degrade aberrant intracellular proteins to maintain proteostasis. However, degradation system for aberrant extracellular proteins remained unclear. We identified Chaperone and Receptor mediated Extracellular protein degradation (CRED) pathway which leads to selective degradation of aberrant extracellular protein via an extracellular chaperone. These data indicate that the extracellular protein degradation pathway has important role for extracellular proteostasis.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：タンパク質分解 タンパク質品質管理 細胞外タンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

日本は世界にも類をみない超高齢化社会を迎え、生活習慣病や神経疾患患者は増加する一方である。原因の一つであるホルモンなどの分泌タンパク質恒常性の異常は、生体恒常性の原因となる。細胞内のタンパク質はオートファジーやプロテアソーム系によって多種多様な調節機構が構成され、細胞内タンパク質分解システムの重要性が明らかとなっている。しかし、分泌顆粒内の分泌タンパク質の調節機構、特に分泌顆粒内の分泌タンパク質品質管理機構はわかっていなかった。

申請者は分泌顆粒内の分泌タンパク質がリソソームで分解される **Crinophagy** と呼ばれる現象に着目し、未発展分野である分泌タンパク質の分解システムの解析を行った

### 2. 研究の目的

研究開始から細胞内の分泌顆粒分解に着目した研究を進行していたところ、細胞内の分泌タンパク質ではなく、細胞外に分泌されたタンパク質が他細胞に取り込まれ分解される新規のタンパク質品質管理システムを見出した。そのため、研究目的に軌道修正を加え、細胞外に分泌された細胞外変性タンパク質の分解システムの解析することを目的とした

血液には高濃度（約 60~100mg/ml）のタンパク質が循環している。しかし血液内（細胞外）のタンパク質の品質管理システムはよくわかっていない。そこで、細胞外シャペロンが細胞外の変性タンパク質をリソソームへ運び分解するシステムがあると仮説した。

またリソソームタンパク質分解の研究を促進するため、リソソームの分解活性を測定する蛍光プローブの新規開発にも取り組むことも目的とした。

### 3. 研究の方法

細胞内リソソームの活性測定法を新規に開発するため、リソソームタンパク質に sfGFP、内部標準として mCherry が細胞質に発現する METRIQ プローブを作成した。哺乳類培養細胞に発現させ、リソソーム活性化もしくは抑制刺激後にフローサイトメーターによって細胞あたりの GFP/mCherry 蛍光値を評価した。

細胞外タンパク質分解に関する因子として細胞外シャペロンの一つ Clusterin に着目した。Clusterin は糖鎖修飾とジスルフィド結合を必要とするため大腸菌や昆虫細胞から活性タンパク質を得ることが困難である。そこで哺乳類細胞の培養上清から分泌された組み換え Clusterin タンパク質を得るための安定過剰発現 293 細胞を作成した。また細胞外タンパク質分解を検出すべく Clusterin に RFP と GFP を融合した Clusterin-RG を作成した。Clusterin-RG を含む培養上清から Ni-NTA カラムを用いて mg 単位の Clusterin-RG の精製に成功した。精製した Clusterin-RG タンパク質を培養培地へ変性タンパク質モデルである Luciferase とともに添加し、培養細胞に Clusterin-RG が取り込まれると赤色蛍光が蓄積する実験システムを構築した。取り込み後の細胞をフローサイトメーターによる細胞の蛍光レベル測定や、蛍光顕微鏡観察、ウェスタンブロットによる Clusterin cleavage アッセイによって Clusterin-RG の細胞内取り込みやリソソーム分解を検討した。これらシステムを用いて、哺乳類細胞が変性タンパク質を取り込み分解する分子機構の解明に取り組んだ。

