

研究終了報告書

「エクソソームの動態と細胞応答を捉える Exo プロテオミクステクノロジーの開発」

研究期間： 2018 年 10 月～2022 年 3 月

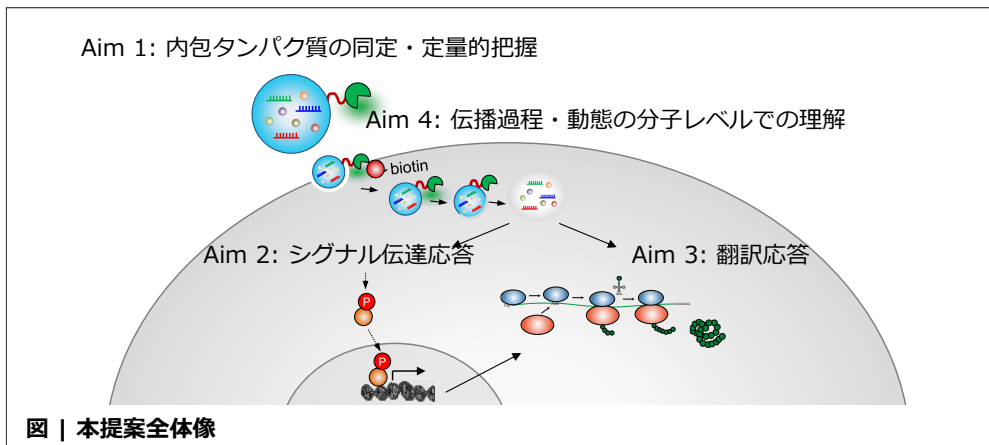
研究者： 今見 考志

1. 研究のねらい

エクソソームは核酸やタンパク質といった生体分子を内包する細胞外小胞であり、内包分子が細胞間でやり取りされうるという観点から、新たな情報伝達的手段と考えられている。では、放出されたエクソソームはどのように受容細胞に取り込まれ、細胞内で振る舞うのだろうか？また、エクソソームを受け取った細胞はどのような細胞応答を示すのだろうか？これらは、エクソソームの機能と意義を問う本質的な問いであるが、その包括的な理解にはほど遠い。本研究では、これらの問いに答えるための技術を創出するとともに、エクソソーム内外の“タンパク質”に着目し、それらが構成する相互作用や生合成、リン酸化シグナルのダイナミクスを定量化することでエクソソームの動態と細胞応答の理解を目指す。

では、本研究では何故タンパク質に着目するのか。miRNA といった核酸に加え、タンパク質はエクソソームの主要な内包生体分子である。特に癌細胞に注目すると、エクソソーム内包タンパク質の定性・定量的なプロファイルは正常細胞とは異なり、それらが標的細胞への転移等に関与していることが最近の研究から明らかにされてきている(総説 Kalluri *J. Clin. Invest.* 2016)。また、申請者の予備実験から様々なシグナル伝達因子に加え、mRNA 結合タンパク質や機能性マイクロペプチドが存在するを見出している。mRNA 結合タンパク質は転写後調節に関わる重要な因子であり、標的細胞のタンパク質量を制御しうる(例えば申請者らの研究 Wessels*, Imami* et al. *Genome Res.* 2016, Zappulo et al. *Nat. Commu.* 2017, Milek, Imami et al. *Genome Res.* 2017)。

これらのエビデンスは、1. エクソソーム内の核酸が重要な因子であることに加え、タンパク質の定性的且つ定量的把握とその機能を理解する必要性があること、2. エクソソームによって誘導されるシグナル伝達応答や遺伝子発現応答を把握する必要性があること、3. エクソソームと標的細胞間の受容選択性や細胞外での動態をタンパク質間の相互作用の観点から捉え、その分子機構を理解する必要性があることを示唆している。



以上のような背景を踏まえ、本研究では質量分析計を用いたプロテオミクス手法を駆使して、エクソソームの動態と細胞応答を定量化する技術を創出する(図)。具体的には、Aim 1) エクソソームの“真の”内包タンパク質プロファイルの特徴づけたうえで、細胞応答として Aim 2) シグナル伝達応答と Aim 3) 翻訳応答を捉える技術を開発する。さらに、Aim 4) エクソソームの細胞内外動態を理解する目的で、エクソソーム表面タンパク質と受容細胞間のタンパク質相互作用のダイナミクスを捉える技術を開発する。

