

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06515

研究課題名(和文) エクソソーム局在性膜タンパク質EAAC1およびCD63の構造解析

研究課題名(英文) Structural analyses of exosome localizing membrane protein, EAAC1 and CD63

研究代表者

浜口 祐 (HAMAGUCHI, Tasuku)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：00587876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームに局在する膜タンパク質であるグルタミン酸輸送体(EAAC1)およびテトラスパニン(CD63)についてヒト細胞を利用して組換えタンパク質として発現・精製を試みた。それぞれGFP融合タンパク質として発現させ、蛍光顕微鏡下においてその発現が確認できた。このとき、培地中にエクソソームとして分泌される様子も観察することができ、発現したタンパク質がエクソソームに正しく局在している可能性が示唆された。得られたタンパク質をそれぞれクライオ電子顕微鏡で観察を試みたところ、EAAC1では目的タンパク質とみられる粒子像が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高発現系ヒト細胞(Expi293F)を用いて、EAAC1およびCD63の発現系の構築および組換えタンパク質の調製が可能であることが明らかとなった。EAAC1およびCD63はそれぞれ疾患との関りが強く、神経変性疾患やメラノーマで特異的に発現量が増えることが報告されている。このことから、これらの過剰発現細胞系がそれぞれの疾患のメカニズム解析へと貢献できる可能性を示唆している。また、重金属を利用したネガティブ染色並びにクライオ電子顕微鏡像からEAAC1については粒子が均一な構造をとっており、単粒子構造解析が可能であることを示唆するデータが得られている。

研究成果の概要(英文)：Glutamate transporter (EAAC1) and tetraspanin (CD63), membrane proteins that localize to exosomes, were expressed and purified as recombinant proteins using human cells. Each protein was expressed as a GFP fusion protein, and the expression was confirmed under a fluorescence microscope. The proteins were also observed to be secreted as exosomes into the culture medium, suggesting that the expressed proteins were correctly localized to the exosomes. The obtained proteins were observed by cryo-EM, and particle images of the target protein were obtained for EAAC1.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 グルタミン酸輸送体 テトラスパニン 単粒子構造解析 エクソソーム

### 1. 研究開始当初の背景

エクソソームはかつて細胞のゴミ箱として不要物質を細胞外に排出するための存在と考えられていたが、現在ではその役割が見直されつつある。近年エクソソームは細胞の分身として分泌され、細胞間コミュニケーションを可能とする細胞外小胞であり、近年では悪性新生物や神経変性疾患の転移、拡大にも関与していることが示唆されている。分泌されたエクソソームは血管などを通じて離れた細胞へと旅を行い、行きついた組織において元の細胞からの情報を展開し、その環境を変化させる。エクソソームには様々なタンパク質が特異的に局在していることが知られており、その多くは専用のデータベース (<http://www.exocarta.org/>) に登録されている。登録されているタンパク質の総数は日々増加をしており、現在では約1万にも迫っているが、その多くが機能・構造解析に至っていない現状である。このため、迅速な構造解析を進める必要がある。しかし、タンパク質の構造解析は主に結晶構造解析によって行われており、結晶化などの過程を経て研究が進められるため構造解析には多くの時間と労力が必要である。

一方、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析は2017年にノーベル化学賞を受賞した構造解析手法であり、その過程で結晶化などを必要とせず、精製したタンパク質試料溶液から直接構造解析を進められる。溶液状態で瞬間凍結し、非晶質の氷の中に試料を閉じ込めることから本来の環境に近い状態で構造解析できることもメリットの一つである。一般的に膜タンパク質では結晶化プロセスで困難が付きまとうことが多く、クライオ電子顕微鏡を利用した構造解析を進めるメリットは非常に大きいと言える。

### 2. 研究の目的

本研究課題ではエクソソームに局在することが明らかとなっている膜タンパク質、特にグルタミン酸輸送体(EAAC1)およびテトラスパニン(CD63)に着目し、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を目指す。グルタミン酸輸送体は神経間隙に放出された神経伝達物質の一つであるグルタミン酸の取り込みに関与しており、グルタミン酸が有する細胞へのダメージを抑える働きがある。また、同ファミリーに属する他のグルタミン酸輸送体とは異なり、グルタミン酸以外にシステインの輸送も行えるとの報告がある(DOI: 10.1371/journal.pone.0109245)。このことから、EAAC1の高分解能構造解析によるグルタミン酸・システイン輸送メカニズムの解明は非常に興味深い。一方CD63は4回膜貫通タンパク質であるテトラスパニンスーパーファミリーの1つであり、エクソソーム膜上で他の様々なタンパク質と相互作用し機能を制御していると考えられている。その標的は多岐にわたり、またCD63自身も複合体を形成し、膜上でマクロドメインを形成するとされている。また、その発現量が悪性新生物の悪性度、転移とも相関があるとの報告もある。これらエクソソームに局在する膜タンパク質の発現系の構築、精製手法の確立およびクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行うことで、各タンパク質の構造機能相関を明らかにするとともに、各疾患への分子標的創薬を加速させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