### 4. 研究成果

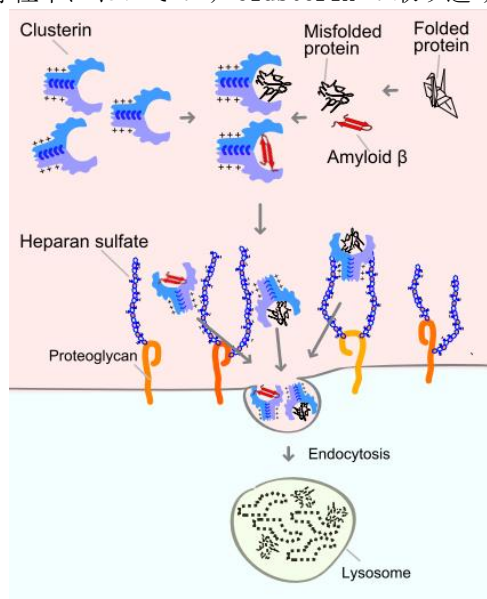
- 1) リソソーム活性を測定する新規プローブ Lysosomal-METRIQ を開発に成功した。細胞あたりの GFP 蛍光値の減少をリソソーム活性上昇として、GFP 蛍光値の増加をリソソーム抑制として定量的に評価できるようになった。薬剤スクリーニングを組み合わせることで、CDK 阻害剤がリソソーム活性を促進する作用を見出し、リソソーム生合成経路の新しい一端が明らかとなった (Ishii S et al., Sci. Rep. 2019)。
- 2) Clusterin 取り込みアッセイ法を用いて、細胞外の Clusterin と細胞外不良タンパク質の関係を調べたところ、興味深いことに misfolded protein 存在下において、Clusterin の細胞内取り込み量が劇的に増加しました。また非ラベル Clusterin による競合反応や、リソソーム阻害剤による Clusterin 分解阻害、Clusterin がリソソームに局在することも観察しました。つまり細胞外の不良タンパク質と結合した Clusterin 複合体は、細胞膜上の未知の品質管理受容体を選択的に認識され、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることを発見した。
- 3) この経路が哺乳類生体内において普遍的な現象であるかどうか確かめるため、腎臓、卵巣、肺、骨、肝臓、小腸に由来する培養細胞を用いた Clusterin 取り込みアッセイを行った。その結果、どの細胞においても変性タンパク質依存的に Clusterin の取り込みが増加したことから、Clusterin-変性タンパク質の取り込みは、普遍的な生体機能であることが示唆された。
- 4) Clusterin 取り込みアッセイ法は細胞あたりの Clusterin 取り込み量をモニターできる。このメリットを活かし、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 法と組み合わせることで、Clusterin-変性タンパク質複合体を認識する細胞膜上の受容体の網羅的遺伝子スクリーニングした。その結果ヘパラン硫酸合成酵素 EXT1 や EXT3 を欠損した細胞は Clusterin-変性タンパク質の取り込みが抑制されていることを見出した。
- 5) ヘパラン硫酸が Clusterin の受容体であることを確認するために、ヘパラン硫酸結合セフ

アロースを作成し、プルダウン実験を行った。その結果、Clusterin はヘパラン硫酸に結合し、一方でヘパラン硫酸を脱硫酸すると結合ができなくなることが分かった。さらに遊離ヘパラン硫酸を Clusterin とともに細胞培地に添加すると、Clusterin 取り込みが競争阻害された。また Clusterin の塩基性アミノ酸変異体ではヘパラン硫酸との結合が低下することから、ヘパラン硫酸と Clusterin が直接結合することがわかった。

6) ここまでの実験は熱変性しやすいモデルタンパク質として luciferase を用いた。Clusterin の内在性基質として、赤血球ライセートを用いた。細胞質の様々なタンパク質が熱変性依存的に Clusterin に結合し、また結合タンパク質存在下においてのみ Clusterin の取り込み分解が促進したことから、Clusterin は様々な変性タンパク質と結合し、その分解を担うこともわかった。

7) アルツハイマー病患者は細胞外にアミロイドβが蓄積することが知られている。Clusterin とアミロイドβをインキュベート後、培養培地に加えたところ、アミロイドβ依存的に Clusterin の取り込み分解が促進された。この取り込みもヘパラン硫酸依存的に生じた。