2. 研究成果

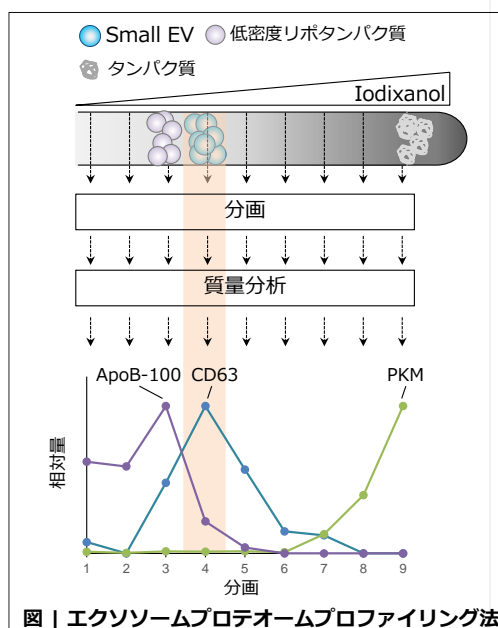
(1) 概要

質量分析を用いたプロテオミクス手法を駆使して、エクソソームの動態と細胞応答を定量化する技術を創出した。まず、エクソソーム関連タンパク質を正確かつ定量的にプロファイル可能な技術を開発した。エクソソームには約 200 種程度のタンパク質が内包または会合しており、そのコピー数もこれまでの知見やエクソソームサイズを考慮して妥当であった。さらに、エクソソームによって誘導される 1 万リン酸化部位以上の定量技術を開発し、レシピエント細胞内でのシグナル伝達応答を捉えることに成功した。また、翻訳応答を包括的に捉える技術も開発し、癌細胞種由来のエクソソームによってリボソームタンパク質群の翻訳が有意に抑制されることを見出した。最後に、エクソソーム表面タンパク質とレシピエント細胞内タンパク質との相互作用を捉える近接標識プロテオミクス手法を確立した。本法により、エクソソーム取り込み過程または取り込み後の動態の分子レベルでの理解に貢献した。以上の技術は、これまでその正体が不明であったエクソソームの生物学にアンバイアスな視点から切り込んだものであり、今後フォローアップ研究を重ねることでエクソソームによる細胞応答やその意義の解明に貢献することが期待される。

(2) 詳細

Aim 1) 擬陽性を排除した“真の”エクソソーム内包プロテオームプロファイリング法の開発

エクソソーム内タンパク質に関してはこれまで質量分析装置を用いたプロテオミクス解析がいくつか行われ、エクソソームデータベースである ExoCarta (<http://exocarta.org> Keerthikumar et al. *J. Mol. Biol.* 2015) には実に 5,402 ものヒトタンパク質がエクソソーム内包分子として記載されている。しかし、エクソソームの単離には生化学的な手法に依存する点、質量分析装置を用いた分析は高感度であるがゆえ数多くの夾雑タンパク質も同定される点から、5,402 ものタンパク質のうちどれが真のエクソソームタンパク質なのかは不明であり、その解析精度が問題となっている (Pedersen et al. *Transl. Biomed.* 2015)。これらの背景を踏まえ、Aim 1 では擬陽性を排除した“真



