

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06639

研究課題名(和文) I-BARタンパク質による細胞外小胞産生機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of extracellular vesicle production by I-BAR proteins

研究代表者

末次 京子(埴京子)(Hanawa-Suetsugu, Kyoko)

同志社大学・脳科学研究科(研究開発推進機構)・准教授

研究者番号：40391990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂質結合能を持ちタンパク質自身が重合しチューブ構造形成することの出来るI-BARタンパク質が、細胞膜を突起構造に誘導し、その突起が切断されることにより細胞外小胞が作り出されることを明らかにした。細胞突起の切断は血流などの非常に弱い力学的力で切断可能であることも示すことができた。実際に、マウス個体を用いた実験によりI-BARタンパク質依存的に細胞外小胞が放出されている様子も観察することが出来た。これらの結果により、I-BARタンパク質によるこれまでにない新しい細胞外小胞形成分子機構を提唱することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物は細胞間コミュニケーションにより個体内で総合的な調和を維持することにより、一個体として生命を維持することが出来る。近年、細胞外には細胞外小胞が大量に存在し、細胞外小胞に含まれる因子が遠く離れた細胞に取り込まれ機能することが示されている。現在はがんの転移などにも寄与していることが提唱され、腫瘍などバイオマーカーとしても脚光を浴びている。本研究では、I-BARタンパク質が細胞膜を突起構造に誘導しその突起が切断されるという、これまでにない新規の細胞外小胞の形成分子メカニズムの一端を明らかにした。その結果、細胞外小胞をターゲットにした創薬基礎基盤の提唱し、社会的意義のある研究結果となった。

研究成果の概要(英文)：We show that I-BAR proteins, which have lipid-binding ability and can polymerize themselves to form tube structures, induce the plasma membrane to form protrusions, and that the protrusions are cleaved to form extracellular vesicles. We were also able to show that cell protrusions made by the I-BAR protein can be cleaved by very weak mechanical forces, such as blood flow. In fact, we were able to observe I-BAR protein-dependent release of extracellular vesicles in mice. These results suggest a novel molecular mechanism of extracellular vesicle formation by I-BAR proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：I-BAR 細胞外小胞 細胞突起

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生命体は細胞間コミュニケーションにより個体内で総合的な調和を維持することにより、一個体として生命を維持することが出来る。細胞外には細胞外小胞が大量に存在し、細胞外小胞に含まれる因子が遠く離れた細胞に取り込まれ機能することが示されている。細胞外小胞形成分子メカニズムとして最も明らかになっているのは、多胞性小胞を経由して細胞外に放出されるエキソサイトーシス機構である。しかし実際のところ、エキソサイトーシスの機構により放出される細胞外小胞は全体の極一部でしかないと考えられており、大半を占める細胞外小胞はエキソサイトーシス機構以外のまだ知られていない多種多様な経路によって作られると予想されているが、エキソサイトーシス機構以外、明確な分子機構が明らかになっているものはない。

I-BAR ( Inverse Bin-Ampyiphysin-Rvs161/167 ) タンパク質は、酵母からヒトまで広く保存された脂質結合タンパク質である。複数のグループにより I-BAR ドメインの X 線結晶構造解析が行われ、I-BAR ドメインは、ヘリックスから構成され、I-BAR ドメイン同士が結合し水溶液中では安定な二量体を形成していること、I-BAR ドメインの二量体の全体構造はバナナ状の立体構造を持つこと、二量体はさらに重合しチューブ構造を形成すること、そのチューブ構造の外側にプラスの電荷をもつアミノ酸が局在しており、電氣的に生体膜と結合すること等が明らかになった。その結果、I-BAR タンパク質は脂質膜をチューブ構造に導く鋳型タンパク質として働くことが出来る。実際に I-BAR ドメインを細胞内で過剰発現させると、細胞膜表面には棘のような凸のチューブ構造が多数観察される。また、I-BAR タンパク質は、細胞運動をしているラメリポディアやフィロポディアの形成や、悪性度の進んだ転移浸潤を起こしているがん細胞の表面構造を構築していることが明らかとなっている。I-BAR とは曲率が反対の面に正電荷を持つ N-BAR と F-パク質は、脂質膜と結合し脂質膜を切断する機能を持つことから、I-BAR も脂質膜切断機能を持つのではないかと考え、*in vitro* の実験系で検証を行ったところ、I-BAR タンパク質は人工脂質膜をチューブ構造に誘導し、さらにその脂質膜を切断し、脂質小胞形成能を持つことを見出した。これらの結果から、I-BAR タンパク質は細胞の先端で細胞膜突起を形成し、その細胞突起を形成する細胞膜を切断することにより細胞外小胞を形成する、という仮説を立てるに至った。

