

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05385

研究課題名（和文）細胞外小胞への選択的・効率的なタンパク質輸送系構築

研究課題名（英文）Selective and highly efficient protein transport system via extracellular vesicles

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエのタンパク質架橋反応を触媒するトランスグルタミナーゼの一種である「TG-A」は一般的なN末端の分泌シグナル配列を有しておらず、代わりに脂質修飾を受けることで、細胞外小胞（EV）に内包された状態で分泌される。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-Aの配列を改変して高効率なEV分泌システムを構築すること、並びにその分泌機構を明らかにすることを目的とした。本研究により、TG-Aの配列に改変を施すと最大で7.5倍程度までEVの分泌量を上昇させることに成功した。さらにはTG-AのEVを介した分泌経路、およびEVの他細胞への取り込みを促す機構を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に分泌された細胞外小胞（EV）は血流やリンパ液に乗り、遠隔の器官に情報を届ける細胞間情報伝達に関与することが知られており、生体の恒常性並びにがんの転移などに関与している。これまでの代表者らの研究により、TG-AのN末端から8つのアミノ酸が脂質修飾とEVへの内包化に必要な十分条件であることが判明している。この配列に改変を施すと、脂質修飾の割合が向上し、EVへの内包化率も有意に上昇することが認められた。さらに、下流に生理活性タンパク質を融合することにより、他細胞に取り込まれた状態で機能を発揮することを発見した。このことは、各種生理活性タンパク質の高効率な輸送に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：TG-A, a type of transglutaminase that catalyzes protein-protein cross-linking in *Drosophila*, does not have a conventional N-terminal secretory signal sequence, but instead undergoes lipid modification and is secreted as extracellular vesicles (EVs). This study aimed to establish a highly efficient EV secretion system by modifying the sequence of TG-A and to elucidate the secretion mechanism. In this study, we succeeded in increasing EV secretion up to 7.5-fold by modifying the TG-A N-terminal sequences. Furthermore, we found the EV-mediated secretory pathway of TG-A and the mechanism that promotes the uptake of EVs into other cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞外小胞 EV トランスグルタミナーゼ 脂質修飾 S-パルミトイル化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (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、皮膚の形成や血液凝固、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。我々はこれまでショウジョウバエ (ハエ) **TG** の機能解析を行ってきており、本酵素は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すことを見出してきた。興味深いことに、この酵素は一般的な **N** 末端の分泌シグナル配列を有しておらず、代わりに脂質修飾を受けることで、細胞外小胞 (**extracellular vesicle, EV**) に内包された状態で分泌されることを見出した。本研究では、培養細胞およびハエ個体を用い、脂質修飾が引き起こす **TG** 分泌の分子機構解明と生理活性タンパク質の細胞外小胞への内在化システムを構築することを目的とする。

2. 研究の目的

哺乳類には一次配列の異なる **8** 種類の **TG** が存在しており、それぞれが異なる機能を果たしている。一方で、ハエの **TG** は、ゲノム中に **1** 種類しかコードされていない。我々のこれまでの研究により、ハエ **TG** は外骨格形成と生存に必須の酵素であることが明らかとなり、外骨格形成に関わる数種類の基質タンパク質も同定してきた。また、**TG** は腸管上皮細胞内の転写因子 **NF-B (Relish)** を架橋し不活性化させることで、腸内細菌に対する免疫寛容性を生み出して腸内細菌叢を維持すること、腸管内腔においてはムチン様バリア構造である圏食膜の安定化を促し、経口感染した病原性細菌に対する抵抗性に寄与することを見出した。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。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。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** 末端部分に脂質修飾である **N**-ミリスチル化および **S**-パルミトイル化を受けること、さらに **TG-A** は脂質修飾依存的に生理活性細胞外小胞の一種「**EV**」に内包された状態で分泌されることが示された (**Shibata et al., J. Biol. Chem., 2017**)。一方で、脂質修飾を受けない **TG-B** はサイトゾルに留まり、細胞内シグナル伝達制御を行う。しかし、脂質修飾による **TG-A** の細胞内局在変化や **EV** 内包化の機構は不明のままである。本研究では、細胞およびハエ個体を用いた実験から、**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。さらに、脂質修飾と **EV** 内包化に必要な **TG-A** に特有の配列を「**EV タグ**」として用い、各種生理活性タンパク質を高効率に小胞内にパッケージングさせるシステムを構築したい。

