様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３年　６月　８日現在

機関番号：１２６０８
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2019～2020
課題番号：１９Ｋ２３７４７

研究課題名（和文）オートファジーに依存して分泌されている積荷タンパク質の網羅的プロファイリング

研究課題名（英文）Comprihensive profiling of cargo proteins secreated by autophagy

研究代表者
中村　毅（Nakamura, Tsuyoshi）

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：６０８４６３９３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,200,000円

研究成果の概要（和文）：オートファジーに依存した分泌の意義を明らかにするには、そもそもどのようなタンパク質が分泌されているのかを、網羅的に把握する必要がある。本研究では、ショウジョウバエ幼虫の体液タンパク質のプロテオームを解析し、オートファジーによって分泌されるタンパク質の網羅的プロファイルを得ることを目指した。野生型とオートファジー遺伝子欠損型の間で比較した結果、オートファジーの欠損により体液中の量が増加、あるいは減少するタンパク質を同定することができた。オートファジーは医学や創薬の分野でも着目されており、本研究は体液恒常性の維持に対するオートファジーの寄与の理解にも貢献している。

研究成果の学術的意義や社会的意義
オートファジーは細胞内の品質管理だけでなく、個体の恒常性維持においても重要な機能を担っている。しかしながら、哺乳動物におけるオートファジーの欠損は胚性あるいは新生児致死であるため、オートファジーを欠損した個体の体液を解析することはできなかった。本研究では、オートファジーを欠損しても生育できるショウジョウバエ幼虫の体液タンパク質を網羅的に解析することで、オートファジーの有無により体液中の存在量が変化するタンパク質を同定することができた。これらのプロファイルは個体の恒常性維持におけるオートファジーの役割を理解する上で基盤的なリソースとなるだろう。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the significance of secretory autophagy, comprehensive analysis of secreted cargo proteins is required. In this study, we performed quantitative proteomics of hemolymph obtained from larvae of Drosophila melanogaster and aimed to comprehensively profile hemolymph proteome. Comparing the proteome of wild-type and autophagy-deficient mutants, we identified proteins which increased or decreased in hemolymph of the mutants. Since autophagy is major concern in medical science and drag development, this study contributed to understand the effect of autophagy on body fluid homeostasis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー　分泌経路　ショウジョウバエ　体液　ヘモリンフ　タンパク質分泌　定量プロテオミクス

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

通常の分泌タンパク質は、シグナルペプチドを持ち、粗面小胞体上で翻訳された後に、ゴルジ体を経由して細胞外へと分泌される。一方で、ガレクチンやインターロイキン(IL)-Iβ のように、シグナルペプチドを持たなくても細胞外へと放出されるタンパク質も多数存在する。このような、小胞体を経由せずにタンパク質を分泌する経路は、非典型的な分泌経路と呼ばれており、そのメカニズムの１つとしてオートファジーが着目されている。

オートファジーは、２重膜構造（オートファゴソーム）により細胞質成分を隔離し、リソソームや液胞へと輸送する分解経路であるが、分泌にも寄与することが知られつつある。オートファジーに依存して分泌される積荷タンパク質としては、酵母の飢餓応答時に分泌される Acb1、哺乳動物の IL-Iβ、パーキンソン病との関連が知られる α-シヌクレインなどが報告されている (Ponpuak et al., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **35** 106-116, 2015)。このように、オートファジーに依存した分泌は、細胞の環境応答や細胞間コミュニケーション、また不要物の排出など、生物学的に重要な機能を担うと考えられている。しかしながら、この経路によりどのようなタンパク質群が細胞外へ分泌されているのか、またどのようなメカニズムで分泌されているのか、その実体はほとんど明らかにされていなかった。

オートファジーに依存した分泌の意義を明らかにするには、そもそもどのようなタンパク質群が分泌されているのかを、網羅的に把握する必要がある。しかしながら、培養細胞の実験系では、死細胞などから細胞質成分が培地上清に漏出しやすく、積荷タンパク質の網羅的解析は非常に困難である。一方、哺乳動物では、オートファジー関連（*ATG*）遺伝子を欠損させた個体は胚性致死あるいは新生児致死であるため、遺伝子欠損個体を用いた体液の解析は不可能である。よって、オートファジーに依存して分泌される積荷タンパク質を網羅的に解析するには、*ATG* 関連遺伝子を欠損させても生育可能である生物種を用いて、高感度かつ包括的に体液成分を解析する手法が求められていた。

