

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640084

研究課題名(和文)新規翻訳後修飾因子UBL3を介した輸送システムの解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel posttranslational modification factor UBL3 as the protein sorting machinery in exosomes

研究代表者

上田 洋司 (Ageta, Hiroshi)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：40416649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は新たな翻訳後修飾因子の探索を目的として、バイオフィーマティクス手法により、進化的に高度に保存されたUBL3を同定した。UBL3が翻訳後修飾因子として作用する事だけでなく、エクソソーム中へ輸送される事も見出した。UBL3の生理学的な作用を探求するために、当該年度において、UBL3-KOマウスを用いた研究を行った。その結果、野生型に比べKOマウスのエクソソーム中の60%の総タンパク質の減少を見出した。miRNA存在量には変化がなかった。UBL3はエクソソーム粒子濃度、粒子径、miRNA量には影響を及ぼさずエクソソームへ輸送されるタンパク群にのみ影響を及ぼしているという興味ある知見を得た

研究成果の概要(英文)：We here used bioinformatics techniques to identify a novel protein, ubiquitin-like protein 3 (UBL3), as a membrane-localized, highly conserved ubiquitin domain-containing protein. We found that UBL3 acts as a novel posttranslational modification factor. Furthermore, we showed that UBL3 is specifically colocalized with exosome marker proteins and is released in cell culture medium. When fused with UBL3, enhanced green fluorescent protein (EGFP), mCherry and biotinylated tag are all sorted to exosomes. The total protein levels in serum exosomes purified from UBL3 KO mice were 60% lower than those in exosomes purified from wild-type mice. However, we did not find any significant differences in the levels of miRNAs such as miR-16, miR-23, and miR-21. The concentration of exosome particles and the average particle diameter in the serum exosome did not differ between the UBL3 KO and wild-type mice. These results indicate that UBL3 selectively influences the sorting of proteins to exosomes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Ubiquitin 翻訳後修飾 UBL3

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は合成後に様々な翻訳後修飾を受ける事で機能・局在・分解などの制御を受ける。

申請者は、神経系におけるユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) に注目して研究を行っており、グルタミン酸受容体の裏打ちタンパク質である Vesl-1S が UPS 系により分解され、局在制御されていることを見出した (JBC 2001, Mol. Brain. Res. 2001)。更に、バイオインフォマティクスを駆使して、新規ユビキチンリガーゼ SCRAPPER の同定 (Cell 2007) や、グルタミン酸受容体を制御する Tmub1 の同定 (PLoS ONE 2007) を行ってきた。また、疾患関連分子の解析を行ってきた (PLoS ONE 2008, Learning and Memory 2010, Biomarkers 2013)。

エクソソームは細胞外へ放出される小胞体である。近年、エクソソーム内に mRNA や miRNA が含まれ、それら分子が再び細胞に取込まれ細胞内シグナルに影響を及ぼす事が判明した (Valdi H et al: Nat Cell Biol 2007, Kosaka N, et al: JBC 2010)。近年の研究により、癌の発症部位により血清に含まれるエクソソーム中の miRNA の違いも判明している (Rosenfeld N, et al: Nat Biotechnol 2008)。さらに、エクソソームを介した伝搬が癌の悪性化に関与しているとの報告もある (Al-Nedawi K et al: Nat Cell Biol 2008)。癌だけでなく、プリオン病などの神経疾患の伝搬にもエクソソームが関与していることが判明している (Fevrier B et al: PNAS 2003)。更に、エクソソームは疾患バイオマーカーとしての観点でも注目を浴びているだけでなく、エクソソームの伝搬性にも注目し、応用が期待されている。実際エクソソーム中の siRNA が脳へ到達した報告もある (Alvarez-Eviti L et al., Nat Biotechnol 2011)。

申請者は、新たな翻訳後修飾因子の探索を目的とし、バイオインフォマティクス手法を用い、進化的に高度に保存された膜タンパク UBL3 を同定し、ユビキチンや SUMO や Atg のような新たな翻訳後修飾機構 (UBL3 化と命名予定) を見出ししている。申請者の研究により、UBL3 とエクソソームに関して既に下記の事が分かっている。

- ・ UBL3 は細胞内にて、エクソソームマーカーと共局在する。
- ・ UBL3 はエクソソームとして、細胞培養液へ放出される。
- ・ 放出されたエクソソーム中において、UBL3 化が生じている。
- ・ UBL3 はエクソソームの内側に存在する。

2. 研究の目的

培養細胞レベル (in vitro) での解析を進展させ、動物レベル (in vivo) での解析を行う。申請者が独自開発した UBL3 KO マウスを使

用し、エクソソームの直径や粒子数を測定して、実際の動物における UBL3 とエクソソームの関係を調べる。

3. 研究の方法

(1) UBL3 の各種臓器での発現を知るために、野生型マウスと UBL3 KO マウスから各種臓器を摘出し、UBL3 抗体を用いたウエスタンブロッティング (WB) を行なった。

(2) 野生型マウスと UBL3 KO マウスから臓器を摘出し、UBL3 抗体を用いた免疫沈降による精製を行い、UBL3 抗体による WB を行なうことで、内在的 UBL3 化反応を確認した。

