

研究終了報告書

「細胞外小胞を介したタンパク質恒常性維持機構の包括的理解」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：武内 敏秀

1. 研究のねらい

タンパク質は、生体の主要な構成成分のひとつとして、生命活動の根幹を支えている。生体が正常な生命活動を行い、これを維持するためには、それぞれの細胞内において、すべてのタンパク質が正しく合成されたのち、正しい構造へとフォールディングして機能を発揮し、そして適切に分解されることが必要である。正しいフォールディングに失敗したタンパク質や、様々な環境ストレス負荷により構造が不安定化したタンパク質は、細胞内における本来の機能を失うだけでなく、細胞内外で凝集・異常蓄積することで、神経変性疾患をはじめとする様々な疾患を引き起こす。タンパク質の品質を管理し、その恒常性を維持する細胞内機構（プロテオスターシス維持機構）の分子基盤を明らかにすることは、基礎科学的に重要であるとともに、その機能低下・破綻が一因とされる神経変性疾患などに対する治療法・診断法を開発する上で必要不可欠である。以前我々は、タンパク質の凝集を抑制する生体保護因子である分子シャペロンが、エクソソームなどの細胞外小胞(Extracellular vesicles, EV)を介して細胞間伝播し、他の細胞・組織でタンパク質凝集および神経変性を抑制することを見出した。これにより、特に個体レベルのプロテオスターシス維持において、EVが重要な働きを担う可能性が明らかになったものの、その詳細は不明であった。そこで本研究では、EVを介したプロテオスターシス維持機構の全容解明を目的とし、(A)EVを介した分子シャペロンの細胞間伝播によるプロテオスターシス維持機構の解明、(B)EVを介した細胞内不要物質の細胞外排出によるプロテオスターシス維持機構の解明を行う。上記2項目の研究を通じて、生体内プロテオスターシス維持におけるEV分泌・伝播の役割を明らかにするとともに、タンパク質の品質管理機構とEV分泌がどのようにクロストークし、プロテオスターシス維持に関わるのかを明らかにすることを目指す。タンパク質凝集・蓄積が原因となる神経変性疾患において、EVを介したプロテオスターシス維持機構の機能低下や分子変容が明らかになれば、新たな視点からの病態機序解明が可能になるとともに、疾患における変容に着目した診断バイオマーカー開発やEVの生体保護的役割に着目した新しい疾患治療法の提案につながる事が期待できる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、細胞外小胞 (EV) の分泌・伝播を介したタンパク質恒常性維持機構 (プロテオスターシス維持機構) の解明を目指し、大きく 2 項目の検討を行った。以前我々は、EV を介した分子シャペロンの細胞間伝播が個体レベルのプロテオスターシス維持に關与する可能性を明らかにしたが、EV/シャペロン分泌に關わる分子機序や生体内における役割 (特にストレス条件下) などの詳細は不明であった。そこでこれらを明らかにすべく、研究項目 (A) では、EV/シャペロン分泌機序やストレスとの關連性について検討を行った。その結果、1) EV 伝播を介した上述の凝集抑制機構は、熱ストレスに應答して活性化されること、2) 特定因子が熱ストレス下における EV/シャペロン分泌亢進を制御していることが明らかとなった。これらの結果から、EV 分泌・伝播が、個体レベルのストレス応答反応のひとつとして、特定の細胞内機構により制御され、熱ストレス下のプロテオスターシス維持に寄与することが示唆された。一方、研究項目 (B) では、EV を介した不要タンパク質排出処理機構の解明を目指して検討を行った。以前より、EV が細胞内不要物の排出を担う可能性が提唱されているが、これを明確に示した報告はなく、不要物の選択や EV への積み込み、そして分泌に至る分子機構も全くの不明であった。検討の結果、3) 細胞内タンパク質分解系が機能低下すると、EV を介した凝集性タンパク質/ユビキチン化タンパク質の分泌が顕著に増大すること、4) ある分子がこの分泌に重要な働きを担うこと、5) 細胞内分解系の機能低下が知られている神経変性疾患の細胞/動物モデルの解析から、複数の分子が病態と關連して変容することが明らかとなった。上記に加え、6) 傷害ミトコンドリアが細胞外に排出される現象を見出し、その機序と神経変性疾患との關連性についても明らかにした。これらの検討から、細胞内分解系が機能低下した際に、その代替処理機構として、EV が細胞内不要物の排出を行う可能性が明らかとなった。また、疾患における EV 変容に着目した解析から、バイオマーカー候補分子が複数同定された。以上から、EV 分泌および EV 伝播がプロテオスターシス維持機構に果たす役割の一端が明らかになるとともに、EV に着目した神経変性疾患の病態解明および診断法開発に有用な知見が得られた。

