

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03249

研究課題名（和文）血液内変性タンパク質分解経路の生理的役割の解明

研究課題名（英文）Analysis of physiological roles of protein degradation pathways in blood

研究代表者

板倉 英祐（Itakura, Eisuke）

千葉大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：90754218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題の進展により、様々なタンパク質品質管理機構の一端を明らかにした。ミトコンドリアストレスを引き起こす様々な化合物の同定、オートファジーに関する分子機構の解明、細胞外タンパク質分解システムのアッセイ方法の確立、 $\alpha$ 2マクログロブリンが異常細胞外タンパク質の分解に関わることを解明し、それぞれの成果は、J. Biol. Chem.、Cell Death Discovery、MBoC、Star Protocols、Scientific Reportsに論文発表した。さらに、新しい細胞外シャペロンCRED1,2を同定し、今後の細胞外タンパク質分解システムの土台を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、異常なタンパク質が細胞内や細胞外に生じた場合に異なるメカニズムによって、認識され、分解へ導く、その機構の一端を明らかにした。異常タンパク質は形、場所、時期など異なり、それぞれの応じたタンパク質品質管理がはたらくことで、生体内の恒常性を保つことがわかった。特に細胞外のタンパク質分解系の重要性が示唆され、今後更なるタンパク質品質管理システムの詳細な機構の解明や、タンパク質蓄積疾患への応用へと期待される。

研究成果の概要（英文）：The progress of this research project has revealed some aspects of various protein quality control mechanisms, including the identification of various compounds that induce mitochondrial stress, elucidation of molecular mechanisms related to autophagy, the degradation of abnormal extracellular proteins by  $\alpha$ 2-macroglobulin. The results of these studies have been published in J. Biol. Chem., Cell Death Discovery, Molecular Biology of the Cell, Molecular Biology of the Cell, Star Protocols, and Scientific Reports. Furthermore, we identified novel extracellular chaperones CRED1&2 and established the foundation for future extracellular protein degradation systems.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：タンパク質分解 細胞外タンパク質 異常タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内のタンパク質は合成されて細胞内外で働くことが重要である。しかし1度合成されたタンパク質が一生涯にわたり働き続けるわけではない。ほ乳類におけるタンパク質の寿命は平均して数日程度であり、実際にタンパク質は常に代謝回転している。その過程において異常なタンパク質が生じる場合がある。内因的な遺伝子変異による異常なタンパク質の生産や、外因的なストレスによるタンパク質により構造変化し、変性する。また生得的に構造上凝集性のタンパク質も存在する。変性した異常タンパク質が蓄積すると、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。これを防ぐため、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。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空間だけにとどまらず、細胞外空間、つまり血液など体液にも潤沢に存在し機能する。細胞外環境は、細胞内より変化が大きいので、ダメージを受けやすく、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分解経路は、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いくつかの研究から報告されている。私はこれまでの研究から細胞外シャペロンのひとつである Clusterin がストレスを受けたタンパク質に結合し、Clusterin と変性タンパク質複合体が細胞内に選択的にエンドサイトーシスされ、リソソーム分解へ導かれることを明らかにした。本研究課題では Clusterin 以外の細胞外シャペロンに着目し、細胞外タンパク質分解経路の開拓を進めた。また、これまでのオートファジーを中心とした細胞内タンパク質分解の分子機構の研究を基にした、オートファジーによる細胞内選択的タンパク質分解の解析も進めた。

### 3. 研究の方法

細胞外シャペロン-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、細胞外シャペロンに蛍光タンパク質の RFP (赤) と GFP (緑) をタンデム (RG) に結合させた融合タンパク質を作成し、エンドサイトーシス量を定量解析する方法を開発した (図1) (STAR Protocols, 2021)。

細胞外シャペロン-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細胞外シャペロン-RG タンパク質を精製した。精製した細胞外シャペロンと変性タンパク質をほ乳類培養細胞の培養培地に加え、1晩細胞培養した後、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、細胞あたりの RFP 蛍光値が変性タンパク質の存在下で増加した。この系を用いて、様々な細胞外シャペロンの取り込み活性を調べることが可能となった。

