

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07043

研究課題名(和文) 三量体G蛋白質シグナルによるエクソソーム産生機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Exosome Production by Heterotrimeric G Protein Signaling

研究代表者

上田 浩 (Ueda, Hiroshi)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：50253779

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)：近年、種々の細胞において、RNAやタンパク質を含んだエクソソームによる細胞外シグナル伝達方式がとられ、それが、様々な細胞応答を引き起こすことが報告されてきた。また、これらが、がんなどの病態に非常に関連していることも知られており、エクソソーム産生機構の解明はそれらの病態に対する治療に結びつくものと考えられる。本研究では、GPCR刺激によるエクソソーム産生機構を調べ、産生促進に関わる分子及び抑制に関わる分子の同定を試みた。その結果、特にGsシグナルによりエクソソーム産生調節機構において、cAMP依存性タンパク質キナーゼによらない調節機構が存在することを見出し、それについての結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エクソソーム産生機構の一つとして、三量体Gタンパク質共役型受容体(GPCR)刺激の中でも、Gsシグナルに関わる経路について検討した研究であり、過去、そのような研究報告はほとんどない。さらに、エクソソームの放出機構について、促進と抑制に関わる分子の同定を試みている点でも、これらの結果を利用し、今後、がんに関わる治療薬開発や、エクソソームを利用した薬物送達にも応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been reported that extracellular signaling by exosomes containing RNA and proteins is employed in various cells to induce various cellular responses. It is also known that exosomes are highly relevant to pathological conditions such as cancer, and elucidation of the exosome production mechanism may lead to the treatment of these pathological conditions. In this study, we investigated the mechanism of exosome production by GPCR stimulation and attempted to identify molecules involved in promoting and inhibiting exosome production. We found that there is a regulatory mechanism of exosome production by Gs signaling that is independent of cAMP-dependent protein kinases.

研究分野：生化学

キーワード：GPCR エクソソーム PKA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームとは、1980年代初頭に発見された様々な蛋白質や核酸分子を内包する約100nmの細胞外小胞である。免疫細胞やがん細胞等において、エクソソーム内の分子群が細胞間を往来する現象が報告されて以来、細胞間コミュニケーションツールとしてのエクソソームの機能について研究が盛んに行われてきた。特に近年、血管新生や転移亢進等に関連する蛋白質やメッセンジャーRNA(mRNA)、マイクロRNA(miRNA)等を内包するがん細胞由来のエクソソームが、がん細胞及びその周辺細胞に働きかけることで、がん細胞に有利な環境を作り出すことが明らかになってきている。

一般的にエクソソームは、MVE内の腔内膜小胞(ILV)がエキソサイトーシスにより細胞外に放出されたものと定義されている。その産生過程は、エンドサイトーシスによるエンドソームの形成、エンドソームにおけるESCRT複合体(endosomal sorting complex required for transport)依存的または非依存的膜陥入によるILV形成、MVEの形質膜への輸送、エキソサイトーシスによるエクソソーム放出、という大きく4ステップから成ると考えられる。正常細胞に比べ、エクソソームの分泌量が明らかに多いことが知られるがん細胞では、ここで示した4つのステップのいずれかに関わるシグナル分子が異常に活性化している可能性が考えられる。しかしながら、がん細胞も含め、細胞におけるエクソソーム産生の分子機構の詳細は未だ明らかになっていない。

一方、エクソソームの形成起源であるエンドソームの形成は、一般的に知られている三量体G蛋白質共役型受容体(GPCR)を含む受容体刺激時に起こるクラスリン依存的なエンドサイトーシスを介して起こることが知られている。特にGPCR刺激時におけるエンドソームの形成には、各種三量体G蛋白質サブユニットによるシグナルが時空間的に制御していることが知られている。以上のことから、GPCRシグナルにより、時空間的にエクソソーム産生が制御されている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

エクソソーム産生機構において中心的な役割を担う分子は何であり、それらがいくつあるのかという点であり、それらの分子を明らかにすることにより、それらの分子が関わるがん細胞の悪性化を防ぐためのエクソソーム産生阻害薬や治療法開発につなぐことができると考える。本研究では、正常細胞およびがん細胞において、レセプター刺激のひとつである三量体G蛋白質シグナルによるエクソソーム産生機構を検討し、そのシグナルによりエクソソーム産生増加に関与する分子を、すでに予備的な結果から得られているいくつかの候補分子の中から同定し、その詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、正常な培養細胞(HEK293細胞)及び種々の培養がん細胞(A541細胞, Rh41細胞等)を用い、以下のような方法を用い、エクソソーム産生について検討した。

