

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07593

研究課題名(和文) 卵稚仔における分泌小胞エキソソームを介する個体間情報伝達の分子機序

研究課題名(英文) Exosome-mediated methylmercury detoxification in zebrafish embryos

研究代表者

今村 伸太郎 (Shintaro, Imamura)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・主任研究員

研究者番号：80510007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エキソソームは細胞間シグナル伝達を担う分泌小胞である。この小胞に含まれるシグナル分子が標的細胞に輸送され、生物活性を発揮する。本研究から、ストレス条件下の卵稚仔は互いに飼育水中にエキソソームを分泌し、個体群としてストレス耐性を獲得することが明らかになった。ゼブラフィッシュ胚モデルを用いてエキソソームの体内動態を観察した。エキソソームのタンパク質網羅的解析から、ストレス誘導性タンパク質が同定され、この遺伝子の欠損によりストレス感受性となった。以上から、エキソソームが個体間シグナル伝達媒体として重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are extracellular small granule vesicles produced by cells, and might mediate a signal transduction mechanisms to transfer the information between cells and organisms. They contain various molecular constituents, such as, proteins, DNA, mRNA and miRNA, and transfer molecules from cells through membrane vesicle trafficking. We found that exosomes were secreted by methylmercury (MeHg) treatment in zebrafish embryos, and the exosomes had protective functions. To visualize the dynamics of exosomes in vivo, cd63-GFP expressing zebrafish lines were used. Proteomic analysis of exosomes revealed that MeHg induced proteins were identified, and sensitivity to MeHg was associated with the presence of these proteins. These results indicated that exosome-mediated inter-individual communication played an important role under stress conditions.

研究分野：分子生物学

キーワード：エキソソーム メチル水銀 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

エキソソームは直径 20-150 nm の分泌小胞である。エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた小胞が多胞体に陥入して前駆体が形成され、細胞膜との融合により細胞外に放出される。エキソソームは細胞内のタンパク質や膜成分、有害化学物質および病原体の排出に利用されるだけでなく、タンパク質、mRNA、マイクロ RNA (miRNA)、DNA、低分子化合物などを体内の離れた細胞・組織に輸送する情報伝達の役割を果たすと考えられる。ほ乳類培養細胞を用いた研究から、細胞種ごとに異なった性質のエキソソームが分泌されることが知られている。例えば、癌細胞から分泌されるエキソソームは標的細胞へ miRNA を輸送し、遺伝子発現制御によって転移先の環境を整備する (Peinado *et al.*, 2012)。また、体内に感染した薬剤耐性マラリア原虫はエキソソームを介して薬剤感受性株へ耐性を付与する (Regev-Rudzki *et al.*, 2013)。このようにエキソソームは細胞間シグナル伝達に関与している。申請者は、ゼブラフィッシュ胚に重金属 (メチル水銀) を曝露すると、エキソソーム (直径 20-40 nm) が飼育水中に分泌されることを見出した (Yamashita *et al.*, 2013, Imamura *et al.*, 2013) (科研費 25660174)。この研究の過程で、培養シャーレ内に入れた胚の飼育密度によって、メチル水銀に対する感受性が変化することに気づいた。この現象は、エキソソームに含まれるタンパク質、miRNA、核酸等のシグナル分子が他の個体群に作用し、生体防御に関する生理機能が增强された結果であると考えられた。ゼブラフィッシュ胚を用いた研究からエキソソームには個体間シグナル伝達的作用があることが推定されるが、他の生物ではこのような現象は報告されていない。海産魚の種苗生産現場では、飼育密度による生体防御能の誘導効果が報告された。孵化後 1 日目のヒラメ仔魚を 0.31-30 尾/ml の密度で飼育すると、飼育密度が高い場合に生残率が高かった (Tagawa *et al.*, 2004)。エキソソームによる個体間のシグナル伝達が卵稚子の生体防御能に影響し、個体群の生残率の増加に寄与すると考えられる。近年、エキソソームの細胞間シグナル伝達媒体としての役割が注目され、その分子機構に関する研究が精力的に進められているが、個体間での情報伝達媒体としての役割は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本課題ではゼブラフィッシュ胚をモデル動物として用い、エキソソームの可視化技術を開発し、体内動態を確認した。次に、エキソソーム投与による生物活性を明らかにした。さらに、メチル水銀を投与されたゼブラフィッシュ胚から分泌されたエキソソームに含まれるタンパク質の網羅的解析によって生物応答のシグナル経路を推定した。