EAAC1 おおび CD63 遺伝子を導入した発現プラスミドを作成し、ヒトおよび酵母細胞での発現を試みた。ヒト細胞(HEK293GnTIおよび Expi293GnTI)を用いた発現系ではN末あるいはC末に精製用タグとして Strep-tag あるいは FLAG タグを付加した。さらに、細胞内での発現および局在を検出するため、EGFP を融合タンパク質として発現させた。発現プロモーターには CMV プロモーターを利用した。一過性発現系としての発現は蛍光顕微鏡下で細胞内の EGFP 蛍光を検出することで、トランスフェクション効率と発現量の推定を行った。トランスフェクションに使用する DNA 量、トランスフェクション時間など目的タンパク質発現量の改善を目指し、検討を行った。

発現した EAAC1 おおび CD63 について細胞を回収し、超音波処理および超遠心によって膜画分を回収した。得られた膜画分について -DDM, LMNG を含む種々の界面活性剤による可溶化条件の検討を行った。併せて、Strep-tag おおび FLAG タグを利用した精製カラムクロマトグラフィーを行い、標的タンパク質の収量と純度を SDS-PAGE おおび Western-Blotting で確認した。試料の均一性については Superdex 200 increase を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって確認を行った。各精製標品についてスピンカラム限外ろ過を用いて濃縮を行い、電子顕微鏡観察に供した。

濃縮サンプルの電子顕微鏡観察について、酢酸ウランを用いたネガティブ染色によって粒子の均一性について評価した。カーボン膜上に塗布したサンプルを染色液で染色を行った。作成したマイクログリッドの観察については JEM-2100 おおび OneView カメラを用いて行った。EAAC1 について 1mg/ml まで濃縮を行い、クライオ電子顕微鏡観察へと進めた。Quantifoil holey carbon grid に Au スパッタリングを行い、Carbon 膜表面を加工したのちに、急速凍結用 Plunger (Vitrobot) のチャンバー内において試料を滴下、Blotting を行い、液体エタンを用いて急速凍結を行った。作成したマイクログリッドは CRYOARM300 (理研・SPRING-8) おおび CRYOARM300II (東北大・多元研) を用いてそれぞれ観察を行った。検出器については K3 検出器を用い、SerialEM を使用

した Image shift 高速撮影によってデータを収集した。得られた画像データについては画像解析ソフトウェア (RELION) を用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

メタノール資化酵母である *Pichia pastoris* をもちいた発現系では EAAC1 および CD63 いずれもその発現を認めることは出来なかった。このため、動物細胞である HEK293 およびその高発現細胞株である Expi293 を用いてタンパク質の発現を試みた。その結果、EAAC1 および CD63 のいずれも EGFP 融合タンパク質として発現させ、融合した GFP 蛍光像として組換えタンパク質の発現が認められた。この時、EAAC1 では N 末にタグ及び EGFP を付加するとその局在が細胞中に広がったことから *paac1* 遺伝子の下流に *egfp* 遺伝子を融合させたものを使用した。その結果、両遺伝子産物について Figure.1 に示すように細胞膜に局在した形で発現が確認できた。また、この時 EAAC1 発現 HEK293 では Figure 2. に示すように細胞外に蛍光で標識された小さな小胞が排出される様子が確認できた。これらのことから、EAAC1 ならびに CD63 発現細胞では組換えタンパク質はいずれも細胞膜に局在しており、標的であるエクソソームにも正しく局在していることが示唆された。得られた細胞よりこれらタンパク質の精製を試みたところ、Strep-Tag 融合タンパク質では Streptactin カラムに吸着が認められず、付加したタグが Folding の過程で内側に折りたたまれて露出していない可能性が示唆された。このため、これ以降の解析には FLAG タグを付加した発現系を用いた。得られた細胞から膜画分を調製し、様々な界面活性剤で可溶化を行ったところ、EAAC1 では -DDM 存在下で、CD63 では LMNG 存在下で最も高い可溶化効率を示したことから、可溶化、精製にはそれぞれの界面活性剤を選択した。-DDM および LMNG は CMC 濃度が低く、クライオ電子顕微鏡観察において有利であると考えられている。得られた可溶性画分について、Anti-FLAG カラムクロマトグラフィーによって精製を行った。吸着後に 3xFLAG ペプチドを用いて溶出を行い、精製 EAAC1 および CD63 画分を得た。それぞれの検出には Anti-FLAG 抗体および抗マウス抗体を用いた Western blotting を行った (Figure 3.)。FLAG 溶出画分を濃縮し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって過剰な FLAG ペプチドを分離するとともに、会合状態の推定と、均質性について評価を行った。EAAC1 ではシングルピークとして検出されたが、CD63 ではややブロードなピークとして検出されたことから、CD63 はランダムな会合状態をとっている可能性が示唆された。精製した各タンパク質画分についてネガティブ染色による分子

