

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02623

研究課題名(和文) S1Pシグナルを介したエキソソーム放出の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism underlying S1P signal-mediated exosome release

研究代表者

中村 俊一 (Nakamura, Shun-ichi)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40155833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：エキソソームは多少砲エンドソーム(MVE)が細胞膜と融合することで内部の小胞が細胞外に放出されたもので、細胞間情報伝達的手段として注目を集める。我々はMVE膜上にスフィンゴシン1リン酸(S1P)の産生酵素スフィンゴシン・キナーゼ2が集積し、持続的にS1P受容体を活性化することがMVEへの積荷輸送に重要であることを見出した。またS1Pは直接プロテイン・キナーゼCに結合し、活性化することでMVEのリソゾーム活性を調節している可能性を示した。更にパーキンソン病の原因タンパク質、シヌクレインはS1P受容体に作用し、Gタンパク質との脱連関を引き起こすことで病気の進展に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MVEの成熟調節に受容体を介するS1Pシグナルが関与していることを我々が見出した。S1Pの作用機序には受容体を介する機序と受容体を介さず直接対象分子に作用する機序が想定されている。今回我々はS1Pが直接プロテイン・キナーゼC(PKC)に結合し、活性化することで対象タンパク質をリン酸化することにより機能調節を行っている可能性を提唱した。スフィンゴシン・キナーゼやPKCのホモログは共に酵母からヒトに至る真核生物に存在しリソゾーム機能を調節し、脊椎動物から獲得したS1P受容体を介してエキソソーム系MVEが調節されるとする我々の研究結果は系統発生の観点からも重要な学術的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Endosomes undergo maturation to late endosomes/multivesicular endosomes (MVEs), which ultimately fuse with lysosomes for digestion of the ingredients, while some of MVEs fuse with the plasma membranes to release the intraluminal vesicles as exosomes. We have uncovered that constant activation of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors on MVE membranes by sphingosine kinase 2-catalyzed formation of S1P is required for the cargo sorting into exosomal MVEs. We also found that S1P directly binds to atypical protein kinase C and activate its enzymatic activity, suggesting a role in the regulation of lysosomal function. We also revealed that extracellular treatment of neurons with synuclein, a critical protein of Parkinson's disease, causes uncoupling of S1P1 receptor from Gi and subsequent suppression of cargo sorting into exosomes. We proposed a potential involvement of this phenomenon in the development of the disease pathology.

研究分野：生化学

キーワード：S1P スフィンゴシンキナーゼ ホスホイノシタイド エキソソーム パーキンソン病 マクロピノサイトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

エキソソーム (exosome) は直径 50-100nm の生体膜で包まれた細胞外顆粒で、血漿や脳脊髄液などを循環している。エキソソームは様々な正常細胞や「病的」な細胞から放出され、エキソソーム内容物であるタンパク質、脂質、ヌクレオチド (mRNA やマイクロ RNA) 等の積荷分子を遠隔細胞に供給することから、細胞間情報伝達の新たな手段として多くの注目を集めている。また、パーキンソン病などの神経変性疾患においても、シヌクレイン等の原因タンパク質のエキソソームとしての放出が病巣の伝播に関与していると考えられている。

エキソソームの放出メカニズムに関しては、まずエンドサイトーシス等によって細胞内に取り込まれた外部成分などが生体膜で被包され初期エンドソームとなり、成熟を経て後期エンドソーム/多小胞エンドソーム (MVE) となる。MVE はリソソームと融合して分解経路をたどるか、また或るものは細胞膜と融合して内容物の小胞をエキソソームとして細胞外に放出される運命をたどる。分解系の経路に関しては、酵母を用いた液胞へのタンパク質輸送の研究より ESCRT 系経路が発見され、ほ乳類でもこの経路が利用されていることが知られる。一方で、ほ乳類の細胞系ではエキソソーム系の経路は ESCRT 非依存性であることが証明されるが、その実態は依然として不明であった。最近、ドイツの研究者らによりスフィンゴ脂質の代謝産物セラミドがエキソソーム系の MVE の成熟に重要であることが報告され (Trajkovic, K. et al. (2008) Science 319, 1244)、ESCRT 非依存性経路の分子メカニズムが提案された。更に我々の研究室ではスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の産生酵素スフィンゴシン・キナーゼ 2 (SphK2) がエキソソーム系の MVE に特異的に集積し、そこで S1P を産生し、MVE 膜上に存在する S1P 受容体を持続的に活性化し続けていることを見出し、この現象がエキソソームへの積荷輸送調節に関与していることを見出した (Kajimoto et al. (2013) Nature Commun. 4, 2712)。また、最近我々は、パーキンソン病の原因タンパク質として知られるシヌクレインを細胞外から神経細胞に作用させると、S1P 受容体の 1 型サブタイプ S1P<sub>1</sub> 受容体と抑制性 G タンパク質 Gi との脱連関が引き起こされるを明らかにした (Zhang, L. et al. (2017) Sci. Rep. 7, 44248)。このことはパーキンソン病に於いては S1P 受容体の脱連関を介したエキソソーム小胞の成熟抑制が起きている可能性を示唆している。これらの背景から S1P シグナルを介する小胞輸送の調節と病気との関連に関して更なる解明が望まれていた。

