

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06815

研究課題名（和文）開口分泌小胞形成過程における脂質二重膜の生理機能とその破綻による病態の解明

研究課題名（英文）Understanding the anchoring disruptor or modulator of subunits of the exocyst provides a new therapeutic strategy for various diseases.

研究代表者

田中 俊昭（Tanaka, Toshiaki）

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70536987

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：開口分泌小胞は細胞内の様々な物質を細胞外へ分泌するのみならず、細胞間および遠隔組織への情報伝達的手段として機能する。一方で細胞遊走、細胞周期、アポトーシス、細胞間接着などの細胞内の機能にも重要な役割を担うことが明らかとなりつつある。今回の研究において、開口分泌小胞の構成要素の1つであるSec6が、タンパク質脱リン酸化酵素であるPP2Aの複合体形成に大きく関与し、その結果p90RSK、GSK3betaのタンパク質脱リン酸化に関わることを明らかにした。細胞内でのある特定タンパク質の脱リン酸化は細胞内シグナル伝達の重要な要素であることから、Sec6が様々な疾患に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、開口分泌小胞の構成要素の1つであるSec6が、細胞内でのある特定タンパク質の脱リン酸化に関与し、様々な疾患に関わる可能性を提示した。開口分泌小胞は、唾液、血液、尿に含まれており、現在では比較的容易に回収・解析が可能である。開口分泌小胞の構成要素の研究が進み、様々な病態に関与することがさらに解明されれば、非侵襲的な方法で病気の早期発見や病態把握に寄与できる。また、開口分泌小胞の構成要素をターゲットとした新たな薬剤の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sec6 is one of the subunits of the exocyst, an evolutionarily conserved eight-protein complex comprising Sec3 (EXOC1), Sec5 (EXOC2), Sec6 (EXOC3), Sec8 (EXOC4), Sec10 (EXOC5), Sec15 (EXOC6), Exo70 (EXOC7) and Exo84 (EXOC8) subunits. Recently, several researches have showed that Sec6 is associated with various cellular mechanisms such as neurite growth, cell adhesion, cell polarity, cell migration, cell cycle, NF- $\kappa$ B signaling, and apoptosis. These functions may be dependent or independent on its basic role of Sec6 in exocytosis. However, the relationship between Sec6 and PP2A in the Raf-MEK-ERK-p90RSK cascade is still largely unclear. We demonstrate that Sec6 regulates PP2A phosphatase activity through the modulation of the binding of PP2A-A and PP2Ac subunit, thereby modulating the phosphorylation of p90RSK at Thr359 and Ser380 and glycogen synthase kinase 3 at Ser9 and the expression of zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), Vimentin, and zonula occludens 3 (ZO-3).

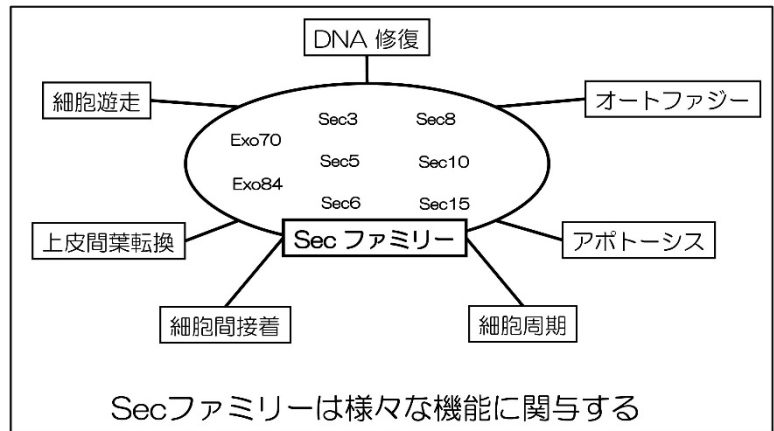
研究分野：組織学

キーワード：開口分泌小胞 脱リン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エキソサイトーシスとは、細胞外への分泌形態の1つであり、開口分泌現象を指す。エキソサイトーシスによって細胞内から細胞外へ放出される小胞は、エキソソームと呼ばれ、分泌細胞由来のRNAやタンパク質が内包されている。