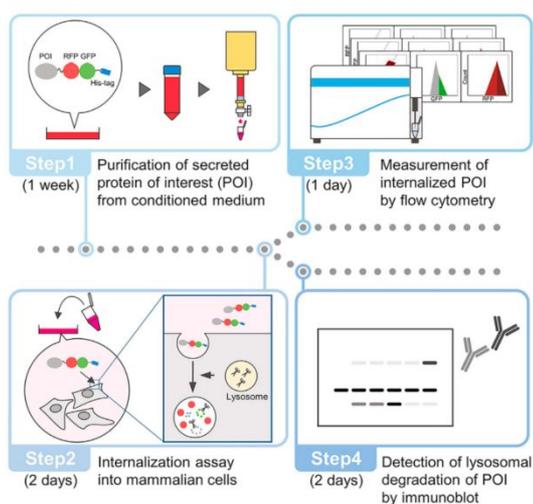


図1 細胞外シャペロンの取り込みアッセイ

### 4. 研究成果

これまでの結果から、細胞外に異常タンパク質が生じると、Clusterin 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 (Itakura et al., JCB 2020)。我々はこの経路を Chaperone- and Receptor- mediated Extracellular protein degradation (CRED) と命名した。細胞外シャペロンの多様性を探索するため、他の細胞外シャペロン 2-macroglobulin (a2M) に着目した。a2M に RG を結合させた a2M-RG をほ乳類培養細胞の培地から回収・精製した。細胞質タンパク質群に熱ショックを与えた変性タンパク質と共に a2M-RG を HeLa

細胞の培地に添加し、エンドサイトーシスによる取込み量を調べた。その結果、a2M-RG は変性タンパク質の存在下にて、細胞内への取り込みが増加した（図2）。同様の細胞を、蛍光観察したところ、RFPのシグナルはリソソームマーカーと共局在したため、a2M-変性タンパク質複合体はエンドサイトーシスされてからリソソーム分解を受けることが示唆された。

a2Mが結合する変性した細胞質タンパク質を同定するため、熱ショックした細胞質タンパク質と混合した a2M の結合したタンパク質を質量分析によって解析したところ、PSMD5、ALDH1A1、ESD などが同定された。大腸菌からこれらの組換えタンパク質を精製し、上記と同様 a2M-RG を用いた細胞取込みアッセイを行ったところ、a2M-RG と変性した PSMD5、ALDH1A1、 ESD タンパク質は細胞内取込みが増加し、ESD タンパク質も細胞内に取り込まれ、リソソーム分解されていることが分かった（図3）。HeLa 細胞以外での取込み活性を調べたところ、肺、肝臓、小腸、グリア細胞由来の培養細胞株においても、取込み活性が見られることから、a2M の取り込み分解は組織に普遍的に存在すると考えられた。

次に、a2M の選択的エンドサイトーシスの分子機構を調べた。これまで a2M が結合する細胞膜タンパク質として知られている LRP1 に着目した。CRISPR によって LRP1 KO 細胞を作成し、a2M 取込みアッセイを行ったが、その取込み活性は大きく変化しなかった。Clusterin の細胞内取込みは、その膜上のヘパラン硫酸鎖を受容体とした経路によって行われる。a2M の取り込みにヘパラン硫酸が必要かどうか調べるため、ヘパラン硫酸合成を欠損した EXT1 KO 細胞を用いて、取込みアッセイを行ったが a2M の取り込み活性に影響しなかった。プロテアーゼインヒビターとして知られている a2M は、プロテアーゼを a2M 内に閉じ込める構造変化にその bait region が関わる。Bait region と取込み活性の関連を調べるため a2M の bait region 欠損体を作成し取込みアッセイを行ったが、その活性に変化はなかった。これらの結果から、a2M の細胞内取込みは、未知の機構によって仲介されていることがわかった。

