

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07209

研究課題名(和文)新規翻訳後修飾因子UBL3によるタンパク質輸送機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of protein sorting mechanism by a novel post-translational modification factor UBL3

研究代表者

上田 洋司 (Ageta, Hiroshi)

藤田医科大学・医科学研究センター・講師

研究者番号：40416649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは、ほぼ全ての細胞種からMultivesicular Body(MVB)を介して細胞外へ放出される小胞であり、産生細胞に由来する特定のタンパク質やmiRNAを内包し標的細胞に再び取り込まれることで新たな細胞間コミュニケーションとして働く。特定タンパク質のエクソソームへの輸送機構は不明であった。

申請者は、種間で高度に保存されたユビキチン様タンパク質であるUbiquitin like protein 3(UBL3)による新規翻訳後修飾UBL3化を発見し、エクソソーム中のタンパク質の60%がUBL3異依存的に輸送されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UBL3によるエクソソームへのタンパク質輸送における分子機構を明らかにすることによって、同じUBLファミリータンパク質であるユビキチンによる分解系制御機構やAtgによるオートファジー制御機構のように、新たな研究領域の展開が予想できる。エクソソームによる細胞間コミュニケーションは、疾患を含めた様々な生命現象に関与しており、特にがん転移において、非常に重要な役割を持つことが知られている。がん転移に対抗する創薬の観点においても、UBL3研究は一大分野として発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Exosomes derived from multivesicular bodies (MVBs), mediate cell-to-cell communication by transporting proteins, mRNAs, and miRNAs. However, the molecular mechanism by which proteins are sorted to exosomes is not fully understood. Here, we report that ubiquitin-like 3 (UBL3) acts as a posttranslational modification (PTM) factor that regulates protein sorting to exosomes. We find that UBL3 modification is indispensable for sorting of UBL3 to MVBs and exosomes. By performing proteomics analysis, we find 1241 UBL3-interacting proteins, including Ras. We also show that UBL3 directly modifies Ras and oncogenic RasG12V mutant, and that UBL3 expression enhances sorting of RasG12V to exosomes via UBL3 modification. Collectively, these results indicate that PTM by UBL3 influences the sorting of proteins to exosomes.

研究分野：分子生物学

キーワード：エクソソーム UBL3 MVB

### 1. 研究開始当初の背景

エクソソームは、ほぼ全ての細胞種から Multivesicular Body(MVB)を介して細胞外へ放出される小胞であり、産生細胞に由来する特定のタンパク質や miRNA を内包し標的細胞に再び取り込まれることで新たな細胞間コミュニケーションとして働き、がん転移などの疾患を含めた様々な生命現象に関与している。しかし、特定タンパク質のエクソソームへの輸送機構は不明であった。

タンパク質は合成後に様々な翻訳後修飾を受ける事で機能・局在・分解などの制御を受ける。申請者は、神経系におけるユビキチン-プロテアソーム系(UPS)に注目して研究を行っており、グルタミン酸受容体の裏打ちタンパク質である Vesl-1S が UPS により分解され、局在制御されている事を見出した(JBC 2001, Mol. Brain. Res. 2001)。更に、バイオインフォマティクスを駆使して、新規ユビキチンリガーゼ SCRAPPER の同定(Cell 2007)や、グルタミン酸受容体を制御する Tmub1 の同定(PLoS ONE 2007)を行ってきた。エクソソームは細胞外小胞の 1 種であり、産生細胞に由来する特定のタンパク質や miRNA を内包し、標的細胞に取り込まれることで機能制御を行うことが知られている。がん細胞の分泌するエクソソームには、転移に必要な血管新生の誘導や免疫細胞を撃退するための特定のタンパク質や miRNA が含有されていることから、がん細胞の分泌するエクソソームを遮断する新たながん治療戦略への期待が高まっていた。