ATG 遺伝子はショウジョウバエにも保存されており、ショウジョウバエを用いて寿命や個体の発達に対するオートファジーの寄与について研究が進められている。興味深いことに、ショウジョウバエの幼虫は *ATG* 遺伝子を欠損させても生育できるため、*ATG* 遺伝子を全身で欠損させた個体から体液を回収することができる。また、ショウジョウバエは１つの体液プールの中に組織が存在する開放血管系であるため、全身の細胞からオートファジーに依存して分泌されたタンパク質を簡便に回収し、網羅的に解析できる。

体液成分を解析するという点においては、ショウジョウバエは別のメリットも有している。体液中に分泌されたタンパク質は、体液のろ過を担う腎細胞に取り込まれ代謝される。腎細胞の発達に必要な転写因子 Klf15 を欠損させた腎細胞欠損個体は、野生型個体と遜色なく生育できるため、この個体を用いることで体液中の積荷タンパク質を濃縮し、より高感度に検出できる。

２．研究の目的

本研究では、*ATG* 遺伝子を欠損させても生育可能である、ショウジョウバエの幼虫を用いて、オートファジーに依存して分泌されている積荷タンパク質の網羅的プロファイルを得ることを目指した。さらに、得られた体液プロテオーム解析の結果と、データベースにおける各タンパク質の組織ごとの発現量を照合することで、オートファジーに依存的な分泌が活発な組織の同定を目指した。

３．研究の方法

(1) ショウジョウバエ幼虫の体液プロテオーム解析系

ショウジョウバエの体液を解析した報告や（Fernando et al., *J. Proteome Res.*, **18** 1503-1512, 2019）、共同研究者である Karen Ocorr 博士らのプロトコルを参考に（Ivy et al., *PLoS One*, **8** e67208, 2015）、オートファジーに依存して分泌される積荷タンパク質のプロテオームの解析系を構築した。

まず、リン酸緩衝液（PBS）液滴中で３齢幼虫の表皮を破いて体液を放出させ、10 匹分の体液を含んだ PBS を得た。血球細胞や組織の混入を防ぐために、3,000 *g* の穏やかな遠心分離と 0.22 μm フィルターを用いたろ過により体液の粗精製液を調整した。この粗精製液中のタンパク質をトリクロロ酢酸（TCA）で沈殿させ、アセトンで洗浄して質量分析用のタンパク質サンプルを調整した。

質量分析は京都大学の石濱泰博士と今見考志博士との共同研究で行い、タンデムマスタグ（TMT）を用いた比較定量プロテオミクスにより解析した。

(2) 体液成分を解析した系統

野生型として w^{1118} 系統を用いた。*ATG* 遺伝子欠損型としては、オートファジーの誘導を担う開始複合体の Fip200、隔離膜の膜形成に関わる Atg9、Atg8 結合系の Atg5 の遺伝子欠損型をそれぞれ用いた。また、腎細胞欠損型として転写因子 Klf15 の欠損型を用いた。

(3) 飼育条件
　オートファジーは飢餓により誘導されるため、富栄養条件および飢餓条件の個体から体液を回収した。２齢幼虫を富栄養条件のエサで 24 時間飼育した後に、新しいエサ（富栄養条件)、あるいは PBS で湿らせたキムワイプ（飢餓条件）で５時間飼育して体液を回収した。

(4) 体液タンパク質のプロファイルの解析
　各系統につき独立した３サンプルを質量分析に供し、いずれのサンプルでも検出されたタンパク質について条件間・系統間での存在量を比較した。比較の際には各サンプル中の存在量を $\log_2$ で対数化した値を用いた。

(5) ショウジョウバエ幼虫の体液メタボローム解析系
　超純粋液滴中で３齢幼虫の表皮を破いて体液を放出させ、８匹分の体液を含んだ超純水を得た。血球細胞や組織の混入を防ぐために、3,000 *g* の穏やかな遠心分離により体液の粗精製液を調整した。質量分析は東京大学の三浦正幸博士と理化学研究所の小幡史明博士との共同研究で行った。