### 2. 研究の目的

I-BAR タンパク質は I-BAR ドメイン同士が規則正しく重合することによりチューブ構造を形成する。I-BAR ドメインはそのチューブ構造の外側に正電荷を帯びた領域を持ち、脂質膜と結合することにより脂質膜をチューブ構造に誘導する脂質膜形態の鋳型として機能する。これまでラメリポディアやフィロポディアに代表される細胞運動表面の細胞膜突起構造は I-BAR タンパク質が関与している事が知られている。本研究では、I-BAR タンパク質は、単に細胞表面の細胞膜突起構造を誘導しているだけでなく、細胞突起構造を形成している脂質膜を切断し細胞外小胞産生を誘導する、という新しい細胞外小胞形成を担うタンパク質であることを立証し、エキソサイトーシスとは異なるこれまでにない新たな細胞外小胞形成メカニズムの解明を目的とした(図1)。これまで細胞外小胞形成の経路は、「エキソサイトーシス」以外「出芽」と呼ばれる、

細胞膜表面の脂質膜がちぎれて細胞外小胞が形成されるという概念はあるが、具体的な分子機構は不明である。今回、申請者が提唱する、I-BAR タンパク質による細胞外小胞形成メカニズムでは、これまで「出芽」と呼ばれてきた細胞外小胞形成経路において、具体的に関与するタンパク質を解明し、エキソサイトーシスとは異なる新しい細胞外小胞形成分子メカニズムを提唱するものである。

### 3. 研究の方法

#### 細胞外小胞産出活性を持つ領域の特定

I-BARタンパク質であるIRSp53, IRTKS, Pinkbar, MIM, ABBA-1タンパク質を用いて、細胞外小胞を大量に放出させるI-BARタンパク質の部位を特定する。そのため、IRSp53やそのほかのI-BARタンパク質に、N末端にGFPを融合させた様々な領域のフラグメントの発現コンストラクトの作成を行う。培養細胞からの細胞外小胞の解析においてはしばしば血清中の細胞外小胞が問題となる。そのため作成した発現コンストラクトは、培養に血清を必要としないHEK293 free style cellにトランスフェクションし、その培養上清から超遠心法により大きさにマイクロベシクル画分（直径約 1000nm-100nm）とエクソソーム画分（直径約100nm以下）に分けて精製する。精製した画分を用いてウエスタンブロットを行い、I-BARタンパク質のどの領域が細胞外小胞産生に寄与しているか、その領域を特定する。さらに精製したマイクロベシクルを異なる細胞の培養液に混ぜ、細胞運動など生理活性に影響を与えるかを調べる。

#### IRSp53による細胞外小胞の機能を担うシグナル伝達タンパク質の探索

先の実験で作成したコンストラクトを用いて、I-BAR タンパク質の各領域フラグメントを発現させた HEK293 細胞から放出された細胞外小胞を精製し、それぞれの細胞外小胞にどのようなタンパク質が含まれているのかを、質量分析において2種のサンプル間の差分を検出する iTRAQ 解析を行うことにより、IRSp53 による細胞外小胞に特異的に含まれるタンパク質を探索する。