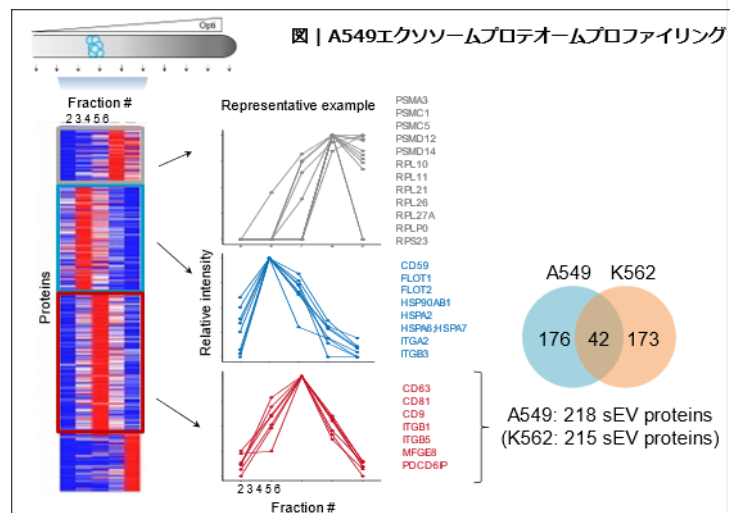
の”エクソソーム内包プロテオームプロファイリング法を開発した(右図)。

エクソソーム内包タンパク質を正確に同定・定量するための基盤技術を確立し、癌細胞種(肝癌細胞 A549, 慢性骨髄性白血病由来 K562 等)由来のエクソソーム内包タンパク質をプロファイルした(下図)。この手法の利点は、エクソソームマーカータンパク質との共分画プロファイルを基に、真のエクソソーム内包タンパク質とコンタミタンパク質を区別できる点である。超遠心機で集めた small EV サンプル(P100)に対し、密度勾配超遠心法を用いてさらに分離・分画し、質量分析をおこなった。A549 由来のエクソソームから得られた結果を下図に示す。1,000 種以上の定量タンパク質のうち 35%しか small EV マーカータンパク質と同一の分画プロファイルを示していないことがわかった(K562 細胞由来のエクソソームサンプルでは 38%)。これは、従来の生化学的手法(例えば超遠心法)ではエクソソームを精製するには純度の点で不十分であること、我々の方法は夾雑タンパク質を含むサンプルに対しても分画プロファイルを用いることで真のエクソソーム内包タンパク質を同定できうることを示している。本法は既存方法よりも、擬陽性を排除したエクソソームプロテオームプロファイリングが可能な点と、多数の癌細胞種由来のエクソソームをプロファイルしているため、研究コミュニティのリソースとして活用できる。現在、論文文化に向けて準備中である。

さらに、エクソソーム内包タンパク質が正確に同定できたので、それらの代謝回転(ターンオーバー)を測定するための技術の開発を試みた(次図)。ねらいとしては、エクソソーム内包タンパク質はリボソームで翻訳後、どのタイミングで細胞外に放出されるのか?を明らかにしたいと考えている。例えば、翻訳後すぐにエクソソームとして放出さ

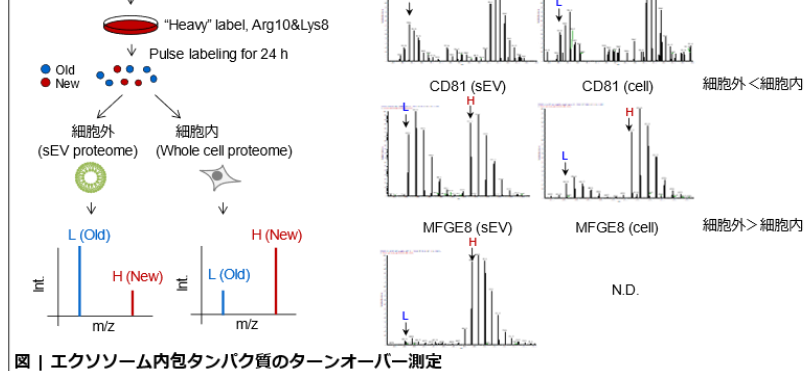
れるのか、それともしばらく経過した後(不要となって)、放出されるのかを区別することができれば、そのタンパク質やエクソソームの機能・特徴を抽出できると考えている。また、エクソソームの機能的意義に迫ることができることが期待される。

まず、A549 細胞をモデルに、通常の培地から安定同位体アミノ酸を含む培地に交換し、24 時間培養した。したがって新しく合成されるタンパク質は安定同位体アミノ酸で標識され、古いタンパク質と質量分析によって区別することが可能となる(下図)。エクソソーム由来のタンパク質と細胞内由来のタンパク質それぞれに対して質量分析をおこなった。その結果、TSPN6 は細胞内でもエクソソームでも同様のターンオーバーを示したが、CD81 ではより古いタンパク質がエクソソームとして分泌されること、その逆に MFGE8 は新しいタンパク質がエクソソームとして分泌されることがわかった。これらの結果は、CD81 は細胞内とエクソソーム



