

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790293

研究課題名(和文)シグナルソームの形成および機能におけるプロテインキナーゼCの役割の解明

研究課題名(英文)A role of protein kinase C on formation and function of signalosome

研究代表者

梶本 武利 (KAJIMOTO, TAKETOSHI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00509953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは生体内の様々な細胞種や癌細胞などから放出される微小膜小胞であり、多くの機能性タンパク質やRNAを積み荷として含んでおり、様々な生理・病理的応答に關与する新たな細胞間コミュニケーションツールとして最近注目を集めている。ただ、エクソソームへの積み荷ソーティングの詳細なメカニズムについては全く明らかになっていなかった。本研究では、スフィンゴシンキナーゼシグナルソームが積み荷のエクソソームへのソーティングのトリガーとなることを世界に先駆けて明らかにした。本研究の成果により、スフィンゴシンキナーゼシグナルソーム関連分子はエクソソームが關与する各種疾患の創薬ターゲットとして期待される。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small membrane-bound vesicles released from a variety of physiological cells or tumor cells and include much functional proteins and RNAs as cargo. Recently exosomes are attracting worldwide attention as new intercellular communication tool that participates as physiological or pathological events. However the detailed mechanism underlying cargo sorting into exosome is still unclear. Here, first in the world, we made clear that "sphingosine kinase signalosome" triggers the sorting of cargo molecules into exosomes. By the result of this study, the "sphingosine kinase signalosome"-related molecules are expected as an innovative drug development target of various diseases that exosome participates in.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：シグナルソーム スフィンゴシン1-リン酸 スフィンゴシンキナーゼ スフィンゴシン1-リン酸受容体 プロテインキナーゼC エクソソーム 分子生物学 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

これまでの細胞内シグナル伝達研究では、細胞内シグナル伝達分子を単独な要素として捉え、細胞全体のシグナル伝達ネットワーク内でのそれぞれのシグナル伝達分子の位置付けを検討する研究が主流であった。我々は細胞の細胞内シグナル伝達機構と細胞の生理機能とをリンクさせるためには、単にシグナル伝達分子のネットワーク地図を構築してだけでは不十分であり、細胞内シグナル伝達分子の細胞内での局在、動態を常にパラメーターに含めることの必要性を示してきた。近年、細胞内情報伝達機構におけるシグナロソーム(細胞内の情報伝達複合体)の重要性が指摘され世界中で精力的に研究が進められている。細胞内シグナル伝達分子が単独ではなくお互いに複合体を形成することで、1)シグナル伝達の効率(増幅、増強、持続時間)を高める、2)細胞応答の選択性を高める(複合体形成時のみ下流へシグナルが伝達される)、などにより高度な細胞内シグナル伝達調節が可能となる。現在までにいくつかのシグナロソームが報告されているが、その多くは細胞内局所で形成されるものであり、パラメーターとしての細胞内局在、動態の重要性が益々高まっている。シグナロソーム研究はまだ始まったばかりであり、シグナロソームの詳細なシグナル伝達機構、生理的意義などまだまだ未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、申請者のPKC活性化の時空間制御機構に関する過去の成果を発展させ、またプロテインキナーゼC(PKC)活性化の生細胞内での時空間動態解析を可能にするCKARを有効に利用することで、新たなPKCシグナロソームを同定し、細胞内局在、動態の意義に重点を置き、シグナロソームの機能におけるPKCの役割の詳細を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

課題1、2、3の順に計画的に研究を進める。

課題1: TRP-PKCシグナロソームの同定

FRETイメージング法、共免疫沈降法を用い、細胞内局所でのTRP-PKCシグナロソームの同定を行い、さらにTRP-PKCシグナロソーム形成に重要なTRP、PKC分子内ドメインを決定する。

課題2: TRP-PKCシグナロソームの機能解析

TRP、PKCの選択的阻害剤、TRP、PKCのsiRNAや変異体などを用い、TRP活性のPKCによる調節あるいはPKC活性のTRPによる調節を、FRETイメージング法、カルシウムイメージング法、電気生理学的手法を用いて解析し、TRP-PKCシグナロソームの細胞内局所での機能解析を行う。