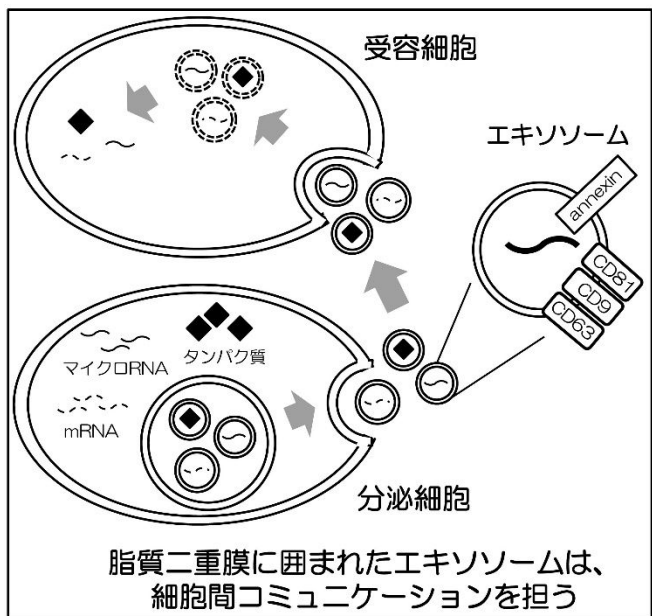
このエキソソーム内の内包物

cargoは、他の細胞へ運ばれ細胞間コミュニケーションに寄与する(右図)。従来、エキソサイトーシスによって細胞から分泌される直径 30~100nm の脂質二重膜に囲まれたエキソソームは、細胞内の老廃物を排出する役割のみを担うと考えられてきた。

しかし、エキソソームの内包物である cargoは、さまざまなマイクロRNA、メッセンジャーRNA、タンパク質を含んでおり、受け取った細胞内の遺伝子発現などに影響を与え、変化をもたらす。従ってエキソソームを介した細胞相互作用は、心臓、免疫系、中枢神経系などの生理機能に深く関わっている。このためエキソソームは、心筋梗塞、糖尿病、アルツハイマー病や癌の悪性化など、様々な疾患に寄与している可能性が示唆されている。

一方で、エキソソームに関する研究は発展しているが、エキソソームを介した細胞間相互作用がどのようなメカニズムで特定の分泌細胞と受容細胞との間で精密な選択性を持って行われているのか不明な点が多い。

一方で、エキソソームに関する研究は発展しているが、エキソソームを介した細胞間相互作用がどのようなメカニズムで特定の分泌細胞と受容細胞との間で精密な選択性を持って行われているのか不明な点が多い。近年、開口分泌に際して、エキソソームを細胞質と形質膜の間を輸送する働きをする分子である Secファミリーが細胞内や細胞間の様々な機能やシグナル伝達に寄与することが報告されている(右上図)