### 2. 研究の目的

エクソソームによる細胞間コミュニケーションは、疾患を含めた様々な生命現象に関与しており、特にがん転移において、非常に重要な役割を持つことが知られている。グリオーマ細胞で発現している活性変異型 EGFR がエクソソームを介して伝搬する事(Al-Nedawi K. et al., Nat Cell Biol 2008)や、メラノーマから放出されたエクソソームに存在する受容体型チロシンキナーゼ MET が転移へ関与する事(Peinado H, et al., Nat Med 2012)から、エクソソームは、がん転移において非常に重要な役割を持つが知られている。更に、アルツハイマー病の主因子として考えられているアミロイド $\beta$ や、プリオン病のプリオンもエクソソームへ取り込まれることが報告されている(Rajendran L. et al., PNAS 2006; Robertson C. et al., Blood 2006)。しかしながら、特定タンパク質群のエクソソームへの輸送機構は不明であった。

本申請者は、生物学的に重要な新規翻訳後修飾因子を探索するために、酵母、ハエ、線虫、マウス、ヒトゲノムから Ubiquitin like domain を含むタンパク質をすべて抽出し、系統樹解析により種間を超えて高度保存されている Ubiquitin like protein を 10 個見出した。その殆どは Ubiquitin, SUMO, Nedd8 などの機能既知であった。その中で、機能未知の UBL3 に注目し研究を開始し、新規翻訳後修飾 UBL3 化を発見し、UBL3 の MVB 局在を見出してた(挑戦的萌芽研究)。

申請者が見出した UBL3 化修飾とエクソソーム放出の関係を精査し、UBL3 化修飾に関与する分子群を解析する。がん転移に対抗する創薬の観点においても、UBL3 研究は一大分野として発展する可能性がある。UBL3 とエクソソームの研究を推し進めることで、UBL3 によるタンパク質輸送の分子的機構が明らかとなる。UBL3 阻害剤は、今までのがん研究におけるパラダイムと全く異なるタイプのがん転移阻害薬になる事が期待できる。さらに、エクソソーム関連疾患への応用にも繋がる可能性がある。

### 3. 研究の方法

新規翻訳後修飾因子 UBL3 によるエクソソームへのタンパク質輸送機構の解明を目的として、免疫沈降法を用いて濃縮した UBL3 化タンパク質群への網羅的プロテオミクス解析を行う。HEK 細胞に FLAG-UBL3 を過剰発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降することで、高度に UBL3 化した分子群を濃縮する事ができる。ネガティブコントロールとして、UBL3 化が生じない変異体 UBL3 を使用する。empty vector, FLAG-UBL3, FLAG-変異体 UBL3 からの

免疫沈降物を比較解析することで、網羅的に UBL3 化する分子を解析する。同定タンパク質群に FLAG タグを付加し、Biotin タグ UBL3 と共発現させ、免疫沈降法により結合能の実験を行なう。同定されたタンパク質群を HEK 細胞に導入する事により、標的分子の UBL3 化反応及びエクソソーム輸送への影響を精査する。

