

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22413

研究課題名（和文）細胞外タンパク質品質管理システムの実証と研究基盤創出

研究課題名（英文）Research and development of extracellular protein quality control system

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、新しいタンパク質分解システムの基盤創出に挑戦した。そのために細胞外の変性タンパク質を細胞が取り込みリソソーム分解するにしたがって細胞内に赤色蛍光が蓄積して検出するシステムを構築した。このアッセイ法を駆使することで、これまで主に知られていた細胞内タンパク質分解システムを超えて、ほ乳類の血液内にあたる細胞外にも異常タンパク質が存在すると選択的に分解へ導くシステムが存在することの実証に成功し、さらに細胞外シャペロンが細胞膜表面のヘパラン硫酸受容体が働く分子機構の一旦も明らかとすることに成功した（Itakura et al., JCB 2020）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの成果は、細胞内だけでなく細胞外にも選択的なタンパク質分解システムが存在していることを明らかとしたことで、細胞外タンパク質の恒常性を維持するため細胞外タンパク質品質管理システムがはたらくことがわかった。未開拓なこの分野を新規の学術分野として今後発展させることで、日本の学術研究に大きなフロンティア的意義をもつ。また同定した細胞外タンパク質分解システムは基質の一つとしてアルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイドを分解することが可能であるため、タンパク質蓄積疾患治療への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we challenged to develop a fundamental research for novel protein degradation system. We constructed an assay system to measure extracellular protein degradation by detection of accumulation of RFP into lysosome. Using the novel assay system, we revealed a protein quality control system in blood in mammal, which degrades abnormal extracellular proteins with extracellular chaperone. We further found that heparan sulfate functions as a receptor for the degradation system. These results indicate that there is a protein control system in extracellular region (Itakura et al., JCB 2020).

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 シャペロン 細胞外タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は合成過程において折りたたみに誤りが生じる場合や、遺伝子変異、ストレスを受けると変性する。また、構造上凝集性タンパク質も存在する。変性した異常タンパク質の蓄積は神経疾患などを引き起こす要因となる。例えば、異常型プリオンタンパク質や、シヌクレイン、異常伸長ポリグルタミン配列を持つタンパク質は細胞内に蓄積し、それぞれプリオン病、パーキンソン病、ポリグルタミン病の原因となる。また、細胞外に蓄積するアミロイドはアルツハイマー病の原因となることが知られている。生物は異常タンパク質を認識して除去する機構が備わっており、その機構を利用した疾患関連異常タンパク質を除去する方法の開発は疾患治療につながる。なかでも細胞内における異常タンパク質の分解経路ユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー・リソソーム系については研究が進展している。

細胞内のタンパク質が分解によって品質管理されていることはわかってきたが、ほ乳類ではタンパク質は細胞内だけにとどまらず、細胞外、つまり血液や体液にも潤沢に存在し機能する。細胞外環境は、細胞内と同様、熱ストレスや酸化ストレス、病理状態の影響を受けることに加え、せん断応力カストレス、細胞外 pH の変化によるダメージも受けるため、タンパク質がより変性しやすい過酷な環境といえる。しかしながら、細胞外におけるタンパク質品質管理システムの研究やタンパク質分解経路の理解は乏しい。

2. 研究の目的

細胞外タンパク質の品質管理については、細胞外シャペロンと呼ばれる数種類のタンパク質が関わっていることが幾ばくかの研究から報告されている。細胞外シャペロンのひとつである Clusterin はストレスを受けたタンパク質に結合する。しかし一般に細胞外では ATP 濃度が低く、細胞外シャペロン自体が ATP 分解活性をもたない為、変性タンパク質は再折りたたみされない。故に、Clusterin は変性タンパク質に結合することで安定化させ、凝集体化を防いでいると考えられてきた。我々は細胞内タンパク質分解システムからの知見を発展させ、細胞外シャペロンと結合した基質が細胞表面受容体を介して細胞内に選択的に取り込まれ、エンドサイトーシスによって分解される、細胞外タンパク質分解経路を探索した。