3. 研究の方法

CD63 と融合した GFP (GFP-CD63) 発現ベクターを導入したゼブラフィッシュ系統を作出した。PCR によって導入個体を選別した。胚の正常発生過程およびストレス条件下におけるエキソソームの形成および分泌を蛍光顕微鏡で観察した。重金属に対する誘導性は確認されているが、加えて高温および酸化ストレスに対する誘導性を調べた。飼育水中に分泌されたエキソソームに関しては、超遠心機 (100,000 × G, 1-3h) で分離し (Imamura *et al.*, 2013)、エキソソーム画分を得た。エキソソームのバイオマーカーとして、CD63 等を定量し、単離したエキソソームの化学性状を明らかにした。正常発生およびストレス条件下で分泌されたエキソソームを回収し、E3 培地で培養した 8 時間胚に投与した。ストレス誘導性エキソソームを野生型ゼブラフィッシュ胚の飼育水中に投与し、ストレスに対する生物活性を調べた。ゼブラフィッシュ胚の形態形成および致死率、生化学分析によってエキソソームの生物活性を測定した。エキソソームをストレス条件下 (メチル水銀システイン: 1-10 μM, 高温: 38 °C, 過酸化水素: 100 μM) で飼育した胚から調整し、E3 培地に投与し、正常状態およびストレス条件下でのゼブラフィッシュ胚の形態形成及び致死率を調べ、エキソソームの生物活性によってストレスに対する感受性が変化することを確認した。エキソソームのプロテオーム解析によって、エキソソームの生物活性に関わる分子を推定した。エキソソームからタンパク質を抽出し、iTAQ によってプロテオーム解析を行った。CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子欠損によって、エキソソームの生物活性が消失することを指標に生物活性を誘導する分子を同定した。

4. 研究成果

培養シャーレ内に入れた胚の飼育密度によって、メチル水銀に対する感受性が変化することを見出した。メチル水銀システイン (1-10 μM) を投与した飼育水中にゼブラフィッシュ胚 (受精後 8 時間胚) が 20-100 尾/ml となるように入れ、受精後 24 時間まで培養した。その結果、1 μM では 50 尾/ml 以上で、5 μM では 100 尾/ml で、10 μM では 100 尾/ml で飼育密度によるメチル水銀耐性の効果が確認された。

次に、密度効果の原因が胚どうしの接触が必要なのか明らかにするために、フィルターで区切り、上層に 200 尾を収容し、下層に密度効果が生じないよう 20 尾を収容した。フィルターは 40 μm 及び 0.4 μm メッシュを用いた。飼育水 (2ml) にメチル水銀システイン (2 μM) を投与した。その結果、上層に胚を入れない区では約 90% の個体が斃死したのに対し、上層に胚を入れると斃死率が約 50% まで低下した。0.4 μm メッシュでも効果が確認された。以上の結果から、胚どうしの接触

を介さず、飼育水の移動によってメチル水銀に対する耐性が獲得されることが確認された。

飼育水中に分泌されるエキソソームによって機能が発揮されることを証明するために、飼育水中に分泌されたエキソソームを超遠心分離によって回収し、密度効果が生じないよう 20 尾を収容したシャーレに投与した。その結果、エキソソーム画分をメチル水銀の毒性に対して耐性となり、発生異常率および致死率が低下した。

メチル水銀(5 μ M)投与区におけるエキソソームの分泌量をエキソソームマーカーである CD63 タンパク質を定量したところ、濃度依存的に飼育水中にエキソソームが分泌されたことが確認された。すなわち、飼育密度によるメチル水銀耐性は、胚から分泌されるエキソソームを介することが明らかになった。メチル水銀システイン(1 μ M)の曝露によって飼育水に分泌されるエキソソームを超遠心分離装置で濃縮し、ゼブラフィッシュ胚に再びマイクロインジェクション法によって注入(10nL)し、メチル水銀システイン(0.1-5 μ M)を曝露したところ、致死率が低下した。以上から、胚から分泌されるエキソソームを互いに共有することで、集団としてメチル水銀耐性を獲得していることが推察された。