(3) 野生型と UBL3KO マウスから初代培養を行い、培養液からエクソソーム精製を行い、解析を行なった。

(4) エクソソーム粒子形状に関しては、電子顕微鏡による直接観察により調べた。

(5) エクソソーム中に内包する miRNA 量は、リアルタイム PCR により検定を行なった。

(6) エクソソーム中に内包するタンパク量は、SDS 電気泳動法により確認した。

(7) 精製されたエクソソーム粒子の平均直径と粒子濃度は、レーザーを用いたナノトラッキング法 (NanoSight) により直接検定した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスと UBL3 KO マウスから各種臓器を摘出し、UBL3 抗体による WB 解析から、肺、肝臓、脾臓、膵臓、小腸、大腸、腎臓、筋肉、精巣、大脳皮質、小脳、海馬などの臓器において広範囲に発現している事が分かった。更に、これら検出できたシグナルは UBL3 KO マウスでは消失していた。

(2) 野生型マウスと UBL3 KO マウスから大脳皮質、大腸、小腸を摘出し、UBL3 抗体を用いた免疫沈降による精製を行い、UBL3 抗体による WB を行なった。その結果、大脳皮質、大腸、小腸いずれにおいても、UBL3 化反応を確認できた。これらシグナルは UBL3KO マウスからのサンプルでは消失していた。

(3) 野生型と UBL3KO マウスから初代培養を行い、培養液からエクソソーム精製を行なった後、UBL3 抗体を用いた WB を行なった。その結果、エクソソーム分画において内在性 UBL3 が存在する事がわかった。このシグナルは、UBL3 KO マウスからのサンプルでは消失していた。

(4) エクソソームを直接観察する事を目的とし、電子顕微鏡によるネガティブ染色法の

確立を行った。パイロット実験として、HEK293T 細胞の培養液から精製したエクソソームを用いて実験条件の確立を行った。その結果、超遠心法によるエクソソーム分画において、平均 100nm の粒子を確認する事ができた。更に、野生型マウスと UBL3 KO マウスから血清エクソソームを精製し、電子顕微鏡による観察を行った。その結果、野生型マウスと UBL3 KO マウスの両方において、エクソソーム粒子を観察する事ができた。

(5) エクソソーム中に内包する miRNA 量を測定するために、野生型マウスと UBL3 KO マウスから血清エクソソームを精製し、エクソソーム粒子を可溶化し RNA 精製を行い、逆転写反応後、エクソソームエンリッチな miRNA に対してリアルタイム PCR を行った。その結果、野生型と UBL3 KO マウス間において有意な差は検出されなかった。

(6) エクソソーム中に存在する総タンパク質を調べるために、野生型マウスと UBL3 KO マウスから血清エクソソームを精製し、SDS 電気泳動後にタンパク染色を行った。その結果、野生型に比べ、UBL3 KO マウスはエクソソーム中の総タンパク質が 60%消失していた。

(7) 野生型マウスと UBL3 KO マウスから血清エクソソームを精製し、NanoSight により平均粒子径と粒子濃度を測定した。その結果、有意な差は検出されなかった。

以上のことから、UBL3 は各種臓器に発現し、内在性 UBL3 もエクソソームとして放出される事が判明した。

更に、UBL3 KO マウスを用いた解析により、UBL3 がエクソソーム粒子の濃度、粒直径、エクソソーム中の miRNA には影響を及ぼさず、エクソソーム中の総タンパク量のみに影響を及ぼす事がわかった。この事は、UBL3 はエクソソームへの miRNA 輸送には影響を及ぼさず、タンパク質輸送のみに影響を及ぼすことを意味している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

土田邦博、上住聡芳、中谷直史、上田洋司、常陸圭介
サルコペニアにおける筋肉脂肪変性の関与
整形・災害外科
2015 年 02 月号(58 巻 02 号) 155-161
査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

Kuroiwa Takashi, Hiroshi Ageta, Daiki Ikeda, Kunihiro Tsuchida, Harumoto Yamada
New biomarkers of osteoarthritis
Osteoarthritis Research Society

International, March 31-April 3, 2016,
アムステルダム、オランダ

Hiroshi Ageta, Keisuke Hitachi, Masashi Nakatani, Kunihiro Tsuchida
Establishment of an in vivo exosomal transfection as a new gene therapy
ISEV, April 22-27, 2015,ワシントン DC, アメリカ

黒岩宇、上田洋司、土田邦博、山田治基
変形性関節症の新規バイオマーカー
第 29 回日本軟骨代謝学会、2016/2/19-20, 広島

〔図書〕(計 1 件)

Kunihiro Tsuchida, Keisuke Hitachi, Masashi Nakatani, Akiyoshi Uezumi, Hiroshi Ageta
The role of myostatin and related factors in muscle hypertrophy and atrophy. Nova Science publishers, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 洋司 (Hiroshi Ageta)
藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
難病治療学研究部門 助教
研究者番号：4 0 4 1 6 6 4 9

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし