

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15066

研究課題名(和文) リゾビスフォスファチジン酸(LBPA)とS1Pシグナルのカップリング機構の解析

研究課題名(英文) Studies on the coupling mechanism between lysobisphosphatidic acid (LBPA) and S1P signaling

研究代表者

中村 俊一 (Nakamura, Shun-ichi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40155833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：エキソソーム系多小胞エンドソーム(MVE)の成熟を調節するS1Pの産生酵素スフィンゴシン・キナーゼ2(SphK2)の、MVEへのリクルート機序を調べた。MVEのマーカー脂質であるリゾビスフォスファチジン酸(LBPA)に焦点を絞り、SphK2との結合をオーバーレイ法を用いて解析した結果、SphK2はLBPAに強く結合することが分かった。次にSphK2-GFPとMVEのマーカーとしてCD63-mCherryをCOS7細胞に共発現させ、抗LBPA抗体を用いて免疫染色を行うと、LBPA陽性MVEにSphK2が存在しないケースも認められ、今後更なる詳細な検討が必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have studied the mechanism underlying how sphingosine kinase 2 (SphK2), which plays a key role to regulate the maturation of exosomal multivesicular endosomes (exosomal MVEs), is recruited to exosomal MVEs. We focused on a specific marker lipid for MVEs, lysobisphosphatidic acid (LBPA) for the recruitment of SphK2 to MVEs. We found a strong binding of SphK2 to this lipid as assessed by a dot-blot overlay assay. Next, immunocytochemistry of COS7 cells expressing both SphK2-GFP and CD63-mCherry with anti-LBPA antibody showed that there existed LBPA-positive MVEs, which were devoid of SphK2. Further studies are necessary to clarify the causal relationship between the two molecules.

研究分野：生化学

キーワード：スフィンゴシン1リン酸 S1P エンドソーム エキソソーム リゾビスフォスファチジン酸 LBPA

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の細胞はエンドサイトーシスを介して細胞外物質を細胞膜に覆われエンドソームのかたちで取り込み、初期エンドソームから後期エンドソームへと成熟する過程で、あるものはリサイクルされ細胞膜と融合し、またゴルジ体との活発な物質交換を行った後、後期エンドソーム / multivesicular endosome (MVE) となりリソゾームと融合することにより分解方向へと進む。このリソゾーム系 MVE への成熟過程は詳しく分かっており、ESCRT 系タンパク質に働きによりユビキチン化されたタンパク質を識別し、腔内小胞に選別輸送することにより MVE が形成され、最終的にリソゾームと融合することが分かっている。一方で、MVE のあるものは直接細胞膜と融合し、内部の小胞をエキソソームとして細胞外に放出することが知られる。エキソソームは細胞間情報伝達の重要な手段として注目され、免疫細胞間の抗原提示、プリオン病や神経変性疾患の病態の伝播、癌の悪性化に向けた微小環境形成に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。しかしながら、エキソソーム系 MVE の成熟機構についてはこれまで不明であった。最近、我々はスフィンゴ脂質の代謝産物、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) がエキソソーム系 MVE の成熟に必須であることを世界に先駆けて報告した (Nat Commun. 2013;4:2712. doi: 10.1038/ncomms3712.)。この発見によりエキソソーム系 MVE の腔内小胞への積荷分子のソーティング機構の理解は大いに進んだものの、どのような機構でエキソソーム系 MVE のみで S1P シグナルが発信され、リソゾーム系 MVE では起きないのかの疑問に対しては現在尚不明である。そこでこの度の研究で如何にしてエキソソーム系 MVE のみで S1P シグナルが活性化され積荷分子のエキソソーム系顆粒へのソーティングが

引き起こされるのかを明らかにしたい。

2. 研究の目的

MVE に特異的に集積する分子としてリソビスフォスファチジン酸 (LBPA) が知られ、この脂質に体する抗体が現在最も信頼性の高い MVE のマーカーとして用いられている。一方で我々はこれまでにエキソソーム系 MVE で S1P 産生を触媒する酵素としてスフィンゴシン・キナーゼ 2 (SphK2) を同定した (Nat Commun. 2013;4:2712. doi: 10.1038/ncomms3712.)。そこで SphK2 が特異的に LBPA と結合することにより、MVE にリクルートされるとの作業仮説を立て、精製 SphK2 を用いて LBPA との結合を証明することにより、SphK2 の MVE へのリクルート機構を明らかにしたい。更に免疫細胞染色を用いて、実際に SphK2 と LBPA が細胞内で共局在を示すことを証明し、SphK2 の LBPA に対する結合部位を同定し、更に LBPA に対する親和性の低い変異株を作成しその機能解析を行うことにより、MVE に於ける LBPA の役割を S1P シグナルの観点から明らかにしたい。