3. 研究の方法

(1) **S**-パルミトイル化には活性中心のアミノ酸残基を基に命名された **DHHC** ファミリーパルミトイル基転移酵素 (以下 **DHHC**) が関与しており、ハエゲノム中に **22** 種類存在している。**TG-A** に施される脂質修飾のうち、**N**-ミリスチル化は **1** 種類の **N**-ミリスチル転移酵素が担うが、**S**-パルミトイル化を行う **DHHC** については責任酵素の同定はなされていない。まず、ハエ由来培養細胞 (**S2** 細胞) を用いて、**TG-A** と相互作用する **DHHC** を、タンパク質間相互作用解析法の **BioID (proximity-dependent biotin identification)** で調べる。各 **DHHC** 酵素にビオチン転移酵素を融合し、近接した **TG-A** へのビオチン化の確認をウエスタンブロットで行う。また **S**-パルミトイル化は小胞体もしくはゴルジ体にて起こるため、それぞれを破壊する薬剤を用いた実験も並行して行う。加えて、特定の **DHHC** 発現量を **RNA** 干渉によりノックダウンさせ、そのときの **TG-A** の分泌量を定量化することで、責任酵素を特定する。

(2) 分泌された **EV** は血流やリンパ液に乗り、遠隔の器官に情報を届ける細胞間情報伝達に関わることが知られている。これまでに、**TG-A** の **N** 末端から **8** 番目のアミノ酸が、脂質修飾と **EV** の分泌に必要な十分な条件であることが判明している。この配列を緑色蛍光タンパク質 (**GFP**) の **N** 末端に付加して細胞に発現させると、通常は細胞質中に留まる **GFP** が **EV** へ内包された状態で分泌される。**TG-A** をモデルとした **EV** 内包化配列のことをここでは「**EV タグ**」と呼ぶ。この **EV タグ** を改変させ、高効率な分泌を促す配列を構築する。また **EV** 内包タンパク質の活性の発揮には、他の細胞に取り込まれることが必須である。そこで、超遠心法などにより回収した **EV** を各種培養細胞に添加後、取り込み効率をウエスタンブロットや蛍光顕微鏡により確認する。また高効率に他の細胞に取り込まれるための機構を明らかにする。

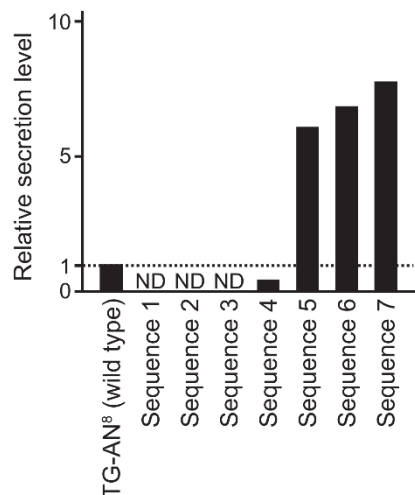
(3) **EV** 分泌経路の詳細を調べる目的で、哺乳類で既知となっている経路の各因子を **RNA** 干渉し、その際の **EV** 分泌量を確認する。さらに、分泌された **EV** 中に含まれるタンパク質を質量分析により同定し、その遺伝子を **RNA** 干渉、もしくは過剰発現させ、**EV** への影響を確認する。