(2) 詳細

研究テーマ A「分子シャペロンの細胞間伝播によるプロテオスターシス維持機構の解明」

A1) EV 伝播を介したプロテオスターシス維持機構の熱ストレス応答性

熱ストレス負荷により EV 分泌が有意に亢進すること、熱ストレス負荷細胞由来 EV は他の細胞においてタンパク質凝集をより強く抑制すること、熱ショックタンパク質などの EV タンパク質が熱ストレスで分泌増加することを見出した。以上から、熱ストレス下では EV 分泌/シャペロン分泌が亢進し、伝播先細胞における凝集抑制作用が高まることが明らかとなり、EV 分泌が熱ストレスに対する細胞応答反応として働く可能性が明らかとなった。

A2) EV/シャペロン分泌の制御因子の同定

ノックアウト細胞を用いた検討から、熱ストレス条件下における EV 分泌亢進に必須となる因子を同定した。この因子を手がかりとして、EV/シャペロン分泌制御に中心的な役割を担う分子 X を同定した。さらに、欠損変異体、機能欠損体、および特異的阻害薬を用いた解析から、EV/シャペロン分泌に重要な分子 X 内の機能ドメインを同定した。以上から、分子 X が熱

ストレス下における EV/シャペロン分泌に重要な役割を果たしていることを見出した。

以上から、EV を介したシャペロン分泌・伝播は、熱ストレス時に活性化され、その分泌制御に分子 X が関与していることが明らかになった。多細胞生物個体におけるストレス応答反応の担い手として、EV が重要な役割を担う可能性が示唆された。

上記に関連して、2017 年度生命科学系学会合同年次大会(2017 年)を含む 4 学会/研究会にて招待講演を行った。また、Biol Pharm Bull 誌に英文総説(2018 年)を発表した。

研究テーマ B「不要タンパク質の細胞外排出によるプロテオスターシス維持機構の解明」

B1) EV を介した凝集性タンパク質/ユビキチン化タンパク質の分泌

細胞内分解系障害により凝集性タンパク質/ユビキチン化タンパク質の分泌が亢進すること、EV がこの分泌に関与することを見出した。以上から、EV を介した凝集性タンパク質/ユビキチン化タンパク質の分泌経路が存在し、細胞内分解系が機能低下した際にこの分泌経路が代償的に活性化される可能性が明らかとなった。

B2) 凝集性タンパク質/ユビキチン化タンパク質の EV 分泌に関わる分子の同定

上述のタンパク質分泌の分子機序解明を目的として、この分泌に必須な細胞内因子 2 種を同定した。ひとつはエクソソーム生成に関与するとされる因子であり、もうひとつは細胞内の小胞輸送に重要な働きを担う因子である。これら 2 因子を手がかりとして、凝集性タンパク質/ユビキチンタンパク質の分泌機序解明の検討を引き続き行う。

B3) 神経変性疾患における EV 分泌の変容解析

神経変性疾患の細胞モデルにおいて EV 分泌が変容していることを見出した。また、動物モデルを用いた EV 内容物の解析から、疾患で変容する EV タンパク質を複数同定した。疾患バイオマーカー候補としての有用性を検証するため、患者検体の検討を進めている。また、血液 EV の解析において、血小板由来 EV が混入し、解析結果に影響する可能性について明らかにした(投稿中)。

B4) 傷害ミトコンドリアの細胞外排出

傷害ミトコンドリアが細胞外に放出されていること、その一部は膜小胞に内包されていること、オートファジーを介したミトコンドリア分解(マイトファジー)の関連因子を欠損した細胞やそれらの遺伝子変異を有する神経変性疾患患者においては、ミトコンドリアタンパク質の放出が増加することを見出した。ミトコンドリアの細胞外放出が、従来知られるマイトファジーの代償機構としてその品質管理を担うとともに、神経変性疾患に関与する可能性が示唆された(Autophagy, in press)。

以上から、EV が、細胞内分解系の代替処理機構として、細胞内不要物の排出に関与することが明らかとなった。細胞内分解系障害にもとづく EV 変容に着目した神経変性疾患バイオマーカー開発の可能性が明らかとなった。

上記に関連して、第 91 回日本生化学会大会(2018 年)を含む 3 学会にて招待講演、Keystone Symposia(2018 年)を含む 3 学会にて一般発表を行った。また、論文発表(J Biochem, 2020; Autophagy, in press)を行った。また、関連著書 2 報を執筆した。