## 2. 研究の目的

本研究では S1P シグナルを介する小胞輸送の調節、特に SphK2 の後期エンドソーム / MVE へのターゲット機構の解明さらには S1P 受容体を介さない機序による小胞輸送の可能性について研究を行った。また S1P シグナルを介する小胞輸送の調節と病気との関連としてパーキンソン病の病態を S1P<sub>1</sub> 受容体の G タンパク質との脱連関およびエキソソーム系 MVE の成熟の観点から解析を行った。

特にパーキンソン病の 9 割以上を占める特発性パーキンソン病の病態解析は進んでいないが、同疾患患者の血清にシヌクレインが健常者に比べ高濃度存在することが報告されている。そこでシヌクレインによる S1P<sub>1</sub> 受容体 / Gi タンパク質シグナルの遮断による内因性のシヌクレインのエキソソームからの放出阻害による細胞内濃度の上昇を証明し、レビー小体形成を実験的に証明することで、パーキンソン病の病態解析を行うことを目的にしている。

## 3. 研究の方法

<マクロピノサイトーシスの SphK2/S1P シグナルによる調節>

ガラスボトムディッシュに培養された COS7 細胞を 18 時間血清無添加の DMEM 培地で培養した後、FITC でラベルされたデキストランを加え、10 ng/ml EGF で 10 分間細胞を刺激した後、パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてマクロピノサイトーシスを観察した。この際必要に応じて細胞を SphK1 や SphK2 に対する siRNA を用いて目的タンパク質の発現をダウンレギュレーションさせた細胞とコントロール siRNA 処理した細胞の形質を比較することにより各 SphK の機能を推定した。

<細胞外 -Syn によるエキソソーム小胞への積荷(内在性 -Syn)阻害の証明>

S1P<sub>1</sub> 受容体-CFP とラフトに集積することが知られるフロチリン 2-YFP を共に発現するヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に野生型シヌクレイン (-Syn) 或いは家族性パーキンソン病の変異型 Syn (A53T) をそれぞれ 1 μM、18 時間処理した細胞を固定後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてアクセプター・フォトブリーチ法により FRET 効率を測定し、フロチリン 2-YFP と S1P<sub>1</sub> 受容体-CFP の結合・解離を測定し、無処理の細胞と比較した。

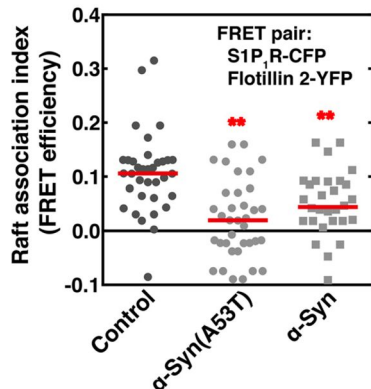
#### 4. 研究成果

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、癌の悪化に關与する微小環境形成やパーキンソン病などの病態の播種などにも重要であることが分かってきた。我々は最近スフィンゴシン 1 リン酸(S1P)の産生酵素スフィンゴシン・キナーゼ 2 (SphK2)が多小胞エンドソーム(MVE)に集積し、MVE上でS1P1受容体を持続的に活性化することがエキソソーム系MVEへの成熟に必須であることを発見した(1)。多小胞エンドソーム(MVE)はリソソームと融合して分解経路をたどるか、また或るものは細胞膜と融合して内容物の小胞をエキソソームとして細胞外に放出される運命をたどる。SphKは酵母からほ乳類に到る真核生物でよく保存されており、リソソーム(液胞を含む)/オートファジーの分解系の調節に重要な働きをすることは良く知られる。