#### マウス体内におけるIRSp53依存性の細胞外小胞の検出

U251, HeLa, B16など CRISPR-Cas9の系を用いてIRSp53 KO Cell Lineを作成する。それらの細胞を免疫ノックアウトマウスの皮下に移植し、IRSp53依存的に細胞小胞が放出されていないか、免疫染色により検証する。

### 4. 研究成果

現在、ヒトにおいてI-BARは現在5種類が確認されているが、そのうちMIMとIRSp53を中心に研究を行った。大腸菌でGST融合タンパク質として様々な領域や変異体のI-BARタンパク質を発現させ精製し、in vitroで様々な成分の脂質との結合を調べた。その結果、I-BARドメインは脂質膜との静電的相互作用によりリポソームの小胞形成を誘導することが明らかとなった。またI-BARドメインにより脂質膜は小胞化されるが脂質膜の切断には両親媒ヘリックスは必要ないことも確認された。一方、I-BARドメインにより作られる小胞の脂質成分を調べると、小胞にはリゾ脂質が含まれていた。そこで脂質成分を様々な配合で脂質膜の小胞化を調べてみた結果、LysophosphatidylethanolamineがI-BARによる脂質膜の小胞化を促進することがわかった。さらにI-BARドメインを大量発現させ、細胞表面に糸状膜形態を作らせ、糸状膜形態

のすぐ近傍にレーザーパルスを当て、どれくらいの力により脂質膜が切断されるかを調べた。その結果 8~20 kPa で切断されることがわかった。これは血液毛細管内または ECM 内を含む *in vivo* の圧力 (4~13kPa) と同等であり、I-BAR により生体内で作られた糸状膜形態は血流などにより切断可能であること示している。

実際に I-BAR タンパク質依存的に細胞から細胞外小胞が放出されていることを確かめるために、無血清培地で培養可能な HEK293T 細胞を用いて、様々な I-BAR タンパク質コンストラクトを大量発現させ、超遠心により大きさ別に細胞外小胞を精製した。その結果、I-BAR ドメイン依存的に細胞外小胞放出量が増加することがわかった。さらに生成された細胞外小胞を iTRAQ 解析により分析したところ、I-BAR 依存的に細胞外小胞には IRS4、Nectin-2 が多く含まれていることがわかった。さらに I-BAR 依存的に作られた細胞外小胞に生理活性があるかを調べるため、HEK293T で I-BAR ドメインを過剰発現させたものから精製した細胞外小胞を PANC-1 を培養しているバイオ溶液に添加し、細胞運動能を調べた。その結果、細胞外小胞を加えると細胞運動能が向上することが示され、I-BAR により作られた細胞外小胞は生理活性を持つものであることを示すことが出来た。

これまで示されてきた I-BAR タンパク質による細胞外小胞放出が実際に *in vivo* においてもなされているのかを検証するため、CRISPR-Cas9 の系を用いて IRSp53 KO Cell Line を作成し、免疫不全マウスの皮下に IRSp53 KO または WT の U251 細胞を移植し、移植した細胞塊からヒト細胞由来の細胞外小胞が IRSp53 依存的に放出されていないかを免疫染色により調べた結果、IRSp53 依存的に優位に細胞外小胞が放出されている様子が観察された。

以上の結果から、本研究により I-BAR タンパク質による新たな細胞外小胞形成の分子メカニズムを提唱し、論文として発表することが出来た (Nishimura T. et al., *Developmental Cell*, 2021)。