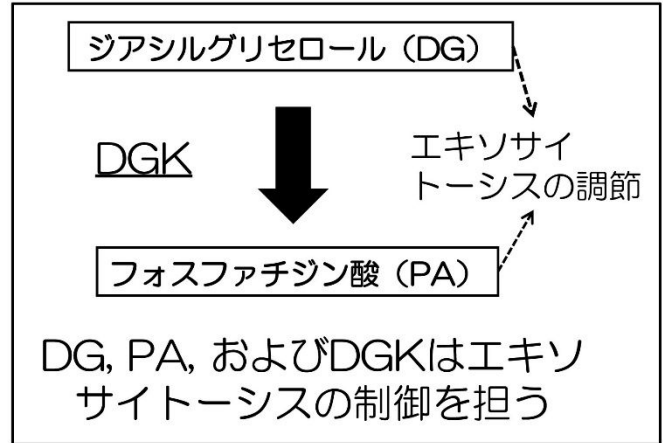


一方で、細胞の形質膜や細胞内小器官を厳格に区画するために重要な働きをしているのが、脂質二重層である。この脂質二重層を構成しているのは、両親媒性の特徴を持つリン脂質であり、リン脂質はグリセロ脂質ジアシルグリセロール(DG)を起点として合成される。DGは、DGキナーゼ(DGK)によってリン酸化され、フォスファチジン酸(PA)に変換される。最新の報告では、神経細胞におけるシナプス小胞のエキソサイトーシスの調節にPAとDGが深く関与し(右下図)、さらにこのPAとDGの量的変化を司るDGKの働きに注目が集まっている。しかし、エキソソームはその放出に由来する細胞種によって、構成する脂質二重膜の構造や分子に違いがあること、また cargoの中身によってもエキソソームの構造や構成する分子に違いが生じること、エキソソームを構成する脂質二重膜の違いによって、エキソソームの細胞質と形質膜間の輸送過程に変化が生じることが示唆されているが詳細な解析はなされていない。またPA、DG、DGKによるエキソサイトーシスの調節メカニズムについては、解明されていない点が多い。近年、開口分泌に際して、エキソソームを細胞質と形質膜の間を輸送する働きをする分子である Secファミリーが細胞内や細胞間の様々な機能やシグナル伝達に寄与することが報告されている(右上図)。

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

一方で、細胞の形質膜や細胞内小器官を厳格に区画するために重要な働きをしているのが、脂質二重層である。この脂質二重層を構成しているのは、両親媒性の特徴を持つリン脂質であり、リン脂質はグリセロ脂質ジアシルグリセロール(DG)を起点として合成される。DGは、DGキナーゼ(DGK)によってリン酸化され、フォスファチジン酸(PA)に変換される。最新の報告では、神経細胞におけるシナプス小胞のエキソサイトーシスの調節にPAとDGが深く関与し(右下図)、さらにこのPAとDGの量的変化を司るDGKの働きに注目が集まっている。

しかし、エキソソームはその放出に由来する細胞種によって、構成する脂質二重膜の構造や分子に違いがあること、また cargo の中身によってもエキソソームの構造や構成する分子に違いが生じること、エキソソームを構成する脂質二重膜の違いによって、エキソソームの細胞質と形質膜間の輸送過程に変化が生じることが示唆されているが詳細な解析はなされていない。またPA, DG, DGKによるエキソサイトーシスの調節メカニズムについては、解明されていない点が多い。



2. 研究の目的

本研究では、エキソソームの脂質二重に膜の構造とその形成過程に着目し、エキソソーム脂質二重膜の構造変化によって、エキソソーム分泌過程がどのように変化するか、エキソソーム内の内包物 cargo の中身によってエキソソーム脂質二重膜の構造が変化するかを解明し、その破綻によって生じる病態の発症機構を追求することを目的とする。

3. 研究の方法

1) エキソソーム形成過程における脂質二重膜の構造解析

エキソソームの解析には、マグネットビーズを利用したアフィニティー法を用いて、高純度なエキソソームを回収する。脂肪酸に特化した質量分析によってエキソソーム脂質二重膜中のDG, PA量を測定し、エキソソームを分泌する細胞種によって、DG, PA量に違いがあるか検討する。さらにDGをPAに変換するDGKアイソザイムの含有量を調べ、エキソソーム内容物によってDG, PA, DGK量にどのような変化があるかをウェスタンブロット、免疫細胞化学および免疫電顕にて精査する。

2) エキソソーム脂質二重膜と形質膜癒合機構の解明

分泌細胞からエキソソームが放出される際に、分泌細胞内でエキソソームは、形質膜と癒合し放出され、その後、受容細胞の形質膜にエキソソーム二重膜が癒合することで取り込まれる。この一連の過程におけるエキソソーム二重膜のDG, PAをGFPにて蛍光標識し、その動的变化を蛍光ライブイメージングにて精査する。この過程においては、Secファミリーもエキソソームの形質膜癒合に関与しているため、Secファミリーの過剰発現またはノックダウン実験により、エキソソーム二重膜と形質膜との癒合機構に変化が生じるか、エキソソーム二重膜の構造に変化が生じるかをウェスタンブロットおよび免疫細胞化学にて検討する。

