

福田 光則

東北大学大学院生命科学研究科
教授

細胞外小胞の形成・分泌とその異質性を生み出す分子機構の解明
～人工細胞外小胞への展開

§ 1. 研究成果の概要

エクソソームは細胞内膜に由来する粒径 100 nm 前後の細胞外小胞の一種で、蛋白質、脂質、核酸など様々な物質を含んでいるため、近年、新たな細胞間コミュニケーションの手段として注目を集めている。このため、細胞外に放出されたエクソソームの免疫細胞・がん細胞などへの作用やその内容物の解析に関する論文数がここ数年で急増している。しかし、その一方で、細胞外小胞の分類は、一部マーカーは存在するものの、粒の大きさによって分類されているのが現状である。最近、一つの細胞種から異なるタイプ(サイズや組成など)のエクソソームが放出されること、すなわち異質性 (heterogeneity) を示すことが報告されるようになってきたが、エクソソームの異質性を生み出す仕組みは全くと言って良いほど解明されていない。その最大の理由の一つとして、エクソソームがどこで生まれ(形成)、どこへ運ばれ(輸送)、どこから、どのようにして放出されるのか(分泌)といった基本的な仕組みそのものが十分に解明されていない点が挙げられる。従来のエクソソームに関する研究の多くは、培養液中に放出された後に焦点が当てられていたため、上記の疑問に答えるのは容易ではなかった。本研究では、特殊な細胞間接着構造(密着結合)を持つ上皮細胞株(腎臓上皮由来の MDCK 細胞)をモデル系に用いて、密着結合を挟んだ二種類の異なる細胞膜(頂端膜と側底膜)から放出される組成の異なるエクソソームの形成・輸送・分泌の分子機構の違いを解明することを目的としている(図1左)。具体的には、小胞の形成・輸送の中心的制御因子である ESCRT 複合体やその関連因子、及び低分子量 G 蛋白質 Rab に焦点を当て、頂端膜・側底膜エクソソームに特異的な制御因子の同定とその機能解析を目指している。

本年度は、これまでに確立した MDCK 細胞の平面培養系(モノレイヤー)を用いて、頂端膜・側底膜から放出されるエクソソームを高純度且つ別個に単離する手法を開発すると共に、質量分析などにより両者の蛋白質組成が実際に異なる(異質性を示す)ことを明らかにし、それぞれのマー

カー蛋白質の同定に成功した(図1右)。また、CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いて、哺乳動物に存在する全ての Rab のノックアウト細胞株の樹立にも世界に先駆けて成功し(*J. Cell Biol.*, 2019)、一部のノックアウト細胞株の機能解析を行った。さらに、エクソソームの元となる内腔小胞の形成への関与を明らかにするため、ESCRT 複合体やその関連因子のノックダウン系の立ち上げを行った。現在、同定したエクソソームマーカー分子を指標に、候補制御因子のノックアウトやノックダウンのエクソソーム分泌に及ぼす影響の検討を進めており、頂端膜・側底膜エクソソームの分泌では異なる因子が機能する(すなわち別個に制御される)ことが明らかになってきた。

【代表的な原著論文】

1. Yuta Homma, Riko Kinoshita, Yoshihiko Kuchitsu, Paulina S. Wawro, Soujiro Marubashi, Mai E. Oguchi, Morié Ishida, Naonobu Fujita and Mitsunori Fukuda, “Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells” *Journal of Cell Biology*, vol. 218, No. 6, pp.2035–2050, 2019
2. Keisuke Tabata, Atsuki Nara, Hiroko Omori and Eiji Morita, “Immuno-localization of ESCRT proteins in virus-infected cells by fluorescence and electron microscopy” *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1998, pp.73–92, 2019
3. Riko Kinoshita, Yuta Homma and Mitsunori Fukuda, “Rab35-GEFs, DENND1A and folliculin differentially regulate podocalyxin trafficking in two- and three-dimensional epithelial cell cultures” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, No. 11, pp.3652–3663, 2020

§ 2. 研究実施体制

(1)「福田」グループ

- ① 研究代表者:福田 光則 (東北大学大学院生命科学研究科 教授)
- ② 研究項目
 - ・上皮細胞を用いた細胞外小胞の輸送・分泌の分子機構とその異質性を生み出す仕組みの解明:Rab 分子の網羅的機能解析

(2)「森田」グループ

- ① 主たる共同研究者:森田 英嗣 (弘前大学農学生命科学部 准教授)
- ② 研究項目
 - ・細胞外小胞の形成を制御する ESCRT 因子の同定と細胞外小胞の異質性を生み出す分子機構の解明:人工細胞外小胞・粒子への応用

(2)「田中」グループ

- ① 主たる共同研究者:田中 伸幸 (宮城県立がんセンター研究所がん先進治療開発研究部 部長)
- ② 研究項目
 - ・ヘテロな細胞外小胞の機能的異質性の解析:人工細胞外小胞・粒子の機能評価系の構築