- (1) NanoSightを用いたエクソソームの検出：種々の条件の細胞培養上清から得られたエクソソーム懸濁液に、レーザー光を照射し、そのレーザー光を受けた微粒子の散乱光によってブラウン運動を可視化し、解析することのできる装置(NanoSight)により、粒子径や濃度などを算出した。
- (2) NanoLuc融合エクソソームマーカー蛋白質を用いたエクソソーム量の検出：一般的にエクソソーム上には、CD9、CD63、CD81といったテトラスパニン蛋白質が存在することが知られている。比較的分子量が小さいルシフェラーゼであるNanoLucを融合したCD81を含むこれら蛋白質の発現プラスミドを作製し、それを用いることで、細胞上清中に放出されたエクソソーム量を簡便に定量した。
- (3) イムノプロットによるマーカー蛋白質の量的変化の検出：各種条件で調製したエクソソームについて、テトラスパニン蛋白質およびAlix等を含む各種エクソソームのマーカー蛋白質に対する特異抗体を用い、イムノプロットにより量的変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 各種三量体G蛋白質サブユニットによるエクソソーム産生の検討

HEK293細胞に、各種Gサブユニットの活性化型変異体及びサブユニットの発現プラスミドをトランスフェクションし、細胞培養液中に放出されてくるエクソソーム量を、超遠心後の沈殿物を再懸濁後、NanoSightにより解析した結果、Gsの活性化型変異体及びGqの活性化型変異体を強制発現させた細胞において、増加した。また、この際、各種エクソソームマーカータンパク質の特異抗体を用い、イムノプロットを行った結果、これらの沈殿物には、各種エクソソームマーカータンパク質が存在することが明らかとなり、エクソソーム量の変化をみている

ことが明らかにできた。さらに、NanoLuc を融合した CD9 を含むテトラスパンニンタンパク質を用いた実験においても、これらの サブユニットの活性化型を発現させた細胞において、有意なルシフェラーゼ活性上昇が、培養液中に見られた。さらに、これらの G タンパク質と共役していることが知られる GPCR の遺伝子をトランスフェクションした細胞において、それらの GPCR に特異的なリガンド刺激後の培養液中においても、ルシフェラーゼ活性上昇が確認できたことから、これらの G タンパク質の活性化によるエクソソーム産生機構の存在が確認できた。

(2) G タンパク質依存的シグナルによるエクソソーム産生に関わる分子の同定

次に、Gs シグナルに着目し、エクソソーム産生に関わる分子の同定を試みた。まず、Gs シグナルによる cAMP 上昇で活性化されることが知られている分子について着目し、研究を進めた。まず、cAMP 依存的タンパク質キナーゼ(PKA) について、その阻害剤である H-89 を用い検討した結果、Gs シグナルによるエクソソーム産生の一部が阻害された。このことから、一部は、PKA 依存的な経路が存在する可能性が示唆された。さらに、いくつかの他の分子について、発現ベクターを調製し検討した。その結果、Gs シグナル依存的エクソソーム産生活活化因子 (GsDEPF) を見出した。さらに、GsDEPF のアミノ酸配列情報をもとに、GsDEPF の各種変異体を作成し、NanoLuc を融合テトラスパンニンを用い検討した結果、エクソソーム産生増加に関わるアミノ酸領域を見出した。さらにアミノ酸配列と類似の配列を持ついくつかのタンパク質の発現ベクターを調製し、それらを用いてエクソソーム産生を検討した結果、その中に GsDEPF とは異なり、Gs シグナルによるエクソソーム産生を抑制するタンパク質 (GsDEPIF) の存在が明らかになった。

(3) GsDEPIF による Gs シグナル依存的エクソソーム産生阻害機構についての検討

GsDEPIF による Gs シグナル依存的エクソソーム産生抑制が、GsDEIF の構造のどの部分に依存するののかについて検討するため、各種欠損変異体の発現ベクターを調製し、検討した。その結果、図 1 のように、GsDEPIF の N 末端に近い領域が、阻害に強く関係していることが示唆された。さらに、この GsDEPIF がどのような他のタンパク質と関係しているのかを知るために、GsDEPIF による免疫沈降を行い共沈降してくる分子を、マスマスペクトロメトリーを用い、同定を試みた。その結果、いくつかの分子が同定できた。その一つの GsDEPIF 結合タンパク質 (GsDEPIFBP1) は、図 2 のように、GsDEPIF と共同して、エクソソーム産生抑制に関わっていることが示唆された。今回見出した GsDEPIFBP1 以外の他のいくつかの GsDEPIFBP に関しても、同様の結果を得ており、これらがどのようにして、Gs シグナル依存的なエクソソーム産生を抑制するののかについて、今後検討を行っていく必要がある。

本研究で見出した GsDEPF, GsDEPIF 及びいくつかの GsDEPIFBP によるエクソソーム産生機構の詳細をさらに検討することにより、エクソソーム産生に関わる病態に対する創薬あるいは、エクソソームを利用した薬物送達システムの構築に今後寄与できると考えられる。