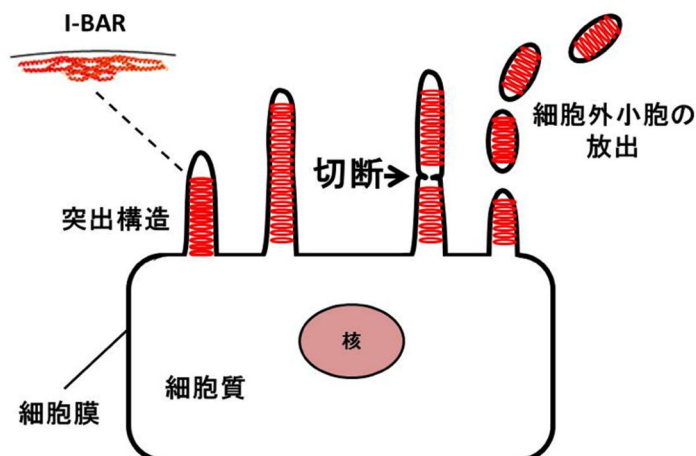


図1: I-BARドメインは脂質膜を突起構造に導き細胞膜を切断し、細胞外小胞を作る。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishimura T., Oyama T., Hu Hooi T., Fujioka T., Hanawa-Suetsugu K., Ikeda K., Yamada S.i., Kawana H., Saigusa D., Ikeda H., Kurata R., Oono-Yakura K., Kitamata M., Kida K., Hikita T., Mizutani K., Yasuhara K., Mimori-Kiyosue Y., Oneyama C., Kurimoto K., Hosokawa Y., Aoki J., Takai Y., Arita M., Suetsugu S.	4. 巻 56
2. 論文標題 Filopodium-derived vesicles produced by MIM enhance the migration of recipient cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 842 ~ 859.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2021.02.029	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 -

1. 著者名 Gusmira Aini, Takemura Kazuhiro, Lee Shin Yong, Inaba Takehiko, Hanawa-Suetsugu Kyoko, Oono-Yakura Kayoko, Yasuhara Kazuma, Kitao Akio, Suetsugu Shiro	4. 巻 133
2. 論文標題 Regulation of caveolae through cholesterol-depletion-dependent tubulation mediated by PACSIN2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.246785	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 -

1. 著者名 Hanawa-Suetsugu Kyoko et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Phagocytosis is mediated by two-dimensional assemblies of the F-BAR protein GAS7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12738-w	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 -

1. 著者名 Kitamata Manabu, Hanawa-Suetsugu Kyoko, Maruyama Kohei, Suetsugu Shiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Membrane-Deformation Ability of ANKHD1 Is Involved in the Early Endosome Enlargement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.06.020	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomofumi Yoshida, Kohichiro Takenaka, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Yasunori Mori, Shigeo Takamori
2. 発表標題 Intersectin 1 condensates, the reservoir for various endocytic proteins, are anchored at plasma membrane by SNAP-25
3. 学会等名 JSPS Core-to-core Program (A) Symposium “Nanobiology of neural plasticity based on optical nanoscopy (国際学会)”
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田知史, 竹中康一郎, 塙(末次)京子, 森靖典, 高森茂雄
2. 発表標題 形質膜に係留されている ITSN1 によって形成される相分離環境はエンドサイトーシス関連タンパク質の動的な貯蔵庫として機能する
3. 学会等名 シナプス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田知史, 竹中康一郎, 塙(末次)京子, 森靖典, 高森茂雄
2. 発表標題 A liquid phase of Intersectin1 serves as the cytoplasmic reservoir for endocytic proteins
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋茉奈美, 西村珠子, 塙 京子, 末次志郎
2. 発表標題 Domain-specific regulation of microvesicle secretion by a protrusion-producing I-BAR domain protein, IRSp53
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田結奈、塙京子、西村珠子、稲葉岳彦、末次志郎
2. 発表標題 I-BAR facilitates transport from the cytoplasm to the outside of the cell
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村珠子、大山拓也、Hooi Ting Hu、塙京子、末次志郎
2. 発表標題 Microvesicle formation through the scission of plasma membrane by the I-BAR protein MIM
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北又学、塙京子、丸山耕平、末次志郎
2. 発表標題 ANKHD1の新規小胞形成能と初期エンドソームの形態制御への関与の同定
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------