これらの結果から、細胞外の異常タンパク質を選択的に分解する経路の同定に至り、Chaperone and Receptor mediated Extracellular protein Degradation (CRED) システムと名付けた(右図)(Itakura et al., JCB 2020)。CRED システムのより詳細な分子機構や、基質選択性など、今後この分野を拡張発展していく礎となる成果を導けた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Itakura Eisuke, Chiba Momoka, Murata Takeshi, Matsuura Akira	4. 巻 219
2. 論文標題 Heparan sulfate is a clearance receptor for aberrant extracellular proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201911126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Otsubo Kana, Maeyashiki Chiaki, Nibe Yoichi, Tamura Akiko, Aonuma Emi, Matsuda Hiroki, Kobayashi Masanori, Onizawa Michio, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Torii Satoru, Itakura Eisuke, Watanabe Mamoru, Oshima Shigeru	4. 巻 in press
2. 論文標題 Receptor Interacting Protein Kinase 3 (RIPK3) inhibits autophagic flux during necroptosis in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii Shunsuke, Matsuura Akira, Itakura Eisuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of a factor controlling lysosomal homeostasis using a novel lysosomal trafficking probe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48131-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miura Atsuhiko, Itakura Eisuke, Matsuura Akira	4. 巻 24
2. 論文標題 Reversible DNA damage checkpoint activation at the presenescent stage in telomerase deficient cells of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 546 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Kazuya、Itakura Eisuke、Takano Kazunori、Endo Takeshi	4. 巻 376
2. 論文標題 DA-Raf, a dominant-negative regulator of the Ras/ERK pathway, is essential for skeletal myocyte differentiation including myoblast fusion and apoptosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 168 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 板倉 英祐	4. 巻 90
2. 論文標題 膜タンパク質とタンパク質品質管理機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 781 ~ 790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900781	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 板倉 英祐	4. 巻 33
2. 論文標題 クリノファジーと分泌顆粒分解	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 657 ~ 661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takayama Kaori、Matsuura Akira、Itakura Eisuke*	4. 巻 591
2. 論文標題 Dissection of ubiquitinated protein degradation by basal autophagy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS letters	6. 最初と最後の頁 1199 ~ 1211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1002/1873-3468.12641	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eisuke Itakura*, Changchun Chen and Mario de Bono*	4. 巻 7
2. 論文標題 Purification of FLAG-tagged Secreted Proteins from Mammalian Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blo-protocol	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.21769/BioProtoc.2430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tatsumi Takayuki, Takayama Kaori, Ishii Shunsuke, Yamamoto Atsushi, Hara Taichi, Minami Naojiro, Miyasaka Naoyuki, Kubota Toshiro, Matsuura Akira, Itakura Eisuke*, Tsukamoto Satoshi*	4. 巻 145
2. 論文標題 Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 161893 ~ 161893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1242/dev.161893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen C, Itakura E, Nelson GM, Sheng M, Laurent P, Fenk LA, Butcher RA, Hegde RS and de Bono M	4. 巻 542
2. 論文標題 IL-17 is a neuromodulator of Caenorhabditis elegans sensory responses	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 43-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/nature20818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshii SR, Kuma A, Akashi T, Hara T, Yamamoto A, Kurikawa Y, Itakura E, Tsukamoto S, Shitara H, Eishi Y, Mizushima N.	4. 巻 39
2. 論文標題 Systemic Analysis of Atg5-Null Mice Rescued from Neonatal Lethality by Transgenic ATG5 Expression in Neurons.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Developmental cell	6. 最初と最後の頁 116-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.devcel.2016.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itakura E, Zavodszky E, Shao S, Wohlever ML, Keenan RJ, and Hegde RS	4. 巻 63