#### 4. 研究成果

UBL3 の MVB 局在を介したエクソソームへの輸送には、UBL3 の翻訳後修飾活性が重要であることが判明した。ドイツ Max Planck 研究所の Mann 教授との共同研究により、網羅的プロテオミクス解析により同定された 1447 個のタンパク質に対して Gene Ontology Cellular Compartment 解析(GOCC)を行った結果、31%のタンパク質(454/1,447 proteins; *p*-value of 0.00405)が"extracellular vesicular exosome"とアノテーションされていた。この結果は、結合分子の 31%は UBL3 依存的にエクソソームへ輸送される可能性がある事を示している。ネガティブコントロールと使用していた UBL3 化活性のない変異体 UBL3C113/114A やビーズに結合する分子群に対して同様の解析を行った結果、それらの分子は含まれなかった。更に、同定された 1447 個の UBL3 結合分子群の中に、Ubiquitin や Sorting というキーワードがアノテーションされている機能未知のタンパク質が、それぞれ十数個含まれていた。さらに、結合分子群のアノテーション解析したところ、発がん遺伝子として知られる Ras を含む疾患関連タンパク質が 20 個以上含まれていた。モデルケースとして、発がん性 RasG12V 変異体を選出したところ、RasG12V も UBL3 による翻訳後修飾によってエクソソームへの輸送量が増大し、このエクソソームを培養細胞へ投与すると、取り込まれた細胞において細胞内シグナルが増大した。UBL3 を結合させた緑色蛍光タンパク質やビオチンタンパク質は、細胞培養液中の細胞外小胞 (エクソソーム) に濃縮している事が分かった。以上の事から、我々が見出した UBL3 による新規翻訳後修飾が特定タンパク質のエクソソームへの輸送を制御する事が分かり、新たなタンパク質の輸送システム開発としての応用性があることが示された(Ageta et al., Nat Commun 2018, Cell Mol Life Sci 2019)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroshi Ageta and Kunihiro Tsuchida	4. 巻 76(24)
2. 論文標題 Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences,	6. 最初と最後の頁 4829-4848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-019-03246-7.	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 上田洋司、土田 邦博	4. 巻 8月91巻4号
2. 論文標題 ユビキチン様タンパク質とエクソソームへのタンパク質輸送制御機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学みにれびゅう	6. 最初と最後の頁 514-518
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 Hitachi K, Nakatani M, Takasaki A, Ouchi Y, Uezumi A, Ageta H, Inagaki H, Kurahashi H, Tsuchida K.	4. 巻 20(3)
2. 論文標題 Myogenin promoter-associated lncRNA Myoparr is essential for myogenic differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e47468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201847468	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 Ageta H, Ageta-Ishihara N, Hitachi K, Karayel O, Onouchi T, Yamaguchi H, Kahyo T, Hatanaka K, Ikegami K, Yoshioka Y, Nakamura K, Kosaka N, Nakatani M, Uezumi A, Ide T, Tsutsumi Y, Sugimura H, Kinoshita M, Ochiya T, Mann M, Setou M, Tsuchida K.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 A novel UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06197-y	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 土田邦博、上田洋司
2. 発表標題 新たなユビキチン関連分子による翻訳後修飾とエクソソーム分泌経路に関する細胞内オルガネロスタシスの解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Ageta and Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 Characterization of a novel ubiquitin-like post-translational modification factor for the protein sorting to exosomes
3. 学会等名 EMBO Workshop, The ubiquitin system: Biology, mechanisms and roles in disease（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ageta, Natsumi Ageta-Ishihara, Keisuke Hitachi, Takanori Onouchi, Hisateru Yamaguchi, Yusuke Yoshioka, Nobuyoshi Kosaka, Tomihiko Ide, Makoto Kinoshita, Takahiro Ochiya, Mitsutoshi Setou, Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 A novel UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles
3. 学会等名 ISEV2019, Symposium session EV Biogenesis II（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ageta, Natsumi Ageta-Ishihara, Keisuke Hitachi, Takanori Onouchi, Hisateru Yamaguchi, Yusuke Yoshioka, Nobuyoshi Kosaka, Tomihiko Ide, Makoto Kinoshita, Takahiro Ochiya, Mitsutoshi Setou, Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 A novel UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles
3. 学会等名 The International Society for Extracellular Vesicles（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田洋司、上田(石原)奈津実、常陸圭介、山口央輝、吉岡祐亮、小坂展慶、木下専、落谷孝広、瀬藤光利、土田邦博
2. 発表標題 新規翻訳後修飾因子UBL3によるエクソソームへのタンパク質輸機構
3. 学会等名 第10回日本RNAi研究会・第5回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 機能性タンパク質を介する細胞間コミュニケーションを活発化する若しくは抑制する剤、抗体又はアプタマー及び該剤をスクリーニングする方法、並びに、融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする核酸、	発明者 瀬藤光利、上田洋司、土田邦博	権利者 学校法人藤田学園、株式会社プレパーズ
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/033323	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 機能性タンパク質を介する細胞間コミュニケーションを活発化する若しくは抑制する剤、抗体またはアプタマー及び該剤をスクリーニングする方法	発明者 瀬藤光利、上田洋司、土田邦博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-158685	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする核酸、組み換えベクター、形質転換された宿主細胞、エキソソームの機能調節剤、及びエキソソーム	発明者 瀬藤光利、上田洋司、土田邦博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-158686	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

藤田医科大学 総合医科学研究所 難病治療学研究部門 <a href="http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/">http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/</a>
--

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------