3) エキソソーム脂質二重膜構造と形質膜癒合機構の破綻がもたらす病態の解明

各種疾患モデルマウス(神経変性モデルマウス、心筋梗塞モデルマウス、糖尿病モデルマウスなど)から血液・尿・唾液など体液中や臓器から抽出したエキソソーム解析を行い、エキソソームの脂質二重膜構造に変化が生じているかを脂肪酸に特化した質量分析によって検証し、

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

エキソソームの内容物の変化もウェスタンブロットおよびリアルタイム PCR にて精査する。さらにこれら疾患モデルマウスから得られたエキソソームを正常細胞や正常マウスに濃縮投与することで、同様の疾患を引き起こすかを生化学的手法や学習行動実験を駆使して検証する。

4) エキソソーム脂質二重膜構造に着目したドラッグデリバリーシステムの開発  
エキソソームを分泌する細胞種やその内容物によって、DG, PA 量の違いが明らかにすることによって、特定の臓器や疾患部位に選択的で高精度な薬剤投与の新しいツールとして応用できる。そのために、人工的に脂肪酸を配列したエキソソーム脂質二重膜を合成し、マウスを用いて標的臓器にどの程度取りこまれるかを定量解析し、新規ドラッグデリバリーシステムの構築に向けた研究を行う。

4 . 研究成果

発表論文

Tanaka T\*, Iseki K, Tanaka K, Nakano T, Iino M, Goto K:

DGKz ablation engenders upregulation of p53 level in the spleen upon whole-body ionizing radiation. *Advances in Biological Regulation* 67:93-100, 2018.

Tanaka T\*, Goto K, Iino M:

Sec6 enhances cell migration and suppresses apoptosis by elevating the phosphorylation of p38 MAPK, MK2, and HSP27.

*Cellular Signalling* 49: 1-16, 2018.

Nakano T, Ogasawara S, Tanaka T, Hozumi Y, Yamaki A, Sakane F, Shirai Y, Nakamura T,

Yanaka M, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y, Goto K:

DgMab-6: Antihuman DGK $\gamma$  Monoclonal Antibody for Immunocytochemistry.

*Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy* 37: 229-232, 2018.

Nakano T, Ogasawara S, Tanaka T, Hozumi Y, Sano M, Sayama Y, Yamada S, Shirai Y,

Kaneko MK, Kato Y, Goto K:

DzMab-1: Anti-Human Diacylglycerol Kinase $\zeta$  Monoclonal Antibody for Immunocytochemistry.

*Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy* 38: 179-182, 2019

Tanaka T\*, Hozumi Y, Martelli AM, Iino M, Goto K:

Nucleosome assembly proteins NAP1L1 and NAP1L4 modulate p53 acetylation to regulate cell fate.

*BBA Molecular Cell Research* Dec;1866(12):118560. 2019.

Tanaka K, Tanaka T\*, Nakano T, Hozumi Y, Yanagida M, Araki Y, Iwazaki K, Takagi M, Goto K:

Knockdown of DEAD-box RNA helicase DDX5 selectively attenuates serine 311 phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 subunit and expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2.

*Cellular Signalling* 65: 109428. 2020.

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

Akimoto R, Tanaka T\*, Nakano T, Hozumi Y, Kawamae K, Goto K:

DGK $\zeta$  depletion attenuates HIF-1 $\alpha$  induction and SIRT1 expression, but enhances TAK1-mediated AMPK $\alpha$  phosphorylation under hypoxia.

Cellular Signalling 71: 109618. 2020.

Tanaka T\*, Nakano T, Hozumi Y, Alberto M. Marteli, Goto K:

Regulation of p53 and NF- $\kappa$ B transactivation activities by DGK $\zeta$  in catalytic activity-dependent and -independent manners.