3. 研究の方法

・細胞外タンパク質取込みアッセイの開発

我々は細胞外シャペロンとして Clusterin に着目し、まず Clusterin-基質複合体がエンドサイトーシスを介してリソソーム分解されるかを調べるために、Clusterin に蛍光タンパク質の RFP (赤) と GFP (緑) をタンデムに結合させた融合タンパク質 (Clusterin-RG) を作成した。GFP はリソソーム内で分解されその蛍光を失うが、RFP はプロテアーゼ耐性能が高いためリソソーム内においても赤色の蛍光を保つ。その為、Clusterin-RG が細胞に取り込まれ、リソソームまで輸送されると、赤色の蛍光のみが細胞内に残る。Clusterin-RG を高発現するほ乳類培養細胞から、その培養上清に含まれる分泌された Clusterin-RG タンパク質を精製した。Clusterin が結合する基質となりうる変性タンパク質のモデルとして、ホタルルシフェラーゼ (Luciferase) を用いた (図 1A)。ルシフェラーゼは 42 の熱ストレス下では構造的に不安定となり容易に変性するからである。免疫沈降によって Clusterin とルシフェラーゼの熱ストレス依存的結合が確認できた。次に精製タンパク質をほ乳類培養細胞の培養培地に加え、一定期間細胞培養した後、細胞内の蛍光値をフローサイトメーターで測定した。その結果、Clusterin-RG とルシフェラーゼの混合液を加熱後に加えると、細胞あたりの RFP 蛍光値が顕著に増加した (図 1B)。すなわち、リソソームによる Clusterin-基質 (変性タンパク質) 複合体の取込み分解が確認できた。細胞を蛍光顕微鏡で観察してみると細胞表面に GFP が蓄積していたことから、Clusterin-RG は未知の細胞膜上受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることが示唆された。

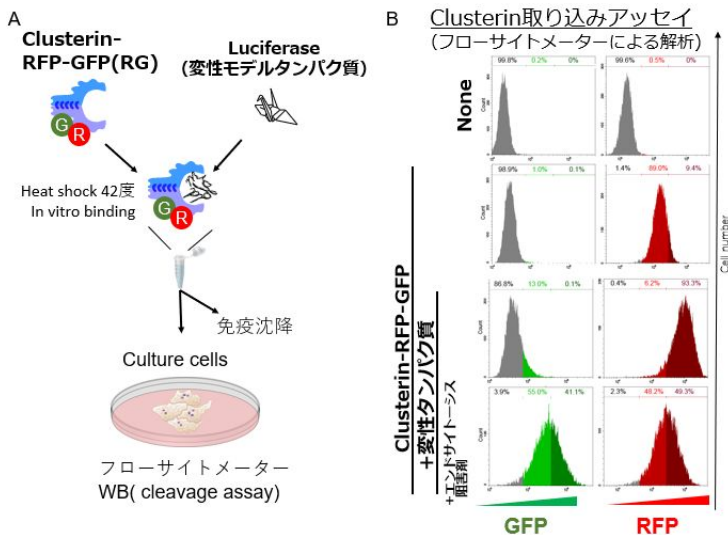


図 1 細胞外シャペロン Clusterin による取込みアッセイ法

ルシフェラーゼ (Luciferase) を用いた (図 1A)。ルシフェラーゼは 42 の熱ストレス下では構造的に不安定となり容易に変性するからである。免疫沈降によって Clusterin とルシフェラーゼの熱ストレス依存的結合が確認できた。次に精製タンパク質をほ乳類培養細胞の培養培地に加え、一定期間細胞培養した後、細胞内の蛍光値をフローサイトメーターで測定した。その結果、Clusterin-RG とルシフェラーゼの混合液を加熱後に加えると、細胞あたりの RFP 蛍光値が顕著に増加した (図 1B)。すなわち、リソソームによる Clusterin-基質 (変性タンパク質) 複合体の取込み分解が確認できた。細胞を蛍光顕微鏡で観察してみると細胞表面に GFP が蓄積していたことから、Clusterin-RG は未知の細胞膜上受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることが示唆された。

以上のことから、変性タンパク質に Clusterin が結合すると、その複合体が選択的にエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リソソームの分解を受けることが分かった。また、この Clusterin-基質複合体の分解は、腎臓、子宮、肺、骨、肝臓、腸などの組織由来の培養細胞で確認できたことから、普遍的な分解経路であると考えられる。