ム両方に存在すること、MFGE8 は分泌シグナルを有し、細胞外へ分泌されるという知見と一致する。よって本法は細胞内タンパク質とエクソソームとして分泌されるタンパク質のターンオーバーの測定が可能であることがわかった。今後、本法の高感度化を目指すとともに、得られた結果について

のフォローアップ
 (エクソソームとして分泌されるタンパク質の物理化学的特徴の抽出など)を行う予定である。本 Aim 1 の一部は、2020 年度分子生物学会のワークショップ企画に「細胞外微粒子とは何者なのか?」、また 2021 年度臨床ストレス応答学会でも成果発表をおこなった。



Aim 2) シグナル伝達応答プロファイリング法の開発

エクソソーム内の重要な分子の一つとして、サイトカインといったシグナル伝達因子が挙げられる。先に述べたように、前立腺癌細胞のエクソソーム(内包タンパク質)が正常細胞のリン酸化シグナルを亢進させることや(Svensson et al. *PNAS* 2011, Al-Nedawi et al *Nat. Cell Biol.* 2008)、申請者の実験から実際にタンパク質キナーゼが数種内包されていることも見出している。これらのエビデンスから、エクソソームを介してシグナル伝達経路を活性化し、最終的には遺伝子発現を制御している可能性がある。しかし、これまでの研究は抗体を用いて個々のタンパク質のリン酸化を定量するにとどまっており、エクソソームによって誘起されるネットワークレベルでのシグナル伝達機構は不明である。そこで、Aim2 ではシグナル伝達応答プロファイリング法の開発を掲げ、標的細胞におけるリン酸化シグナル応答の全体像を捉えることを目指した。

申請者らがこれまで開発したリン酸化プロテオミクス手法を用いて、特に癌細胞由来のエクソソームによって惹起されるリン酸化応答のプロファイリングに焦点を当てた。そこで、領域内の小根山博士との共同研究「癌細胞由来エクソソームによって惹起されるシグナル伝達応答プロファイリング」を開始し、10,000 リン酸化部位以上の定量解析に成功した。また Src チロシンリン酸化が亢進していることを確認し、本結果が妥当であることがわかった。予想通りのリン酸化応答を捉えることに成功しており、本法のプルーフオブコンセプトも示すことができている。さきがけ研究終了後も、リン酸化応答の生物学的解明を目指していきたい。

Aim 3) タンパク質翻訳プロファイリング法の開発

エクソソーム内には種々の miRNA (Valadi et al. *Nat. Cell Biol.* 2007) や癌遺伝子 c-Myc をコードする DNA (Balaj et al. *Nat. Commu.* 2011) 等の核酸に加え、mRNA 結合タンパク質

が含まれている。また上述のように、シグナル伝達を介して様々な遺伝子発現をオンにしている可能性がある。しかし、これらの分子が最終産物であるタンパク質の合成にどの程度寄与するのかわかりず、またそれを捉えるような技術はない。そこで、本 Aim ではタンパク質翻訳プロファイリング法を開発し、エクソソームによって誘導される遺伝子発現応答、特に新生タンパク質の合成量を大規模に定量し、タンパク質合成の増減を明らかにした。

