

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15121

研究課題名(和文)脂質修飾によるトランスグルタミナーゼの exosome 依存的な分泌機構解明

研究課題名(英文) Unconventional secretion mechanism of transglutaminase involving exosomes and two types of fatty acylations

研究代表者

柴田 俊生 (Shibata, Toshio)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：00614257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の架橋反応を触媒するトランスグルタミナーゼ(TG)は、皮膚形成や血液凝固、細胞内シグナル伝達など細胞内外の恒常性維持に必須の酵素である。哺乳類には8種類のTG遺伝子が異なる局在と役割を果たしている。一方で、キイロショウジョウバエでは1種類の遺伝子のみで細胞内外で発現機能している。しかしながら、分泌に必要なN末端分泌シグナル配列はハエTGには存在しておらず、分泌の機構は不明であった。本研究により、ハエTGの一種であるTG-Aが脂質修飾依存的に後期エンドソームと呼ばれる細胞内小器官へと輸送され、エクソソーム中に分泌されることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の脂質修飾は、シグナル伝達因子の形質膜への局在化や活性の調節などの役割を担っている。一方、本修飾が引き起こすタンパク質の分泌に関する知見は数例が報告されているのみである。本研究により明らかにされた脂質修飾依存的な、新規エクソソーム分泌機構により、TGのみならず、エクソソーム分泌の研究分野が発展することが期待される。またTGは、肝疾患、癌、血栓形成、セリアック病などの原因にもなる。一部の疾患発症の際には、未知の機構でTGの分泌量が上昇しており、疾患発症の関係が指摘されている。また、エクソソームも炎症、癌の転移など様々な疾患に関わっているため、TG関連疾患の解明の一助となる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Transglutaminases (TGs) play essential intracellular and extracellular roles by covalently cross-linking many proteins. *Drosophila* TG is encoded by one gene and has two alternative splicing-derived isoforms, TG-A and TG-B. The TGs identified to date do not have a typical signal peptide for secretion, and the molecular mechanisms of their secretion under physiologic conditions are unclear. We found that TG-A, but not TG-B, was modified concomitantly by N-myristoylation and S-palmitoylation. Moreover, TG-A, but not TG-B, was secreted in response to a pathogenic bacteria-derived substance. Inhibitors of the conventional pathway did not suppress TG-A secretion, whereas inhibition of S-palmitoylation blocked TG-A secretion. Ultracentrifugation, electron microscopy analyses revealed that TG-A was secreted via exosome, and the secreted TG-A was taken up by other cells. In conclusion, TG-A is secreted through an unconventional pathway involving two types of fatty acylations and exosomes.

研究分野：生化学

キーワード：トランスグルタミナーゼ 脂質修飾 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の架橋反応、いわば「糊付け反応」を触媒するトランスグルタミナーゼ (TG) は、皮膚形成や血液凝固、細胞内シグナル伝達などに関わる生体に必須の酵素である。私たちはこれまでに、キイロショウジョウバエ TG の機能解析を行ってきており、腸管免疫や外骨格形成など、細胞内外で複数の生理機能を果たしていることを見出してきた。一方でハエ TG は分泌に必要な情報である「分泌シグナル配列」を有しておらず、発現局在変化の機構は不明であった。本研究では、培養細胞およびハエ個体を用いた実験から、TG 分泌の分子機構と分泌型 TG の生理的意義を解き明かすことを目的とした。

2. 研究の目的

哺乳類には構造の異なる 8 種類の TG が存在しており、それぞれが異なる組織で種々の機能を果たしている。一方で、キイロショウジョウバエの TG は、ゲノム中に 1 種類しかコードされていない。これまでの研究によりハエ TG は、細胞外においては外骨格形成や腸管内腔のムチン様バリア構造の安定化に寄与すること、一方で、細胞内では腸管上皮細胞の情報伝達因子 (NF- κ B) の制御を行い、腸内細菌に対する免疫寛容性を生み出すことを見出した。このように、TG は細胞内・外で機能しているが、その N 末端には一般的な分泌シグナル配列は存在しておらず、長らくハエ TG の細胞外分泌の分子機構は不明であった。一方で、前述のように、TG の遺伝子はゲノム上に 1 種類しか存在しないが、選択的スプライシングにより、TG-A および TG-B の 2 種類のバリエーションが生成されることを見出した。全体の約 95% のアミノ酸配列は共通であるが、N 末端のみ異なる配列を有する。両者の内、TG-A の N 末端部分には脂質修飾が施され、これによる細胞内局在変化が起こる可能性が見出された。本研究では、培養細胞およびハエ血球を用いた実験から、TG の分泌機構と生理機能を解き明かすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TG-A の脂質修飾の確認

TG-A の脂質修飾は、標識済みの脂質を TG-A の発現した培養細胞に添加することで確認を行った。細胞を溶解し、標識脂質が取り込まれた TG-A を電気泳動により確かめた。さらに、脂質修飾が施される部位の変異体や、脂質修飾阻害剤を用いて、同様の実験を行った。