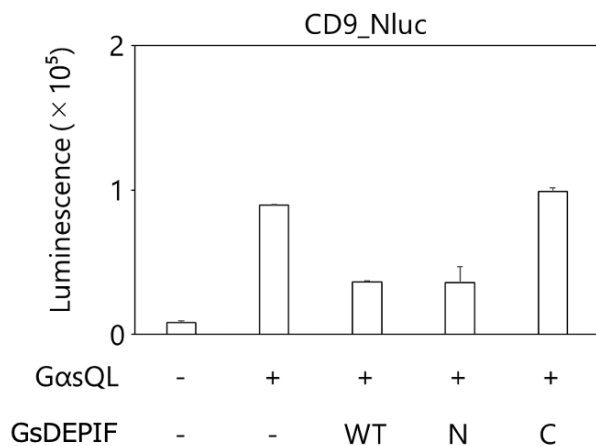


図 1. GsDEPIF の各種欠損変異体による Gs シグナル依存的 CD9 含有エクソソーム産生に対する影響

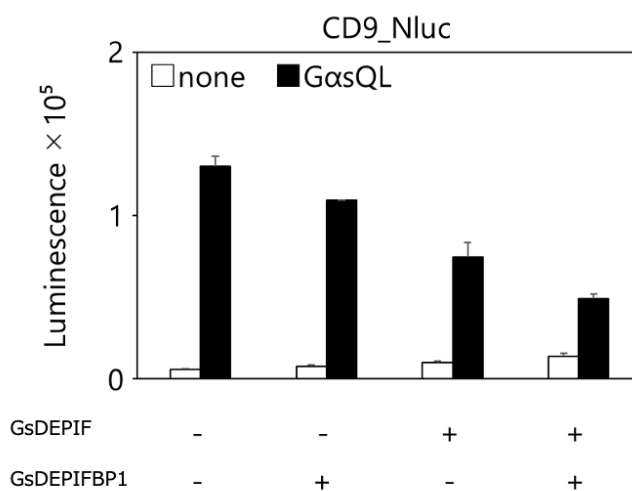


図 2. GsDEPIF 及び GsDEPIFBP1 による Gs シグナル依存的 CD9 含有エクソソーム産生に対する影響

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 0件）

1. 著者名 Nomura, T.K., Heishima, K., Sugito, N., Sugawara, R., Ueda, H., Akao, Y. and Honda, R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Specific inhibition of oncogenic RAS using cell-permeable RAS-binding domains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2021.04.013.	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 Nakano S, Nishikawa M, Asaoka R, Ishikawa N, Ohwaki C, Sato K, Nagaoka H, Yamakawa H, Nagase T, Ueda H.	4. 巻 459(1-2)
2. 論文標題 DBS is activated by EPHB2/SRC signaling-mediated tyrosine phosphorylation in HEK293 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 83-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-019-03552-5	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 Sugawara R, Ueda H, Honda R.	4. 巻 513(2)
2. 論文標題 Structural and functional characterization of fast-cycling RhoF GTPase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 522-527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.04.018	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 Nishikawa M, Nakano S, Nakao H, Sato K, Sugiyama T, Akao Y, Nagaoka H, Yamakawa H, Nagase T, Ueda H.	4. 巻 61
2. 論文標題 The interaction between PLEKHG2 and ABL1 suppresses cell growth via the NF- B signaling pathway in HEK293 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Signal.	6. 最初と最後の頁 93-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2019.04.016	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野 駿、西川 将司、小林 知世、杉山 剛志、山川 央、長瀬 隆弘、上田 浩
2. 発表標題 非受容体型チロシンキナーゼ FYNによる Rho活性化因子 PLEKHG1の活性制御
3. 学会等名 日本生化学会 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井藤 拓哉、後藤 未沙紀、中野 駿、西川 将司、山川 央、長瀬 隆弘、上田 浩
2. 発表標題 アダプタータンパク質NCK2によるSH3ドメインを介したRho活性化因子PLEKHG1の活性制御
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八橋茉莉奈、吉田泰徳、今枝孝夫、西川将司、中野駿、喜多村徳昭、池田将、榊原清美、本山ユミ、長瀬隆弘、上田浩
2. 発表標題 嗅覚受容体における新規短鎖脂肪酸受容体の同定
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 西川将司、中野駿、山川央、長瀬隆弘、上田浩
2. 発表標題 三量体G蛋白質GiシグナルによるRho活性化因子PLEKHG1の活性制御
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 後藤美沙紀、西川将司、中野駿、山川央、長瀬隆弘、上田浩
2. 発表標題 SH3ドメインを介したアダプター蛋白質NCK2によるRho活性化因子PLEKHG1の機能制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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
研究分担者	赤尾 幸博 (Akao Yukihiro) (00222505)	岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究科・特任教授 (13701)	

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