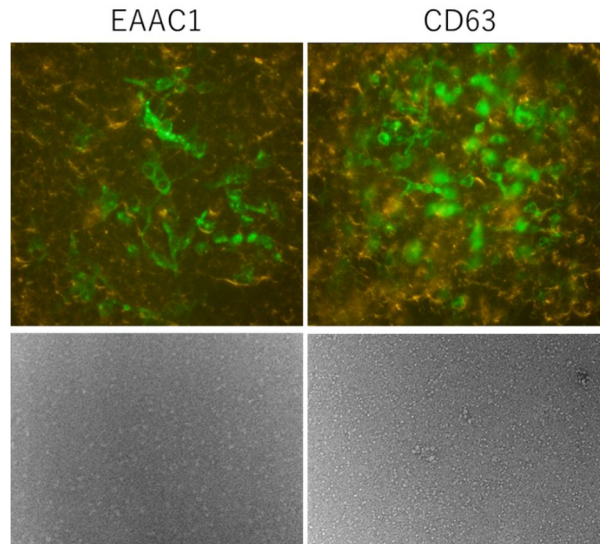


Figure 1. EAAC1 および CD63 のヒト細胞 HEK293 内での発現と、精製試料のネガティブ染色電子顕微鏡像。

Figure 2. EAAC1 発現細胞で確認された細胞外小胞が分泌されたと思われる様子。

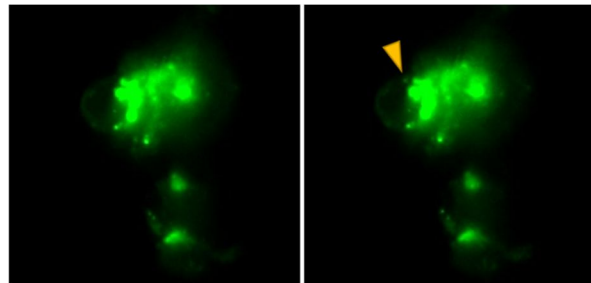


Figure 2. EAAC1 発現細胞で確認された細胞外小胞が分泌されたと思われる様子。

Figure 3. EAAC1 の FLAG 精製

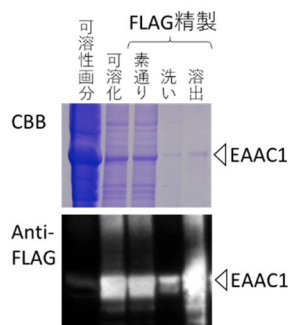


Figure 3. EAAC1 の FLAG 精製

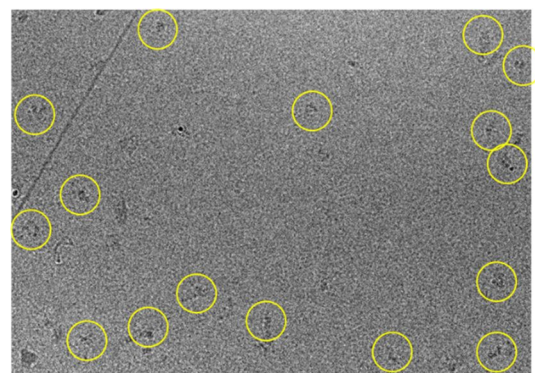


Figure 4. EAAC1 のクライオ電子顕微鏡像。0.495Å/pixel の条件で撮影を行った。

像の確認を行ったところ、EAAC1 では過去に報告されている三量体に相当する大きさの均一な分子増が確認できた(Figure 1. 左下)。一方で、CD63 では大きく会合した粒子像が見られ、またその周囲には無数の小さな粒子が見られた(Figure 1. 右下)。これは使用した LMNG が大きなミセルを形成するため、濃縮過程で LMNG 自身も濃縮されたためではないかと考えられた。また、CD63 の会合状態は不均一であり、単粒子構造解析には適さないのではないかと考えられた。EAAC1 について濃縮条件の検討を行ったところ、精製時の 3 倍濃度の界面活性剤存在下で 1mg/ml まで濃縮が可能であることが明らかとなった。得られた試料をクライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析に供した。クライオ電子顕微鏡像では粒子像が認められ、粒子径などは分子量から想定される EAAC1 の大きさ程度で揃っているものと考えられた(Figure 4)。しかし、気相界面との相互作用が界面活性剤によって阻害されることで、視野内に確認できる粒子数が少なく、現在までにクライオ電子顕微鏡像では構造決定に必要な粒子数を撮影するには至っていない。しかし、撮影枚数の蓄積とデータの統合、あるいは酸化 Graphene 膜などを利用したグリッド作成により改善できる可能性が考えられる。現在においても引き続きデータ収集を継続しており、本プロジェクトによって研究を発足させた EAAC1 および CD63 の構造解析を完了させる予定である。

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 Tasuku Hamaguchi, Keisuke Kawakami, Saori Maki-Yonekura, Koji Yonekura
2. 発表標題 High-resolution single-particle cryo-EM analyses with a CFE electron beam
3. 学会等名 第 59 回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------