2. 論文標題 Ubiquilins chaperone and triage mitochondrial membrane proteins for degradation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 21-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Rie Uesugi, Akira Matsuura, and Eisuke Itakura
2. 発表標題 Development of a ratiometric fluorescent probe for detecting stressed mitochondria
3. 学会等名 第19回日本ミトコンドリア学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板倉英祐
2. 発表標題 選択的な細胞外タンパク質分解経路
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊達悠起、松浦彰、板倉英祐
2. 発表標題 CCT複合体を分解するオートファジーの分子機構解析
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井俊輔、松浦彰、板倉英祐
2. 発表標題 小胞体異常タンパク質のオートファジー依存的分解機構の解析
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上杉里瑛、松浦彰、板倉英祐
2. 発表標題 新規蛍光比率プローブでミトコンドリアストレスを検出する
3. 学会等名 第92回 日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井俊輔、松浦彰、板倉英祐
2. 発表標題 新規蛍光プローブを用いたリソソーム生合成調節因子の探索
3. 学会等名 第92回 日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunsuke Ishii , Akira Matsuura , Eisuke Itakura
2. 発表標題 Analysis of organelle size control pathway using a novel ratiometric probe
3. 学会等名 ASCB / EMBO 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 板倉英祐
2. 発表標題 膜タンパク質の品質管理システム
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunsuke Ishii , Akira Matsuura , Eisuke Itakura
2. 発表標題 Analysis of Lysosomal biogenesis pathway using a novel ratiometric probe
3. 学会等名 2018 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板倉英祐
2. 発表標題 細胞質におけるミトコンドリア膜タンパク質の品質管理システム
3. 学会等名 2018年度日本生化学会関東支部例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真殿優 板倉英祐
2. 発表標題 リポファジーを介した脂肪代謝経路の研究
3. 学会等名 2018年第11回オートファジー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井俊輔、板倉英祐
2. 発表標題 新規蛍光プローブを用いた細胞内膜系制御機構の探索
3. 学会等名 2018年第11回オートファジー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunsuke Ishii , Akira Matsuura , Eisuke Itakura
2. 発表標題 Analysis of organelle size control pathway using a novel ratiometric probe
3. 学会等名 ASCB / EMO 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eisuke Itakura, Kaori Takayama, Akira Matsuura,
2. 発表標題 Dissection of ubiquitinated protein degradation by basal autophagy
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shunsuke Ishii , Akira Matsuura , Eisuke Itakura
2. 発表標題 A novel probe for a "lysosomal integrity assay"
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 板倉英祐、高山かおり、石井俊輔、辰巳嵩征、松浦彰、塚本智史
2. 発表標題 選択的オートファジーを利用した強制脂肪滴分解システムの構築
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石井俊輔、松浦彰、板倉英祐
2. 発表標題 Membrane traffic stress probeの開発
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高山かおり、辰巳嵩征、石井俊輔、松浦彰、塚本智史、板倉英祐
2. 発表標題 オートファジーの分子機構を応用した脂肪滴分解システムの構築
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 板倉 英祐, Ramanujan Hegde
2. 発表標題 ミトコンドリア膜タンパク質の細胞質における品質管理機構
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 板倉 英祐
2. 発表標題 Crinophagyによる分泌顆粒膜融合経路のメカニズム解析
3. 学会等名 第10回オートファジー研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Eisuke Itakura, Akira Matsuura
2. 発表標題 Establishment of a novel lysosomal integrity assay
3. 学会等名 American Society for Cell Biology 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース2019 <a href="http://www.s.chiba-u.ac.jp/pr/files/itakura20200219.pdf">http://www.s.chiba-u.ac.jp/pr/files/itakura20200219.pdf</a></p> <p>プレスリリース2019 <a href="https://www.newswise.com/articles/researchers-discover-how-cells-clear-misfolded-proteins-from-tissues?sc=rsin">https://www.newswise.com/articles/researchers-discover-how-cells-clear-misfolded-proteins-from-tissues?sc=rsin</a></p> <p>プレスリリース2019 <a href="http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2019/20190823lysosome.pdf">http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2019/20190823lysosome.pdf</a></p> <p>プレスリリース2016 <a href="http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2016/20160624_1.pdf">http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2016/20160624_1.pdf</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石井 俊輔  (Ishii Shunsuke)	千葉大学・大学院 融合理工学府  (12501)	