A2M と Clusterin の役割を調べるため、5 つの異なる変性タンパク質を用いて、それぞれの取り込みアッセイを行った。その結果、Clusterin は普遍的にいずれのタンパク質においても取込み活性を示したが、a2M はいくつかのタンパク質のみ取込み活性を示した。それらタンパク質の凝集能を濁度アッセイによって調べたところ、a2M は凝集性の高いタンパク質の基質指向性が高いことが分かった。

これらの結果から、a2M は細胞外の異常タンパク質を分解する細胞外シャペロンであり、Clusterin と異なる、より凝集性の高いタンパク質に特化した細胞外シャペロンであることがわかった（Sci. Rep. 2023）。

オートファジーによる細胞内タンパク質分解システムの分子機構についても調べた。その結果、ミトコンドリアストレスプローブを開発し、新しいミトコンドリアストレス化合物を同定した（JBC 2021）。また CCG1 が ER-phagy 誘導時に、小胞体内の基質と細胞質オートファゴソーム膜との両方の受容体として、選択的な小胞体基質分解を仲介していることを見出した（MBoC 2023）。さらにオートファゴソーム形成を阻害する新規化合物として bTBT を同定した（Auto. Rep. 2023）。

これらの成果から、生体内のタンパク質分解に関わる分子機構の一旦が明らかとなり、今後のタンパク質品質管理システムの研究分野の発展が期待できる。さらに、新規の細胞外シャペロン（CRED1、CRED2）の同定に成功し、いくつかの異常タンパク質を分解することが分かってきた（未発表データ）。現在、その機能解析を進めている。

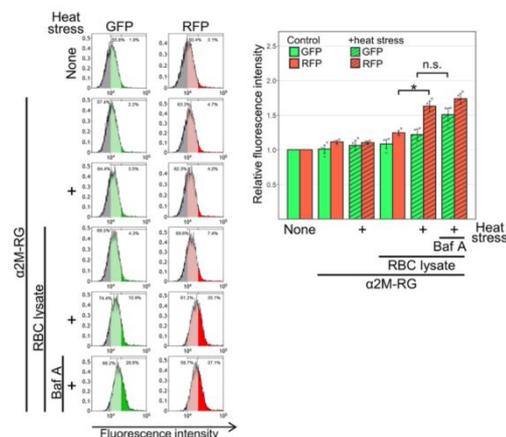


図2 a2M-RG は変性タンパク質の存在下にて、細胞内への取り込みが増加する。

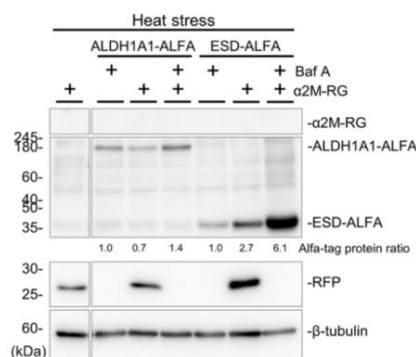


図3 a2M は熱変性した ALDH1A1 または ESD タンパク質の細胞内取込み分解を増加する。

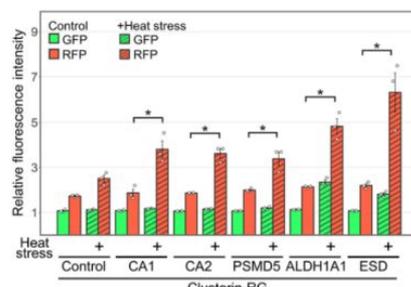
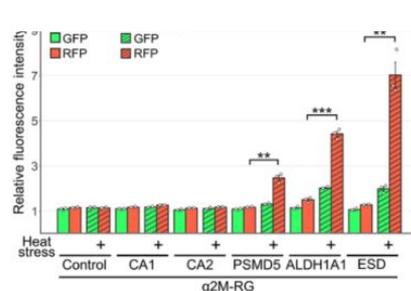