(2) TG-A の細胞内局在の確認

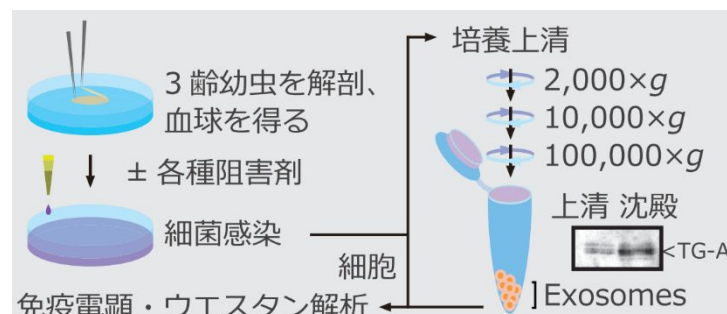
抗 TG-A 抗体を用いた免疫蛍光染色後に顕微鏡観察を行い、分泌される前の細胞内の局在を確認した。

(3) TG-A の分泌確認

他の研究グループにより、分泌された TG-A は感染微生物の包囲化と排除に関与することが報告されている。そこで、TG-A を発現した培養細胞やハエ血球に細菌を感染させ、その分泌を電気泳動により確認した。さらに (1) と同様、変異体や阻害剤を用いて、その際の分泌の有無も確認した。

(4) 分泌された TG-A の物性解析

分泌された TG-A は脂質と相互作用していることが推定されたので、超遠心分画を行うことにより、その比重を確認した。その結果、細胞外ナノ小胞であるエクソソーム中に内包された状態で分泌されることを見出した (下図参照)。また電子顕微鏡により、分泌される前の TG-A の細胞内局在を確認した。



(図) 血球を用いたエクソソームの実験方法の一例を示す。エクソソームは細菌感染の刺激によって分泌されることが判明した。そこで、分泌を促した後、培養上清を段階的に遠心処理する。エクソソームは脂質の膜から構成される微細な小胞であるため、最終的に超遠心処理後の沈殿画分に得られる。この画分を用いて、電気泳動や顕微鏡観察を行った。

4 . 研究成果

本研究では、TG は選択的 RNA スプライシングにより 2 種類の産物 (TG-A および TG-B) が産生されることに着目した。まず標識脂質を用いた実験により、TG-A の N 末端部分には、2 種類の脂質修飾 (N-ミリストイル化および S-パルミトイル化) を受けることを明らかとした。また、顕微鏡観察により、TG-A は両脂質修飾依存的に後期エンドソームと呼ばれる細胞内オルガネラへと輸送されること、加えて、細菌感染など外来の刺激に応じ、細胞外小胞であるエクソソームに内包された状態で分泌されることが判明した。TG-A のように脂質修飾された細胞内生理機能タンパク質がエクソソームを介して分泌されるという報告は皆無であり、既知の分泌シグナルによらない新たなタンパク質分泌についての研究分野発展につながると考える。現在は同様のシステムで分泌されるタンパク質のスクリーニングおよび後期エンドソームへの輸送機構を解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toshio Shibata, Shun-ichiro Kawabata	4. 巻 163
2. 論文標題 Pluripotency and a secretion mechanism of Drosophila transglutaminase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 165-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvx059	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 Toshio Shibata, Jinki Hadano, Daichi Kawasaki, Xiaoqing Dong, Shun-ichiro Kawabata	4. 巻 292
2. 論文標題 Drosophila TG-A transglutaminase is secreted via an unconventional Golgi-independent mechanism involving exosomes and two types of fatty acylations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10723-10734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.779710	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8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Toshio Shibata, Jinki Hadano, Daichi Kawasaki, Xiaoqing Dong, and Shun-ichiro Kawabata
2. 発表標題 Drosophila transglutaminase is secreted via an unconventional pathway involving exosomes and two types of fatty acylations
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Transglutaminases in Human Disease Processes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshio Shibata, Shun-ichiro Kawabata
2. 発表標題 Drosophila transglutaminase-A is secreted via an unconventional pathway involving two types of fatty acylations and exosomes
3. 学会等名 BIT's 8th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田俊生、榎光輝、川畑俊一郎
2. 発表標題 キイロショウジョウバエを用いたトランスグルタミナーゼ (TG) の生理機能と分泌機構の解明
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田俊生、羽田野仁喜、川崎大地、Dong Xiaoqing、川畑俊一郎
2. 発表標題 脂質修飾とエクソソームを介したショウジョウバエトランスグルタミナーゼの分泌機構
3. 学会等名 日本比較免疫学会第29回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田俊生、羽田野仁喜、川崎大地、董曉晴、川畑俊一郎
2. 発表標題 エクソソームを介したショウジョウバエトランスグルタミナーゼの細胞外分泌機構
3. 学会等名 第28回日本生体防御学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田俊生
2. 発表標題 キイロショウジョウバエを用いたトランスグルタミナーゼの機能解明
3. 学会等名 平成29年度日本生化学会九州支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshio Shibata, Koki Maki, Takumi Fujikawa, Shun-ichiro Kawabata
2. 発表標題 Transglutaminase-catalyzed crosslinking of peritrophic matrix proteins maintains the gut epithelial immunity in Drosophila
3. 学会等名 Entomology 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田俊生
2. 発表標題 キイロショウジョウバエを用いたトランスグルタミナーゼの生理機能と分泌機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学プレスリリース http://www.kyushu-u.ac.jp/f/30483/17_05_17.pdf
--

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	榎 光輝 (Maki Kouki)	九州大学・システム生命科学府・大学院生 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	董 暁晴 (Dong Xiaoqing)	九州大学・システム生命科学府・大学院生 (17102)	
研究協力者	川崎 大地 (Kawasaki Daichi)	九州大学・システム生命科学府・大学院生 (17102)	