3. 今後の展開

・ストレス応答におけるEV分泌の役割解明: 研究項目(A)において、EV分泌・伝播がストレスに応答して亢進することが明らかとなった。個体内ではストレス下においてもシャペロン誘導を示さない細胞・組織が存在するといわれるが、どのように生存を維持しているのかは不明である。EV分泌・伝播の亢進が、個体内のストレス応答性の細胞間不均衡を補償する可能性について、検討を行い、個体レベルのプロテオスターシス維持におけるEVの役割を明らかにする。

・不要タンパク質の細胞外排出に着目した神経変性疾患の病態機序解明: 近年、様々な神経変性疾患において、原因タンパク質が細胞外に分泌され、病態に関与することが示唆されている。本研究で明らかとなったEVを介した凝集性タンパク質の細胞外排出機構が、病態とどのように関わるのかを明らかにするとともに、EV変容に着目した診断法開発、排出抑制による治療法開発が期待される。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況

研究項目(A)では、以前我々が明らかにしたEV伝播を介したプロテオスターシス維持機構の解明を目的として、(1)EV/シャペロン分泌の熱ストレス応答性、(2)EV/シャペロン分泌の制御因子の同定を行った。EV/シャペロン分泌のストレス応答性を見出し、その制御因子を同定したため、概ね目的は達成できたが、EV/シャペロン分泌の分子機序の詳細は不明であり、引き続き検討を行う。一方、研究項目(B)では、EVを介したタンパク質排出処理機構の解明を目的として、(3)EVを介した不要タンパク質の細胞外分泌の解析、(4)不要タンパク質分泌に関わる分子の同定、(5)神経変性疾患におけるEV分泌の解析を行った。凝集性タンパク質やユビキチン化タンパク質のEV分泌を明らかにし、この分泌過程に重要な因子を2種同定した。また、神経変性疾患においてEV変容を明らかにし、バイオマーカー候補を同定するなど、概ね目的は達成できた。分泌機序については未だ不明な点が多く、検討を続ける。以上に加え、EVにおける血清と血漿の違いを明らかにし、血液EV解析に重要な知見を得た。また、傷害ミトコンドリアの細胞外放出について明らかにし、当初予定していなかった成果も得られた。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究は、さきがけ研究費にて雇用した研究補助員のサポートを得て実施した。学生の参画が難しい環境であったが、実験に習熟した研究補助員をリクルートでき、体制をうまく整えることができたと考えている。研究費は、本研究推進に必要な備品と消耗品の購入、研究補助員の人件費、オミクス解析、旅費などに使用した。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

EV分泌・伝播が生体内プロテオスターシス維持に重要な役割を担い、その破綻が神経変性疾患と関与する可能性を明らかにした。細胞内不要物の処理機構として、EVを介した新しい経路を見出した。また、神経変性疾患においてEV分泌が変容していることを見出し、その変容に基づいたバイオマーカー開発の可能性を明らかにした。EV分泌に着目した神経変性疾患の病態機序解明やバイオマーカー開発につながる重要な知見を得ることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Chi-Jing Choong, Tatsusada Okuno, Kensuke Ikenaka, Kousuke Baba, Hideki Hayakawa, Masato Koike, Mutsumi Yokota, Junko Doi, Keita Kakuda, Toshihide Takeuchi, Akiko Kuma, Shuhei Nakamura, Yoshitaka Nagai, Seiichi Nagano, Tamotsu Yoshimori, Hideki Mochizuki. Alternative mitochondrial quality control mediated by extracellular release. *Autophagy* (in press).

ミトコンドリアの品質管理機構のひとつとして、傷害されたミトコンドリアが膜小胞を介して細胞外に放出される経路が存在することを見出した。この放出経路は、オートファジーによるミトコンドリア分解(マイトファジー)が機能低下すると亢進し、マイトファジー障害を原因とする一部のパーキンソン病の病態に関与することを明らかにした。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 武内敏秀、永井義隆 「オートファジー機能障害による細胞外小胞分泌」 第91回日本生化学会年会シンポジウム(2018年9月25日、京都)
2. 武内敏秀 「Hsp70を介したエクソソーム分泌制御」 第42回日本分子生物学会年会(2019年12月5日、博多)

英文総説

3. Toshihide Takeuchi. Non-cell Autonomous Maintenance of Proteostasis by Molecular Chaperones and Its Molecular Mechanism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 41, 843-849 (2018).
4. Toshihide Takeuchi. Pathogenic and protective roles of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Journal of Biochemistry*, in press.

著作物

5. 武内敏秀、永井義隆 「神経変性疾患とエクソソーム」週刊医学のあゆみ(特集エクソソームと疾患医学)(医歯薬出版株式会社) pp. 319-324 (2020).
6. 武内敏秀「神経変性疾患におけるエクソソームの関与」膜(MEMBRANE)(特集エクソソーム研究の最前線)(日本膜学会) pp. 54-61 (2020).