図4 a2M と Clusterin は異なる基質指向性をもつ

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tomihari Ayaka, Kiyota Mako, Matsuura Akira, Itakura Eisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Alpha 2-macroglobulin acts as a clearance factor in the lysosomal degradation of extracellular misfolded proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-31104-x	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 Ishii Shunsuke, Chino Haruka, Ode Koji L., Kurikawa Yoshitaka, Ueda Hiroki R., Matsuura Akira, Mizushima Noboru, Itakura Eisuke	4. 巻 34
2. 論文標題 CCPG1 recognizes endoplasmic reticulum luminal proteins for selective ER-phagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 ar29,1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E22-09-0432	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 Date Yuki, Matsuura Akira, Itakura Eisuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Disruption of actin dynamics induces autophagy of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 1 - 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-022-00828-6	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 Tomihari Ayaka, Chiba Momoka, Matsuura Akira, Itakura Eisuke	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for quantification of the lysosomal degradation of extracellular proteins into mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100975 ~ 100975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100975	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 Uesugi Rie, Ishii Shunsuke, Matsuura Akira, Itakura Eisuke	4. 巻 297
2. 論文標題 Labeling and measuring stressed mitochondria using a PINK1-based ratiometric fluorescent sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101279 ~ 101279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101279	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 Klionsky Daniel J., , , , , , , Eisuke Itakura , , , , , 他著者約3000名	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)<sup>1</sup>	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 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 該当する

[学会発表] 計15件(うち招待講演 4件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 板倉英祐
2. 発表標題 Shear stress sensitive(SSS)血漿タンパク質の品質管理経路
3. 学会等名 第 15 回 オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mizuki Tsuchiya , Akira Matsuura , Eisuke Itakura
2. 発表標題 Identification of CRED1 which leads to lysosomal degradation of extracellular aberrant proteins
3. 学会等名 CELL BI023 (ASCB2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 板倉英祐
2. 発表標題 細胞外不良タンパク質を分解へ導く細胞外シャペロン
3. 学会等名 2022 年度日本生化学会関東支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉英祐
2. 発表標題 Mito-Painを用いたミトコンドリアストレス検出と解析
3. 学会等名 第43回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunsuke Ishii, Haruka Chino, Akira Matsuura, Noboru Mizushima, Eisuke Itakura
2. 発表標題 Analysis of selective degradation of ER-luminal substrates by ER-phagy
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy(ISA2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Momoka Chiba, Akira Matsuura, Eisuke Itakura
2. 発表標題 A novel autophagy inhibitor, BTBT, suppresses dissociation of early ATG proteins
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy(ISA2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉英祐
2. 発表標題 細胞外環境における細胞外シャペロンを介したタンパク質分解機構
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会（名古屋）（口頭発表）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉桃果, 松浦彰, 板倉英祐
2. 発表標題 細胞外異常タンパク質を分解する新規細胞外シャペロンの機能解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会（名古屋）（口頭発表）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井俊輔、千野遥、松浦彰、水島昇、板倉英祐
2. 発表標題 小胞体膜タンパク質による基質直接認識を介したオートファジー依存的小胞体品質管理機構の解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会（名古屋）（口頭発表）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清田真子, 松浦彰, 板倉英祐
2. 発表標題 細胞外タンパク質の取り込み分解活性の制御機構の解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会（名古屋）（口頭発表）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 葛城優香, 松浦彰, 板倉英祐
2. 発表標題 Shear stress感受性血漿タンパク質の同定と解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会(名古屋) (口頭発表)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉英祐
2. 発表標題 細胞外シャペロンによる血液内の異常タンパク質分解機構
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会(招待講演)
4. 発表年 2021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 matsuuura
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース： 2マクログロブリンが変性タンパク質を分解する役割を発見  <a href="https://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2022/20230328_2.pdf">https://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2022/20230328_2.pdf</a></p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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