４．研究成果
(1) 体液プロテオーム解析系の構築
　上述の方法にある解析系を構築した。

(2) 富栄養および飢餓条件における各系統の体液タンパク質プロファイルの解析
　野生型、腎細胞欠損型、オートファジー遺伝子欠損型３系統の計５系統について、富栄養あるいは飢餓条件の２条件で体液を回収した。質量分析の際には、タンデムマスタグ法でサンプル中のタンパク質を標識して解析した。
　野生型の体液サンプルからは 707 種類のタンパク質が同定された。これはショウジョウバエ幼虫の体液プロテオームを解析例と同程度のタンパク質数だったため (Hartley et al., *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **2** 119-29, 2016)、実験系が適切に機能していることが確かめられた。また、富栄養と飢餓条件で体液タンパク質のプロファイルを比較したが、いずれの系統でも２倍以上増加、あるいは減少するタンパク質は見られなかった。したがって、本研究の飢餓条件が体液タンパク質に与える影響は小さかったと考えられる。
　続いて、野生型と各種変異型で５倍以上増加したタンパク質を比較すると、腎細胞欠損型では 32 種類、*Atg9* 欠損型で７種類、*Fip200* 欠損型で９種類が見いだされた。変動したタンパク質にはキモトリプシン様プロテアーゼが多く含まれていた。

(3) 体液タンパク質プロファイルから得られた因子の解析
　体液タンパク質のプロファイルで変化が見られたタンパク質について、３齢幼虫の全身サンプルから RNA を抽出し定量 PCR で遺伝子発現量を検討した。その結果、血球細胞から体液中に分泌される NimB2 タンパク質の遺伝子発現上昇が腎細胞欠損型、*ATG* 遺伝子欠損型のいずれにおいても観察された。野生型として用いた w^{1118} 系統、および野生型として広く用いられている Oregon-R 系統のいずれにおいても *NimB2* 遺伝子はほとんど発現していなかったことから、腎細胞欠損による体液環境の変化や、オートファジーの欠損が血球細胞における転写制御に影響することが示唆された。

(4) 腎細胞欠損とオートファジーの欠損の遺伝学的関係の解析
　腎細胞欠損と *ATG* 遺伝子欠損の掛け合わせから思いがけない結果が得られた。*ATG* 遺伝子欠損型の 1 つである *Fip200[3F5]*は蛹で発育が停止するが、腎細胞欠損型 *Klf15[NN]*と掛け合わせた二重欠損型では、ほとんどの個体が幼虫で致死に至った。この二重欠損型に *Fip200* 遺伝子を入れ戻すと *Klf15[NN]*の単独欠損型と同様に成虫まで発育した。これらの結果から、体液タンパク質のろ過を担う腎細胞とオートファジーの間に遺伝学的相互作用があることが示唆された。

(5) ショウジョウバエの体液のメタボロームの解析
　オートファジーが体液ホメオスタシスに影響することが考えられたため、野生型、腎細胞欠損型、*ATG* 遺伝子欠損型３系統の計５系統について体液メタボロームを解析した。その結果、*ATG* 遺伝子欠損型３系統のいずれにおいても体液中のメチオニン代謝物の減少が見られた。

　本研究により、オートファジーに依存して分泌されている積荷タンパク質と、オートファジーによって制御されている体液代謝物の網羅的プロファイルを得ることができた。オートファジーを全身で欠損した個体の体液成分を解析した例はこれまでになく、これらのプロファイルは個体の恒常性維持におけるオートファジーの役割を理解する上で基盤的なリソースとなるだろう。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 中村毅、藤田尚信
２．発表標題 オートファジー依存的に分泌される積荷タンパク質の網羅的プロファイリング
３．学会等名 第12回オートファジー研究会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計1件

１．著者名 中村毅、藤田尚信	４．発行年 2020年
２．出版社 医歯薬出版株式会社	５．総ページ数 6
３．書名 医学のあゆみ	

〔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