課題3: TRP-PKCシグナロソームの生理的意

義の解明

TRP、PKCの選択的阻害剤、TRP、PKCのsiRNAや変異体などを用い、TRPおよびPKCが関与する生理応答との関係を解析し、TRP-PKCシグナロソームの生理的意義を解明する。

4. 研究成果

(1)シグナロソームとして、TRP-PKCシグナロソームに加え、最近注目されているスフィンゴ脂質シグナリングのキータンパク質であるスフィンゴシンキナーゼ(SphK)に焦点を当て、PKCとTRPチャンネルおよびPKCとSphKのシグナロソームの可能性の検討を行った。

まずPKCとTRPチャンネルとの関連性を調べるために、TRPチャンネルの活性化におけるPKC阻害剤の効果を検討した。この際、各種刺激によるTRPチャンネルの局所的な活性化はFluo-4を用いたカルシウムイメージングにより検出した。結果、TRPC3の活性化の程度にはPKCが抑制的に働く一方で活性化の頻度にはPKCが促進的に作用することが明らかとなった。またPKCとSphKとの関連性を調べるために、各種生理刺激による細胞内局所でのPKCの活性化をCKARを用いてモニターし、このPKCの活性化に対するSphK阻害剤の効果を検討した。その結果、PKCの活性化にはSphKの活性つまりスフィンゴシン1-リン酸(S1P)の産生が必要であることが明らかとなった。

以上の結果は、TRPチャンネルの活性化の上流におけるPKCの役割の重要性、およびPKCの活性化におけるSphKによって産生されるS1Pの重要性を示しており、PKC-TRPシグナロソーム、およびPKC-SphKシグナロソームの細胞内局所での機能が示唆された。

(2)SphK-PKCシグナロソームの場の同定を行った。

蛍光タンパク質を融合したSphK、S1P受容体、PKCをそれぞれ遺伝子導入によりHeLa細胞に発現させ、各種細胞内小器官のマーカーを用いてSphK、S1P受容体、PKCの3者が共局在する場の存在を検討した。結果後期エンドソームにおいてSphK、S1P受容体、PKCの共局在が観察された。またこれら3者の後期エンドソーム上での活性を検討したところ、いずれも定常状態において活性化状態にあることが確認された。以上の結果は、SphK、S1P受容体、PKCが後期エンドソーム上で協同的に働いている可能性を示唆している。

(3)後期エンドソーム上でのSphKシグナロソームの同定を行った。

SphKシグナロソーム中のS1P受容体およびGタンパクの活性化を蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET法)を用いて可視化し、エクソソームマーカーである機能性タンパク質CD63に緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合したCD63-GFPを遺伝子導入によりHeLa細胞に発

現させ、SphK、S1P 受容体の阻害剤や siRNA を用いて SphK シグナロソームの機能を抑えた条件で、S1P 受容体および G タンパクの活性化を検討したところ、SphK による S1P の産生および生理活性物質 S1P による S1P 受容体の活性化の一連のメカニズム (図 1) が、細

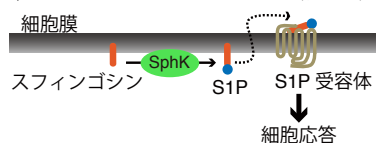


図 1: S1Pの作用メカニズム

胞膜上のみならず細胞内膜系の後期エンドソームの一種であるエクソソーム多胞体上においても細胞膜とは独立して働いていることが明らかとなった。

(4) 後期エンドソーム上での SphK シグナロソームの生理的意義の解明に向けた検討を行った。

機能性タンパク質のエクソソームへのソーティングにおける SphK シグナロソームの関与を明らかにするために、エクソソームの積み荷含有量を個々のエクソソーム単位で定量する「エクソソーム積み荷定量法」を開発した。具体的には、エクソソームを分離・精製し、エクソソーム中の機能性タンパク質を選択的に蛍光標識し、さらにエクソソーム自体を蛍光膜染色剤により均一に標識し、最後にすべてのエクソソームを基板上に固定し、蛍光顕微鏡など各種検出器を用いて個々のエクソソーム中の機能性タンパク質の含有量の定量的解析を行う方法である。エクソソームマーカーである機能性タンパク質 CD63 に GFP を融合し (CD63-GFP)、CD63-GFP を遺伝子導入により HeLa 細胞に発現させ、SphK、S1P 受容体の阻害剤や siRNA を用いて SphK シグナロソームの機能を抑えた条件で、HeLa 細胞から放出されるエクソソームを回収し、「エクソソーム積み荷定量法」を用いてエクソソーム中の CD63-GFP の含有量を解析したところ、SphK シグナロソームの抑制により個々のエクソソーム中の CD63-GFP の含有量が減弱した。この結果は、後期エンド