BBA Molecular Cell Research, 1868:118953, 2021

また、開口分泌小胞体の構成要素の1つである Sec6 は、プロテインホスファターゼの1つである PP2A がターゲット分子との結合において、プラットフォーム、またはスキャホールド的な働きがあることを見出した。このことは、Sec6 が細胞内における様々な分子の機能において、on/off に関わるリン酸化と脱リン酸化を調節することを示唆するものである。このことは、開口分泌小胞の脂質二重膜における膜タンパクのリン酸化を調節することを意味し、分泌小胞が細胞内において形成される過程や、分泌小胞が内包するタンパク質や RNA への影響が出ることによって、分泌小胞を介した細胞間伝達へも影響を与えることが示唆された。癌化や炎症において、PP2A の機能は破綻し細胞内における正常な脱リン酸化が機能不全に陥ることから、開口分泌の正常な放出や細胞間コミュニケーションについても病的状況下においては、機能不全に陥っている可能性が示唆された。現在、これらの研究成果を論文にまとめ発表の準備を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Toshiaki, Nakano Tomoyuki, Hozumi Yasukazu, Martelli Alberto M., Goto Kaoru	4. 巻 1868
2. 論文標題 Regulation of p53 and NF- B transactivation activities by DGK in catalytic activity-dependent and -independent manners	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 118953 ~ 118953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2021.118953	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 Tanaka Toshiaki, Nakano Tomoyuki, Hozumi Yasukazu, Martelli Alberto M., Goto Kaoru	4. 巻 1868
2. 論文標題 Regulation of p53 and NF- B transactivation activities by DGK in catalytic activity-dependent and -independent manners	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 118953 ~ 118953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2021.118953	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 Akimoto Ryo, Tanaka Toshiaki, Nakano Tomoyuki, Hozumi Yasukazu, Kawamae Kaneyuki, Goto Kaoru	4. 巻 71
2. 論文標題 DGK depletion attenuates HIF-1 induction and SIRT1 expression, but enhances TAK1-mediated AMPK phosphorylation under hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109618 ~ 109618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2020.109618	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 Tanaka Ken, Tanaka Toshiaki, Nakano Tomoyuki, Hozumi Yasukazu, Yanagida Mitsuaki, Araki Yoshihiko, Iwazaki Kiyoshi, Takagi Michiaki, Goto Kaoru	4. 巻 65
2. 論文標題 Knockdown of DEAD-box RNA helicase DDX5 selectively attenuates serine 311 phosphorylation of NF- B p65 subunit and expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109428 ~ 109428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2019.109428	査読の有無 無
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 Nakano T, Ogasawara S, Tanaka T, Hozumi Y, Sano M, Sayama Y, Yamada S, Shirai Y, Kaneko MK, Kato Y, Goto K	4. 巻 38
2. 論文標題 DzMab-1: Anti-Human Diacylglycerol Kinase Monoclonal Antibody for Immunocytochemistry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy	6. 最初と最後の頁 179-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2019.0024.	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 Tanaka T, Hozumi Y, Martelli AM, Iino M, Goto K	4. 巻 1866
2. 論文標題 Nucleosome assembly proteins NAP1L1 and NAP1L4 modulate p53 acetylation to regulate cell fate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BBA Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2019.118560.	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 Tanaka K, Tanaka T*, Nakano T, Hozumi Y, Yanagida M, Araki Y, Iwazaki K, Takagi M, Goto K	4. 巻 65
2. 論文標題 Knockdown of DEAD-box RNA helicase DDX5 selectively attenuates serine 311 phosphorylation of NF- B p65 subunit and expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2019.109428.	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 Tanaka Toshiaki, Iino Mitsuyoshi, Goto Kaoru	4. 巻 49
2. 論文標題 Sec6 enhances cell migration and suppresses apoptosis by elevating the phosphorylation of p38 MAPK, MK2, and HSP27	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2018.04.009	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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1件

国際研究集会 ASCB Annual Meeting	開催年 2018年～2018年
-------------------------------	--------------------

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
---------	---------