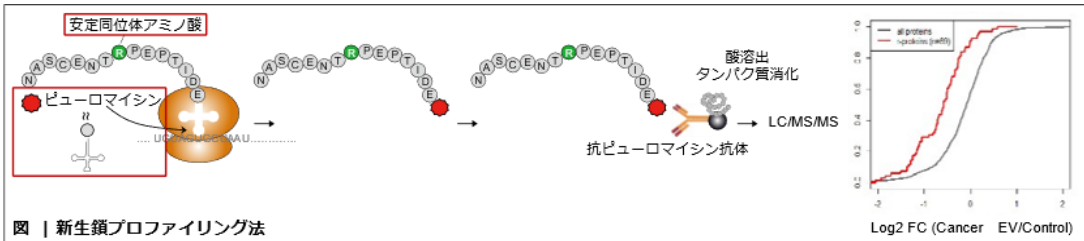


図 | 新生鎖プロファイリング法

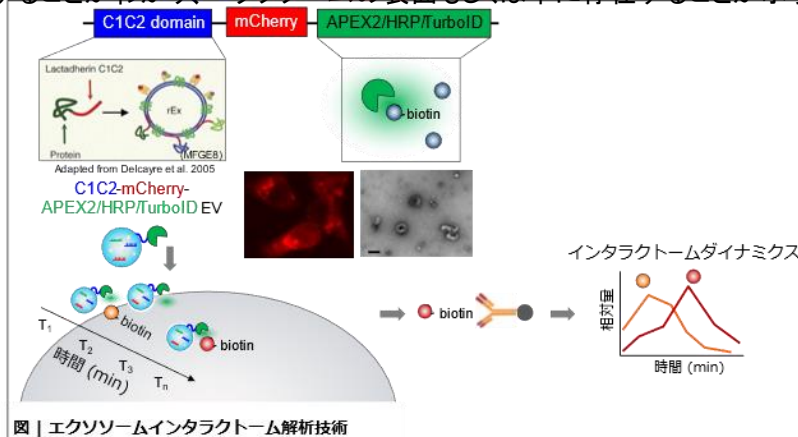
ピューロマイシン類似体を用いた新生ポリペプチド鎖プロファイリング法を確立することに成功した(論文 1)。しかし、この方法ではピューロマイシン類似体が非常に高価であり、クリック反応のような化学反応を伴う。そこで、より安価かつシンプルな手法を開発するために、純粋なピューロマイシンを用いた pSNAP (Puromycin- and SILAC-labeling based NAscent polypeptidome Profiling) 法を開発した(図)(論文 2)。この方法は、既存の問題点(化学反応やリボソームの精製が必要、高価)を解決するよりシンプルな手法であり、真の新生ポリペプチド鎖を濃縮・プロファイルできることを示すことができた。この方法を駆使して、癌細胞種由来のエクソソームが誘導する翻訳応答も捉えた。癌細胞由来のエクソソームによってリボソームタンパク質群の翻訳が有意に減少することを見出した。そのメカニズムについては未だにわかっていないが、本技術のようなアンバイアスな手法を用いることではじめて翻訳応答の全体像がわかり、エクソソームによる細胞応答の理解に貢献できたと考えている。本 Aim 3 の一部は、2020 年度分子生物学会のワークショップ企画に「細胞外微粒子とは何者なのか？」でも成果発表をおこなった。

Aim 4) エクソソームインタラクトーム解析技術の開発

最後に、エクソソームの受容能には細胞・組織特異性があるがその分子機構の理解にはまだまだギャップがある。また受容細胞でのエクソソームの動態に関しても不明な点が多い。蛍光顕微鏡を用いたエクソソームの細胞内での可視化は、その動態を理解するうえで極めて重要である。その一方で、エクソソームの取り込みや動態の分子機構を解明するにはさらなる革新的な技術が必要である。そこで、エクソソームインタラクトーム解析技術を開発し、エクソソームが標的細胞に伝播される過程で相互作用するタンパク質群を時系列に沿って同定し、その分子機構の一端を明らかにすることを目的とした。

エクソソーム表面に局在する近接標識能を有するタンパク質を作製するために、同領域の金沢大・山野博士の助言のもと MFGE8 (D48E) 変異体と mCherry、APEX2/HRP/TurboID をコードするプラスミドを新たに作製した(図)。また、その融合タンパク質が近接タンパク質をビオチン化することを免疫染色と質量分析を用いて確認した。さらに、この融合タンパク質が

細胞外に放出されること、エクソソーム EV マーカーとされる CD81, CD9, CD63 と同一の平面に存在することがわかり、エクソソームの表面もしくは中に存在することが示唆された。こ



れは、エクソソームと近接に位置するタンパク質を同定する目的に利用可能であることを意味している。さらに、この融合タンパク質を含むエクソソームが、レシピエント細胞に取り込まれることをタイムラプス顕微鏡で確認した。次に、取り込まれたエクソソーム表面とその近接タンパク質を同定するためにプロテオミクス解析を行った。エクソソームが取り込まれた mCherry 陽性の細胞のみをソートし、さらに微量ビオチン化タンパク質を濃縮するための生化学的な工夫を行うことで、100 種程度のビオチン化タンパク質の同定に成功している。さき