一方で、これまでの国内外の研究からリソソーム機能にはPKCやAKTなどのタンパク質リン酸化酵素が關与していることが知られる。そこでS1Pとこれらのタンパク質リン酸化酵素( protein kinase, PK )とのクロストークに照準を合わせ、各種PKの特異的基質をプローブに用い、S1Pによる活性化スクリーニングを行った。このスクリーニングの原理はPKの基質プローブがリン酸化を受けることにより引き起こされる構造変化を 1 分子FRETによる蛍光変化として検出するものである。このセンサープローブを用いて我々は、S1Pが直接protein kinase C ( PKC ) と結合し、同酵素を活性化することを見出した(2)。学術的には、酵母からヒトまでのほぼ全ての真核生物でSphK/S1P系を用いてリソソーム(液胞を含む)機能が調節され、脊椎動物から獲得したS1P受容体を用いてエキソソーム系エンドソームの成熟が調節されることから(我々の発見)、エンドソームの成熟とS1P作用機序に系統発生的に密接な関係が伺える。この意味においてS1P受容体を介さないS1P/PKC 系によるリソソーム機能調節機構を確立することは系統進化論的にも重要な学術的意義を有する。

他方、MVE 上で S1P1 受容体を持続的に活性化する際重要である SphK2 の MVE 膜上へのリクルート機序に関しては不明であった。この機序を解明するために我々はマクロピノサイトーシスによるデキストランの取り込みの結果生じるマクロピノソームを実験モデルとして用いた。マクロピノソームはリソソームと融合する一方で、一部は細胞膜と融合しリサイクルされることが知られ、MVE との類似性から細胞内小胞輸送研究によく用いられる。SphK1-GFP、SphK2-GFP を HeLa 細胞に発現させ EGF 刺激後のデキストランの取り込みを観察したところ、SphK1-GFP、SphK2-GFP は共にマクロピノソーム膜上に集積が認められ、同現象に対する S1P の關与が示唆された。我々はこれまでに SphK に対するアダプタータンパク質、RPK118 を発見した(3)。RPK118 は N 末に PI3P などのホスホイノシタイドと結合しうる PX ドメインを有しており、この分子を介して SphK がマクロピノソームにリクルートされると考えた。そこで細胞を予め PI3 キナーゼのインヒビター、LY294002 で処理したところ、SphK1 及び SphK2 のマクロピノソーム膜上の集積は抑制されず、当初の予測された RPK118 を介して PI3P に SphK1 及び SphK2 が引き寄せられるとする仮説は証明できなかった。エンドソームは初期エンドソームから後期エンドソームへと成熟するにつれてエンドソーム膜上のホスホイノシタイドが PI3P から PI3,5P<sub>2</sub> に変換することも知られており、この可能性も含めて現在更に解析中である。しかしながら、siRNA を用いたノックダウン実験で SphK1 や SphK2 の発現を抑制すると、マクロピノサイトーシスが強く抑制されることからこれらの酵素が、マクロピノサイトーシスに重要であることを見出し報告した(4)。

パーキンソン病の病態解析に関しては、ほとんどの研究が全体の数%を占める家族性パーキンソン病( -Syn や PARKIN 等の変異による )をモデルにしているが、全体の 9 割以上を占める特発性パーキンソン病の病態解析は進んでいないのが現状である。我々は特発性パーキンソン病患者の血清や脳脊髄液中に健常者に比べ高濃度の -Syn が存在することをヒントに、細胞外の -Syn の機能を調べる過程で、偶然同タンパク質が S1P<sub>1</sub> 受容体の脱連関を引き起こすことを見出した。そこで本研究ではパーキンソン病の病態に於ける S1P シグナルの關与を特に本疾患の原因タンパク質と考えられる -Syn の病態機能を中心にレビー小体形成メカニズムを解明することを目的に研究を進めてきた。初年度の研究結果から -Syn を細胞に添加することにより S1P<sub>1</sub> 受容体が細胞膜の「情報ステーション」脂質ラフト画分から駆逐されることをラフトに局在するたんぱく質 Flotillin 2-YFP と S1P<sub>1</sub> 受容