#### 4. 研究成果

・ Clusterin-変性タンパク質複合体は細胞表面へパラン硫酸受容体によって認識されて細胞内へ取り込まれる

Clusterin-基質複合体の細胞内への取り込みを担う受容体を同定するために、genome-wide CRISPR スクリーニングを行った。ヒト全遺伝子を網羅する約 6 万種の gRNA 発現ライブラリーベクターを細胞へ導入し、1 細胞あたり単一の遺伝子をノックアウトした細胞を用いて先述の Clusterin-RG 取り込み実験を行った(図 2A)。Clusterin-RG の取り込み量が抑制された細胞のみを選別し、その gRNA の標的遺伝子を調べた。スクリーニング結果は、ヘパラン硫酸の合成酵素群 (EXT1、EXTL、NDST1、B4GALT7、B3GNT6、XYLT2) が多く含まれ上位を占めていた(図 2B)。ヘパラン硫酸とは、細胞表面の糖鎖修飾の一種であり、様々な成長因子やウイルスの受容体として機能することが報告されている。実際に EXT1 または EXTL3 の欠損細胞を作製し Clusterin-RG の取り込み量を調べると、顕著にその取り込みは減少し、それぞれの遺伝子の強制発現によってレスキューされた(図 3)。その為、ヘパラン硫酸が Clusterin の特異的な受容体であると考えた。それを検証するために、ヘパラン硫酸を結合させたセファロースビーズに Clusterin を加えたプルダウン実験したところ、両者の直接結合が確認できた。また、この結合は遊離ヘパラン硫酸を加えることによって競合的に阻害された。さらに、細胞においてヘパラン硫酸の合成酵素をノックアウトさせてもエンドサイトーシス自体は阻害されないことから、ヘパラン硫酸は Clusterin 特異的な受容体であることが示唆された。

ヘパラン硫酸は負電荷をもつ硫酸基を多数持ち、成長因子やウイルスと静電相互作用により結合することが知られている。そこで Clusterin の正電荷アミノ酸がヘパラン硫酸との結合に関与すると考え、正電荷アミノ酸を非電荷アミノ酸に置換した Clusterin 変異体を作成し、取り込み実験を行ったところ、変異体の細胞内取り込み量が減少した。よって、Clusterin とヘパラン硫酸は静電相互作用を介して直接結合すると考えられた。

冒頭で述べたような疾患の原因となるタンパク質を分解できれば、疾患治療への応用も期待できる。実際に Clusterin はアミロイド に結合することが知られていることから、アミロイドも Clusterin による分解ができるかどうか調べた。