3. 研究の方法

ドット・プロット・オアバーレイ・アッセイに於いては、Hybond-C extra (Amersham) にクロロホルム / メタノール溶液に溶かしたそれぞれの脂質 (LBPA や PA) をプロットし、乾燥後 BSA 溶液でブロッキングを行い、精製された SphK2 と反応させ、その後洗浄を行った後、抗 SphK2 抗体を用いて抗体染色を行う。

免疫細胞染色に於いては COS7 細胞に SphK2-GFP とエキソソーム系 MVE のマーカータンパク質として CD63-mCherry をを発現させ、細胞を固定後に抗 LBPA 抗体を用いて免疫細胞染色を行い共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

細胞内顆粒輸送では初期エンドソームを構成する膜構成成分或いはタンパク質がダイナミックな代謝を受けることにより、あるものはリサイクルされ、またあるものは後期エンドソーム（多小胞エンドソーム、MVE）へと成熟することが知られる。しかしながらこれらの成熟を調節する分子機構については不明な点が多い。我々は多小胞エンドソームがエキソソーム系への成熟を調節する重要なシグナルとしてS1Pシグナルが存在することを見出した。エキソソーム系MVE上の膜に存在するS1P受容体はオートクン機構により持続的に活性化されており、この結果生じるGiタンパク質の解離がエキソソーム系の腔内小胞への積荷輸送に重要であるらしい。これらの一連の反応で重要な鍵を握るステップはS1P受容体のリガンドであるS1Pの産生酵素スフィンゴシン・キナーゼ2（SphK2）のエキソソーム系MVEへのリクルートである。別のアイソザイムであるSphK1は細胞内オルガネラへのリクルートを促すターゲット分子としてフォスファチジン酸（PA）知られているが、SphK1はMVEにはリクルートされないことから、我々はMVEの特異的マーカー脂質であるリゾピスフォスファチジン酸（LBPA）に焦点を絞り、SphK2との結合を調べた。これら両者の結合をドット・プロット・オーバーレイ・アッセイを用いて解析した結果、SphK2はLBPA、PAの両脂質に結合することが分かった。一方でSphK1はこれまでの報告通りPAに対しては結合するものの、LBPAに対しては結合しなかった。次にSphK2-GFPとエキソソーム系MVEのマーカータンパク質としてCD63-mCherryをCOS7細胞に共発現させ、細胞を固定化後抗LBPA抗体を用いて免疫染色を行うと、LBPA、CD63共に陽性エンドソームにSphK2の多くは存在するものの、一部のSphK2は、LBPA陰性、CD63陽性エンドソームにも存在するケースが認められ、今後更に詳細な検討が必要であることが明らかとなった。以上の結果から *in vitro* の系ではSphK2

とLBPAの結合を証明できたものの、細胞内局在に於いてはLBPAの存在しないエキソソーム系MVEにもSphK2が存在することから、LBPAとは別の分子がエキソソーム系MVEにSphK2をリクルートする可能性が高まった。今後、LBPA以外の後期エンドソームマーカーとしてフォスファチジル・イノシトール(3,5)ニリン酸（PI3,5-P₂）にも標的を広げ、更にSphK2のエキソソーム系MVEへのリクルート機序を調べる予定である。

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 2 件)

- (1) Shimono, Y., Mukohyama, J., Nakamura, S., Minami, H. MicroRNA Regulation of Human Breast Cancer Stem Cells. J. Clin. Med. 2015 Dec 25;5(1). pii: E2. doi: 10.3390/jcm5010002.
- (2) 梶本武利、岡田太郎、中村俊一 エキソソームの形成機構 細胞工学 34巻 2015年 168-173

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) Nakamura, S. "Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes" "Invited lecturer" 12th International Congress of the Polish Neuroscience Society, September 6-8, 2015, Gdansk, Poland

〔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

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gs/field/basic/biochem.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村俊一 (NAKAMURA, Shun-ichi)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40155833

(2) 研究分担者

岡田太郎 (OKADA, Taro)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80304088

(3) 研究分担者

梶本武利 (KAJIMOTO, Taketoshi)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00509953