エキソソームを可視化するために、膜タンパク質である CD63 と融合した蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを樹立した。このトランスジェニックフィッシュに高温、低温、酸化ストレス、メチル水銀曝露、線照射(DNAダメージ)等のストレスを与えると、中枢神経系および卵黄嚢に GFP 陽性細胞が局在することを確認した。GFP 陽性細胞が観察される発生段階はストレス種によって異なることが分かった。ストレス処理されたトランスジェニックフィッシュの飼育水を回収し、超遠心によって分離した。得られた画分にはトランスジェニックフィッシュから分泌された内在性の CD63 および蛍光標識された CD63 をウエスタンブロット法によって検出した。次に、分離された蛍光標識エキソソームを野生型ゼブラフィッシュ(受精後 8 時間)の飼育水に投与し、他個体への導入の有無を確認した。その結果、中枢神経系において微弱な蛍光シグナルを検出することに成功した。以上の結果から、生体においてエキソソームの発現と分泌を可視化することに成功した。

メチル水銀に対する感受性の低下のメカニズムを明らかにするために、エキソソーム画分に含まれるタンパク質を iTAQ 解析によって網羅的にタンパク質を同定した。同定された遺伝子に対する CRISPR/Cas9 を用いたノックアウトシステムを作出し、遺伝子の機能解析を進めた。細胞内の物質輸送を担うタンパク質の変異体(ヘテロ接合体及びホモ接合体)は、メチル水銀(0.01 μ M-100 μ M)曝露に對

して高感受性となった。メチル水銀システイン(10 μ M)曝露によって、野生型では 27.8% 斃死に対して、変異体では 100%斃死し、メチル水銀に対する感受性が亢進した。以上から、分泌されるエキソソームにはストレス耐性の作用があり、また、エキソソームに含まれるタンパク質がストレス耐性に関与することが推定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 6 件)

- (1) 今村 伸太郎, 加藤 智美, 世古 卓也, 石原 賢司, 山下 由美子, 司馬 肇, 藪 健史, Stale Ellingsen, Heidi Amlund, Anne-Katrine L.Haldorsen, 山下 倫明 Exosome-mediated methylmercury detoxification accelerated by selenium compound, selenoneine in aquatic organism, International Symposium Fisheries Science for Future generations (2017)
- (2) 山下 倫明, 今村 伸太郎, 山下 由美子, Identification of Selenoneine-methylmercury complex in animal tissues International Symposium Fisheries Science for Future generations (2017)
- (3) 今村 伸太郎, 加藤 智美, 藪 健史, 山下 倫明, Protective Role of the Ubiquitin-Selective Molecular Chaperone CDC48 in Cold Adaptation of a Poikilothermic Vertebrate, International Symposium Fisheries Science for Future generations (2017)
- (4) 今村 伸太郎, 加藤 智美, 世古 卓也, 石原 賢司, 山下 由美子, 司馬 肇, 藪 健史, Stale Ellingsen, Heidi Amlund, Anne-Katrine L.Haldorsen, 山下 倫明, Exosome-mediated methylmercury detoxification accelerated by selenium compound, selenoneine in aquatic organism, 第 11 回生物学医学セレン国際シンポジウム, 第 5 回環境健康セレン国際学会 合同学会 p201 (2017)
- (5) 今村 伸太郎, 加藤 智美, 世古 卓也, 石原 賢司, 山下 由美子, 司馬 肇, 藪 健史, Stale Ellingsen, Heidi Amlund, Anne-Katrine L.Haldorsen, 山下 倫明 Dynamics of secreted exosomes following methylmercury exposure in zebrafish models 第 89 回日本生化学会大会 p175, p89 (2016)
- (6) 今村 伸太郎, 山下 倫明, 藪 健史, Stale Ellingsen, Heidi Amlund, Anne-Katrine L.Haldorsen Exosome-mediated methylmercury detoxification in zebrafish

embryo 第 11 回水生動物の行動と神経系
シンポジウム p24 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 伸太郎 (IMAMURA Shintaro)

国立研究開発法人水産研究・教育機構

中央水産研究所・主任研究員

研究者番号：80510007