体-CFP を用いた FRET 解析により証明し(図)、細胞外 -Syn による S1P<sub>1</sub> 受容体と Gi タンパク質との脱連関(アンカップリング)が引き起こされるメカニズムを提示した(5)。しか

しながら、このアンカップリングは  $\alpha$ -Syn を細胞内で発現させた場合は認められず、細胞膜の外側に多く存在する脂質、特にガングリオシドとの結合が重要な役割を果たしているものと推測される。また、パーキンソン病患者にガングリオシド製剤を投与すると患者の運動機能が亢進したとする報告もあり、今後更に細胞外  $\alpha$ -Syn とガングリオシドの関係を調べる必要がある。細胞外の  $\alpha$ -Syn が S1P<sub>1</sub> 受容体のアンカップリングにより G タンパク質シグナルが遮断され、エキソソームの積荷としての  $\alpha$ -Syn が細胞外に放出されず、細胞内  $\alpha$ -Syn 濃度が上昇し同タンパク質の凝集（レビー小体形成）が引き起こされる可能性はある。他方、MVE はオートファゴソームなどと共にリソゾームと融合し、分解されることも知られる。この分解系への影響も細胞内  $\alpha$ -Syn 濃度の調節に重要な影響を有している。酵母ではリソゾーム（液胞）機能が S1P により調節されていることが知られる。ヒトに於ける S1P によるリソゾーム機能の調節も今後の重要な課題である。これらの S1P を介した機序による細胞内  $\alpha$ -Syn の濃度上昇とレビー小体形成の関連を明らかにすることが望まれる。

<引用文献>

- (1) Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., & Nakamura, S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat. Commun.* **4**, 2712 (2013)
- (2) Kajimoto, T., Caliman, A.D., Tobias, I.S., Okada, T., Pilo, C.A., Van, A.N., Andrew McCammon, J., Nakamura, S., and Newton, A.C. Activation of atypical protein kinase C by sphingosine 1-phosphate revealed by an aPKC-specific activity reporter. *Sci. Signal.* **12**, pii: eaat6662 (2019)
- (3) Hayashi, S., Okada, T., Igarashi, N., Fujita, T., Jahangeer, S., & Nakamura, S. Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 33319-33324 (2002)
- (4) Involvement of Receptor-Mediated S1P Signaling in EGF-Induced Macropinocytosis in COS7 Cells. Matovelo SA, Zhang L, Mohamed NNI, Kajimoto T, Ijuin T, Okada T, Nakamura S. *Kobe J Med Sci.* **3**, 66, E94-E101 (2020)
- (5) Badawy, S. M. M., Okada, T., Kajimoto, T., Hirase, M., Matovelo, S. A., Nakamura, S., Yoshida, D., Ijuin, T., and Nakamura, S. Extracellular  $\alpha$ -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **293**, 8208-8216 (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kajimoto T, Caliman AD, Tobias IS, Okada T, Pilo CA, Van AN, Andrew McCammon J, Nakamura SI, Newton AC	4. 巻 12(562)
2. 論文標題 Activation of Atypical Protein Kinase C by Sphingosine 1-phosphate Revealed by an aPKCspecific Activity Reporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 eaat6662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aat6662.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Badawy Shaymaa Mohamed Mohamed, Okada Taro, Kajimoto Taketoshi, Hirase Mitsuhiro, Matovelo Shubi Ambwene, Nakamura Shunsuke, Yoshida Daisuke, Ijuin Takeshi, Nakamura Shun-ichi	4. 巻 293
2. 論文標題 Extracellular -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G-protein signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8208 ~ 8216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.001986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mohamed Nesma Nabil Ibrahim, Okada Taro, Kajimoto Taketoshi, Nakamura Shun-ichi	4. 巻 25;63(4)
2. 論文標題 Essential Role of Sphingosine Kinase 2 in the Regulation of Cargo Contents in the Exosomes from K562 Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 E123-E129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村俊一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 337
3. 書名 セラミド研究の新展開	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊集院 壮  (Ijuin Takeshi)  (00361626)	神戸大学・医学研究科・助教    (14501)	
研究分担者	梶本 武利  (Kajimoto Taketoshi)  (00509953)	神戸大学・医学研究科・助教    (14501)	
研究分担者	岡田 太郎  (Okada Taro)  (80304088)	神戸大学・医学研究科・准教授    (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------