がけ終了後も、本データを活用し、タンパク質相互作用の観点からエクソソームの取り込み過程または取り込み後の動態の解明を目指していきたい。

3. 今後の展開

Aim 1 では正確なエクソソーム関連タンパク質を同定・定量可能な技術を創出できたので、様々な細胞種・動物種由来のエクソソームタンパク質のアトラスも視野に入れていきたい。ただ、単に大規模にアトラスを作成するのではなく、コンテキスト(細胞周期、発生、分化など)に依存したエクソソームタンパク質の定量変化も捉え、エクソソームタンパク質の質・量と生命現象の関連性も追及していく必要がある。また、個人的には最もチャレンジであった Aim 4 のエクソソーム取り込み過程を明らかにするための、エクソソーム相互作用タンパク質同定技術は、様々な工夫(チップでのビオチン化タンパク質の濃縮、フローサイトメトリーによる細胞の分取など)を取り入れることで、達成できつつある。この技術を用いて、エクソソームがレシピエント細胞に入る瞬間と取り込まれてからの動態を定量的且つ時系列に沿ってデータを取得していくことで、取り込み過程の分子レベルでの理解に繋げていきたい。

本さきがけ研究を通じて、生化学中心の研究から遺伝学や細胞生物学的手法を私の研究に取り入れることができ、エクソソームのみならず細胞外のプロテオスタシス研究に今後発展できる手応えを得ている。Aim 3 で確立したエクソソームの翻訳応答を捉えるプロテオミクス手法は様々な翻訳応答プロファイルに応用でき、また翻訳中の新生鎖の修飾や相互作用といった既存技術では見えなかった現象まで捉えることができている Aim 4 で開発したエクソソーム上に近接標識酵素をロードした EV-TurboID システムは、様々な細胞外イベント・プロテオスタシス研究に展開できると

考えている。例えば、細胞内と比較して細胞外のプロテオーム動態(どんなタンパク質が細胞外に分泌・放出され、その後どのようなタンパク質と相互作用して機能するのかといった一連の流れ)はほとんどわかっていない。ここで開発した細胞外の近接標識タンパク質を捉える技術を応用することで、上述の本質的且つ重要な問題に取り組めると信じている。これも5年以内に、細胞外プロテオームインタラクトームの全貌解明と題して発表していきたい。

4. 自己評価

さきがけ研究開始と同時に微粒子研究に着手したが、領域内さきがけ研究者や、中野総括、領域アドバイザーのおかげで軌道に乗ることができた。キーとなる成果の論文化まではもう少し時間を要するが、1-2年以内に達成したい。Aim 1, 3, 4に関しては全体的に計画通り進んでおり成果が達成できつつある(Uchiyama, Ishihama, Imami* J. Biochem 2020, Uchiyama, ..., Imami* bioRxiv 2021, 投稿準備中 2報)。特に、Aim 1は単に超遠心機で得たエクソソーム画分全てを質量分析するのではなく、分画プロファイルを得ることでより正確にエクソソーム関連タンパク質を特徴づけることができ、またAim 3ではエクソソームによる翻訳プロファイリングといった自分にしかだせない色が出せたと考えている。最もチャレンジであったAim 4に関しては、様々な生化学的な工夫を集結させることでようやく道筋が見えてきており、実際にエクソソームと相互作用するタンパク質を包括的に同定することに成功している。一方、Aim2のリン酸化プロファイルに関しては、技術は確立できており領域内の小根山博士と共同研究が進んでいるものの、生物学的解明となる糸口は未だに定まっておらず計画より遅れている。また、さきがけ内での共同研究も積極的に行い、領域全体にもプロテオミクスを通じて貢献できたと考えている。2020年度には、同領域二期生の吉田博士と共に分子生物学会で「細胞外微粒子とは何者なのか?」というテーマでワークショップも開催でき、オンラインでの開催となったが多くの研究者との交流があり、これもさきがけのおかげである。自身のキャリアとしては、さきがけ研究期間内に独立を目指していたが、残念ながらそれは叶わなかった。しかし、「さきがけ」のおかげで今後のキャリア形成に繋がる新たな研究分野・研究者・グラント・学会との出会いがあり、独立に向けて目下準備中である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

1) “Quantitative nascent proteome profiling by dual-pulse labelling with O-propargyl-puromycin and stable isotope-labelled amino acids.”

Uchiyama J, Ishihama Y, Imami K.