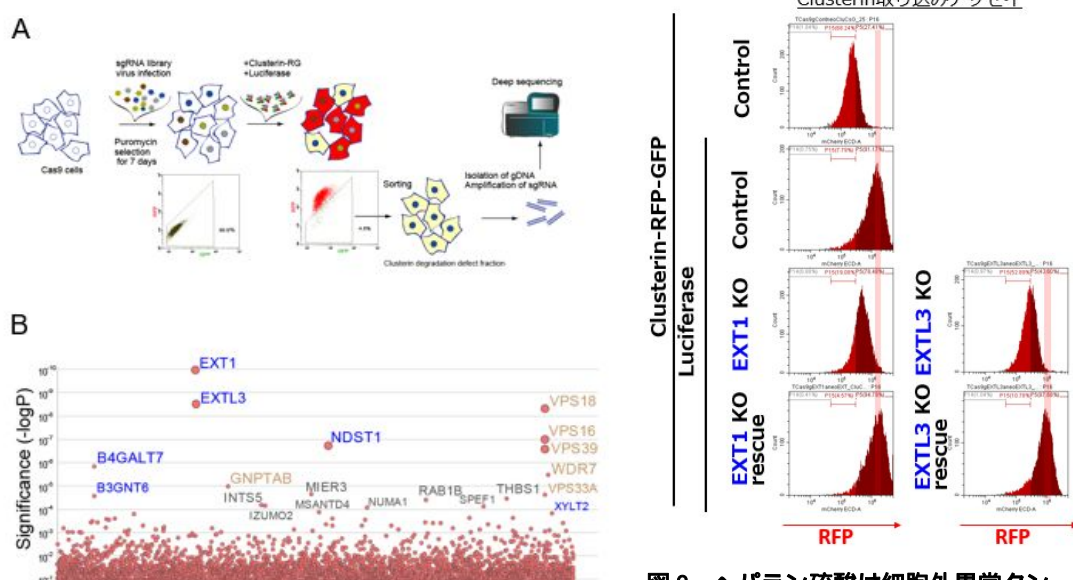


図 2 細胞外異常タンパク質分解経路に働く因子の遺伝子スクリーニング

図 3 ヘパラン硫酸は細胞外異常タンパク質分解に必要とされる

Clusterin とアミロイド を培地に加えた Clusterin-RG 取り込み実験においても取り込み分解が確認できた。Clusterin の基質として用いた Luciferase は、構造内部に高疎水性領域を持つが、変性すると外側に露出することが知られている。また、アミロイド も短い高疎水性領域を持つ。このことから、Clusterin は疎水性領域を主に認識し結合しているのではないかと考えている。

これらの結果から、細胞外に異常タンパク質が生じると、Clusterin などの細胞外シャペロンが結合し、その複合体は細胞表面受容体としてヘパラン硫酸と静電相互作用によって結合して、細胞内にエンドサイトーシスされリソソーム分解されることが分かった(図 4)。我々はこの経路を Chaperone- and Receptor- mediated Extracellular protein degradation (CRED) と命

名した。また、Clusterin 以外の細胞外シャペロンのこの経路にはたらくことが判明し、細胞外シャペロンはそれぞれ基質の認識を疎水性度に応じて使い分けられていると考えられた。その認識ドメインに関わる分子機構を解き明かすことで疾患原因タンパク質など目的基質により特異性をもつシャペロンに改変し、疾患原因タンパク質を分解する新しい治療法の確立が期待される。

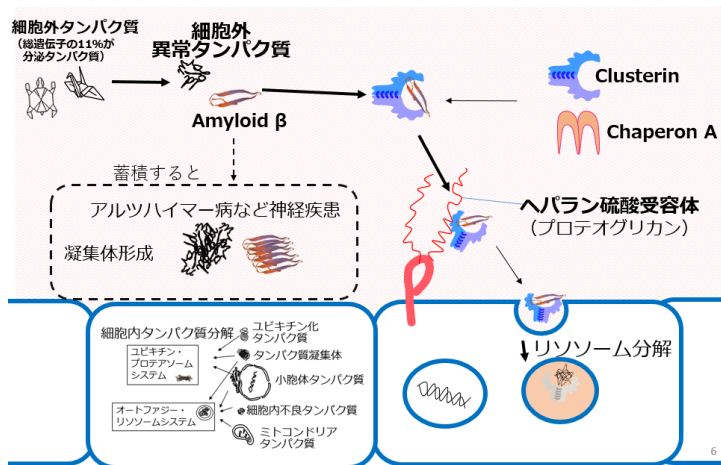


図4 細胞外異常タンパク質分解経路を同定した

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Klionsky Daniel J.,, Eisuke Itakura,, ,他著書約2300人アルファベット順記載	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2020.1797280	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 該当する

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 -
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 594
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 1586-1595
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 -
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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

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を用いたミトコンドリアストレスの検出と分子機構の解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学大会
4. 発表年 2020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除去に働くオートファジー依存的分解経路の解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉桃果、松浦彰、板倉英祐
2. 発表標題 オートファジーを制御する新規化合物の同定と解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富張彩佳、松浦彰、板倉英祐
2. 発表標題 2Mによる細胞外タンパク質分解システムの機能解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板倉英祐、千葉桃果、富張彩佳、松浦彰
2. 発表標題 細胞外タンパク質分解システムCREDの基質選択性の研究
3. 学会等名 第2回新学術領域研究「マルチモードオートファジー」班会議(オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eisuke Itakura, Momoka Chiba, Ayaka Tomihari, Akira matsuura
2. 発表標題 Discovery of extracellular protein degradation system in a blood
3. 学会等名 Japanese Association for Animal Cell Technology(JAACT)2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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 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 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 2019年第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 2019年第12回オートファジー研究会
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 2019年第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年



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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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