4. 研究成果

(1) まず、**TG-A** の **S**-パルミトイル化を引き起こす **DHHC** 酵素を同定する目的で、**BioID** を用

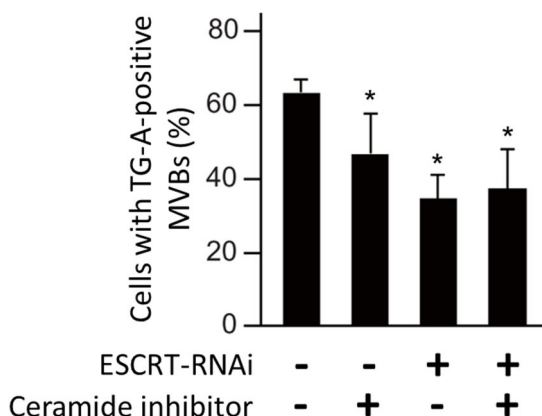
いたタンパク質間相互作用実験を行った。その結果、3種類のDHHCがTG-Aと相互作用することが判明した。さらに、これら3つの遺伝子をそれぞれRNA干渉させたところ、いずれにおいてもEV分泌量に変化は認められなかった。一方で、3種類を同時にノックダウンさせたところ、EV分泌量に変化が認められた。いずれも細胞内において相補的に機能していることが推定された。

(2) TG-AのN末端から8つのアミノ酸が脂質修飾とEVへの内包化に必要な十分条件であることが判明している。この配列に改変を施すと、その配列の種類によって有意にEV分泌量が増加し、最大で7.5倍程度の亢進が認められた。また、パルミチン酸の誘導体を用いた代謝標識実験から、分泌が増加した配列において有意なS-パルミトイル化の増強が確認された。このことより、S-パルミトイル化の修飾割合とEV分泌量に相関があることが明らかとなった。(右図: EV分泌量の比較。TG-AのN末端から8個のアミノ酸配列にGFPタグを付加したもの(TG-AN⁸(wild type)と表記)の分泌量を1としたときの改変配列の分泌量の割合を示す。本実験により、最大で7.5倍の分泌量増加を引き起こす配列が得られた。)

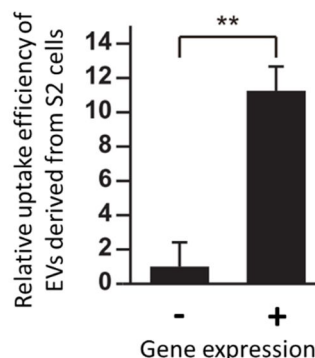


(3) 哺乳類において、EVは「多胞体エンドソーム」と呼ばれるオルガネラで形成され、その形成には

endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) 依存的経路とセラミド依存的経路が知られている。ショウジョウバエTG-AのEVを介した分泌にどの経路が関与するかを確かめるために、両経路の因子のRNA干渉、もしくは阻害剤を用いた実験を行った。その結果、TG-Aの多胞体エンドソームへの輸送には両経路が関与することが明らかとなり、いずれの経路を阻害した場合においてもEVを介した分泌が減弱した。(左図: 各経路阻害時の多胞体エンドソーム(MVBs)形成率を示す。ESCRT因子のRNA干渉時、またセラミド経路の阻害剤により、TG-Aを含む多胞体エンドソームを有する細胞数が有意に減少した。)



さらに、EV中のタンパク質を質量分析によって網羅的に解析したところ、脂質代謝に関与する酵素が同定された。この遺伝子をRNA干渉してもEV分泌量に変化は認められなかったが、一方で過剰発現した細胞から得られたEVは、ハエ由来の血球への取り込み量が増加することが判明した。この酵素は他の生物においてEVの形成や取り込みに関与することは報告されておらず、新規の研究分野を開拓する可能性がある。(右図: 脂質代謝に関与する遺伝子を過剰発現した細胞から得られたEVを回収し、他の細胞(実験ではハエから得られた血球)に添加した際のEVの取り込み率を示す。この結果から、本酵素を含むEVは、多細胞への結合親和性を向上させている可能性が示唆された。)



(4) 本研究の過程において、脂質修飾がハエ生体において自然免疫経路の制御に関与することが見出された。脂質修飾を阻害すると経路の過剰な亢進が引き起こされ、ひいては短命となることが分かった。現在は脂質修飾を受ける因子を特定するとともに、その生理的意義を調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴田俊生 |
| 2. 発表標題 タンパク質のN-ミリスチル化を介したショウジョウバエ自然免疫経路の制御機構解析 |
| 3. 学会等名 日本生体防御学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴田俊生 |
| 2. 発表標題 脂質修飾を介したショウジョウバエトランスグルタミナーゼおよび自然免疫の機能制御 |
| 3. 学会等名 日本生化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
|---------|---------|