J Biochem. 2021 Mar 5;169(2):227-236. doi: 10.1093/jb/mvaa104

2) “pSNAP: Proteome-wide analysis of elongating nascent polypeptide chains.”

Uchiyama J, Roy R, Wang DO, Yoshino C, Mishima Y, Ishihama Y, Imami K.

bioRxiv 2021 doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.22.461445>, in revision

3) “Novel Roles of Small Extracellular Vesicles in Regulating the Quiescence and Proliferation of Neural Stem Cells.”

Zhang J, Uchiyama J, Imami K, Ishihama Y, Kageyama R, Kobayashi T.

Front Cell Dev Biol. 2021 Nov 4;9:762293. doi: 10.3389/fcell.2021.762293.

研究期間累積件数:4件

| |
|--|
| 1. Quantitative nascent proteome profiling by dual-pulse labelling with O-propargyl-puromycin and stable isotope-labelled amino acids. Uchiyama J, Ishihama Y, Imami K. J Biochem. 2021 Mar 5;169(2):227-236. doi: 10.1093/jb/mvaa104 |
| Aim 3 に関連して、エクソソームによる翻訳応答を包括的且つ定量的な評価可能なプロテオミクス技術を開発した。 |
| 2. pSNAP: Proteome-wide analysis of elongating nascent polypeptide chains.” Uchiyama J, Roy R, Wang DO, Yoshino C, Mishima Y, Ishihama Y, Imami K. bioRxiv 2021 doi: https://doi.org/10.1101/2021.09.22.461445 , in revision |
| Aim 3 に関連して、エクソソームによる翻訳応答を包括的且つ定量的な評価可能なプロテオミクス技術を開発した。上述の手法よりも、より安価かつ簡便な手法である。 |
| 3. Novel Roles of Small Extracellular Vesicles in Regulating the Quiescence and Proliferation of Neural Stem Cells.” Zhang J, Uchiyama J, Imami K, Ishihama Y, Kageyama R, Kobayashi T. Front Cell Dev Biol. 2021 Nov 4;9:762293. doi: 10.3389/fcell.2021.762293. |
| Aim 1 に関連して、エクソソーム内包タンパク質をプロテオミクス解析によりプロファイルし、神経幹細胞の静止と増殖を制御するエクソソームの新たな役割を明らかにした。 |
| 4. Biotinylation-based proximity labelling proteomics: basics, applications and technical considerations. Niinae T, Ishihama Y, Imami K. J Biochem. 2021 Dec 28;170(5):569-576. doi: 10.1093/jb/mvab123. |
| Aim 4 に関連して、エクソソームと相互作用するタンパク質を同定するための近接標識プロテオミクス手法に関連する総説、細胞外での近接標識プロテオミクスについても展望を記した。 |

(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)

受賞

- 1) Imami K Asia Oceania Human Proteome Organisation presentation award 2021
- 2) 今見考志 2019 年年度日本生化学会 第 16 回柿内三郎記念奨励研究賞
- 3) 今見考志 2019 年度日本プロテオーム学会 奨励賞

著者物

1) 今見考志、李優嘉

細胞外小胞のプロテオームプロファイリング

実験医学増刊号「EVs 細胞外小胞の生物学

主要な学会発表

1. 今見考志, 細胞外小胞の動態を包括的に捉えるプロテオミクス基盤技術の開発, (シンポジウム, ホスト: 武内敏秀「近畿大」), 第15回日本臨床ストレス応答学会, オンライン, 2021 年11月20日
2. 今見考志, 細胞外小胞の動態を捉えるプロテオミクス基盤技術, (ワークショップ, ホスト: 中野明彦「理研」), 第94回日本生化学大会, オンライン, 2021 年11月3日
3. Imami K, Proteomic technologies to monitor the cellular dynamics and responses induced by extracellular vesicle (ワークショップ, ホスト: 吉田知史「早稲田大」, 今見考志「京都大」), 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020 年12月2日
4. 今見考志, エクソソームの内包タンパク質・動態・細胞応答をモニターするプロテオミクステクノロジー, 日本分析化学会 第80回分析化学討論会, 北海道教育大学札幌校 (ホスト 北海道大学 渡慶次学 教授), 2020年5月23日 (新型コロナウイルスのため現地開催は中止)