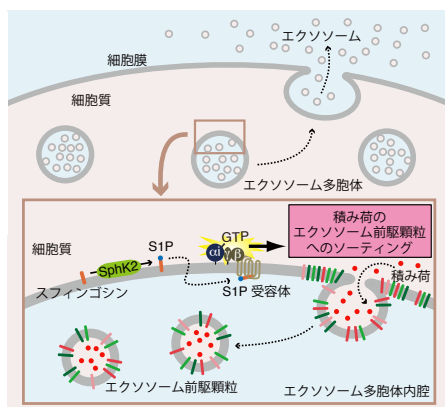


図 2: S1Pによる積み荷タンパク質のエクソソームへのソーティング機構

ーム上での SphK シグナロソームが機能性タンパク質のエクソソームへのソーティングにおいて重要な役割を担うことを示唆している (図 2)。

(5) エクソソームは生体内の様々な細胞種や癌細胞などから放出される 50nm~100nm の微小膜小胞であり、様々な機能性タンパク質や RNA などを積み荷として含んでいる。放出されたエクソソームは、液性因子として生体内を循環・拡散し、エクソソームに含まれる積み荷がターゲット細胞に作用することにより、様々な生理・病的応答を引き起こすことが知られている。エクソソームは後期エンドソーム膜が内腔側に陥入することで形成され、この多胞エンドソームが細胞膜と融合することで細胞外環境に放出される。この後期エンドソーム膜の陥入の際に、様々な機能性タンパク質や RNA がエクソソーム内に積み荷としてソーティングされるが、積み荷ソーティングの具体的なメカニズムについては全く明らかになっていなかった。

本研究では細胞内局所でのシグナロソームの同定とその生理的意義の解明を多方面から追求した結果、後期エンドソーム上での局所的な SphK シグナロソームの働きが見出され、またその生理的意義として、長い間不明であったエクソソームへの積み荷ソーティングのメカニズムを世界に先駆けて明らかにすることに成功した。本研究成果は、SphK シグナロソームの制御によりエクソソームへの積み荷ソーティングが自在にコントロール可能であることを示唆しており、SphK シグナロソームはエクソソームが関与する各種疾患の創薬ターゲットとして期待される。

今後は本研究成果を発展させ、エクソソームが関与する各種疾患において、SphK シグナロソームをターゲットとする創薬を目指した研究を進めて行く予定である。

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 1 件)

① Taketoshi Kajimoto, Taro Okada, Satoshi Miya, Lifang Zhang, Shun-ichi Nakamura
Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. Nature Communications. 4:2712, 2013, 1-13
DOI: 10.1038/ncomms3712
査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 梶本 武利、岡田 太郎、宮 聡志、張麗芳、中村 俊一
エクソソームへの積み荷ソーティングにお

ける生理活性物質スフィンゴシン1-リン酸の役割
第125回 日本薬理学会近畿部会
2014年6月20日
岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

② 梶本 武利、岡田 太郎、宮 聡志、張麗芳、中村 俊一
スフィンゴシン1-リン酸シグナリングによるエクソソームへの積み荷ソーティング機構

Sphingosine 1-phosphate signaling triggers exosomal cargo sorting
第66回 日本細胞生物学会大会
2014年6月11日～2014年6月13日
奈良県新公会堂（奈良県奈良市）

③ 梶本 武利、岡田 太郎、宮 聡志、張麗芳、中村 俊一

Sphingosine 1-phosphate signaling regulates exosomal cargo sorting
2014年 アメリカ生化学・分子生物学会年会
2014年4月26日～2014年4月30日
サンディエゴコンベンションセンター（サンディエゴ、アメリカ合衆国）

④ 梶本 武利、岡田 太郎、宮 聡志、張麗芳、中村 俊一

Critical role of sphingosine 1-phosphate in exosome biogenesis
第36回 日本分子生物学会年会
2013年12月3日～2013年12月6日
神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

〔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/biochemistry/exosomal%20cargo%20sorting.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：