

エクソソーム分泌を制御する細胞内分子基盤

松井 貴英, 福田 光則

1. はじめに

エクソソームは、直径50~200nm程度の細胞外小胞で、内腔小胞を持つmultivesicular body (MVB, 後期エンドソームとも呼ばれる) に由来する (図1)。エクソソームという名称が初めて用いられたのは1987年のことで¹⁾、当時は細胞外へ細胞内の不要タンパク質を排出するゴミ袋のようなものと考えられていた。しかし、近年では、エクソソームにはさまざまな生理活性分子 (タンパク質、マイクロRNAなどの核酸、脂質、糖など) が含まれており、細胞間情報伝達に用いられること、さらにはがんや神経変性疾患などとの関連も報告されている。このように、エクソソームの生理機能や臨床・応用研究が盛んな一方で、そもそもエクソソームが細胞内でどのように形成され、分泌へと至るのか、その詳細な分子基盤は未解明な点が数多く存在する。本稿では、エクソソーム分泌に至る細胞内分子基盤、特に細胞内で形成されたエクソソームを選択的に細胞膜方向へ輸送するメカニズムについて、最近我々が明らかにしたモデルを中心に紹介したい。

2. 既知の細胞内エクソソーム輸送機構

エクソソームが分泌されるには、細胞内で形成された内腔小胞 (エクソソームの元) を含むMVBが、細胞骨格上を細胞膜方向へ選択的に輸送され、細胞膜と融合し、内腔小胞がエクソソームとして細胞外へと分泌される必要がある (図1)。先行研究から、このMVBの細胞膜方向への選択的輸送を制御する分子として、低分子量Gタンパク質Rabファミリーに属するRab27A, Rab27B (以下Rab27A/

Bと記載) が知られている²⁾。Rabは真核生物に普遍的に保存されているタンパク質群で、哺乳類では約60種類存在する。RabはGTPと結合した活性化型、GDPと結合した不活性化型をサイクルするスイッチ分子であり、活性化したRabは特定の小胞や細胞小器官上に局在する。さらに、活性化型Rabはエフェクターと呼ばれる特定のタンパク質と複合体を形成することで、局在する小胞や細胞小器官の細胞内輸送を制御する³⁾ (図2)。上述のRab27A/Bは、MVB上に局在し、Slp4 (Synaptotagmin-like protein 4) などのエフェクターと複合体を形成することで、MVBの細胞膜方向への輸送を制御することが報告されている²⁾。実際に、RNA干渉法によるRab27A/Bのノックダウン (KD) は、エクソソーム分泌を効率的に阻害する方法として広く用いられている。しかし近年のCRISPR/Cas9システムを用いた解析から、Rab27A/Bダブルノックアウト (DKO) 樹状細胞では、エクソソーム分泌が50%程度しか阻害されないことが報告されており⁴⁾、現在では、Rab27A/B非依存的な細胞膜方向へのMVB輸送機構が存在すると考えられている。

3. エクソソームの多様性

これまで、一つの細胞は1種類のエクソソームを分泌すると考えられていたが、最近の研究から単一の細胞が大ききや内容物の異なるさまざまなエクソソームを分泌することが明らかになってきている (これをエクソソームの多様性と呼ぶ)⁵⁾。しかし、細胞内で多様なエクソソームがどのように形成され、分泌されるのか、その分子基盤は、まったくわかっていなかった。これは分泌されたエクソソームを丸ごと回収することは容易だが、多様なエクソソームを性質ごとに分けて回収し、解析することが技術的に難しいことに起因する。この問題を解決すべく、我々は上皮細胞株のMDCK細胞を用いた解析を行っている。

MDCK細胞はイヌの尿細管由来の培養細胞で、極性を持ち、密着結合を隔てて頂端膜、側底膜と呼ばれる性質の異なる細胞膜を形成する (図3)。MDCK細胞をセルカルチャーインサートと呼ばれるフィルター上で培養することで、頂端膜側と側底膜側の培養液を物理的に分けて回収することができる。実際に各培養液から超遠心分離によりエクソソーム (以下、頂端膜エクソソーム、側底膜エク

東北大学大学院生命科学研究科膜輸送機構解析分野 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3 理学研究科合同A棟10階1015)

Intracellular molecular mechanisms of exosome release

Takahide Matsui and Mitsunori Fukuda (Laboratory of Membrane Trafficking Mechanisms, Department of Integrative Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Aoba 6-3, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8578, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950055

© 2023 公益社団法人日本生化学会

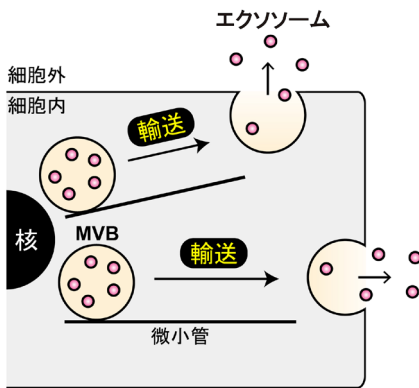


図1 エクソソーム分泌のモデル
 エクソソームの元である内腔小胞を含有するMVBが微小管に沿って細胞膜方向へ輸送され、細胞膜と融合することで、内腔小胞がエクソソームとして細胞外へ分泌される。

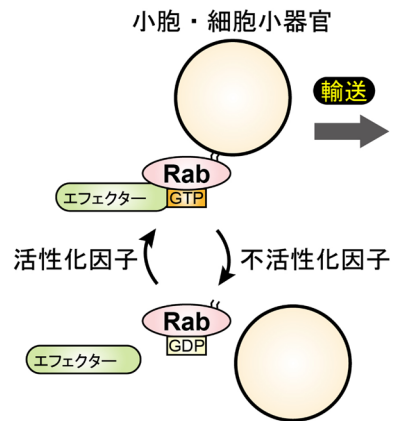


図2 低分子量Gタンパク質Rabによる小胞輸送の制御モデル
 GTPと結合した活性化型Rabはエフェクタータンパク質と複合体を形成することで、特定の小胞・細胞小器官上に局在し、その細胞内輸送を制御する。Rabの活性状態は、活性化因子、不活性化因子により調節される。

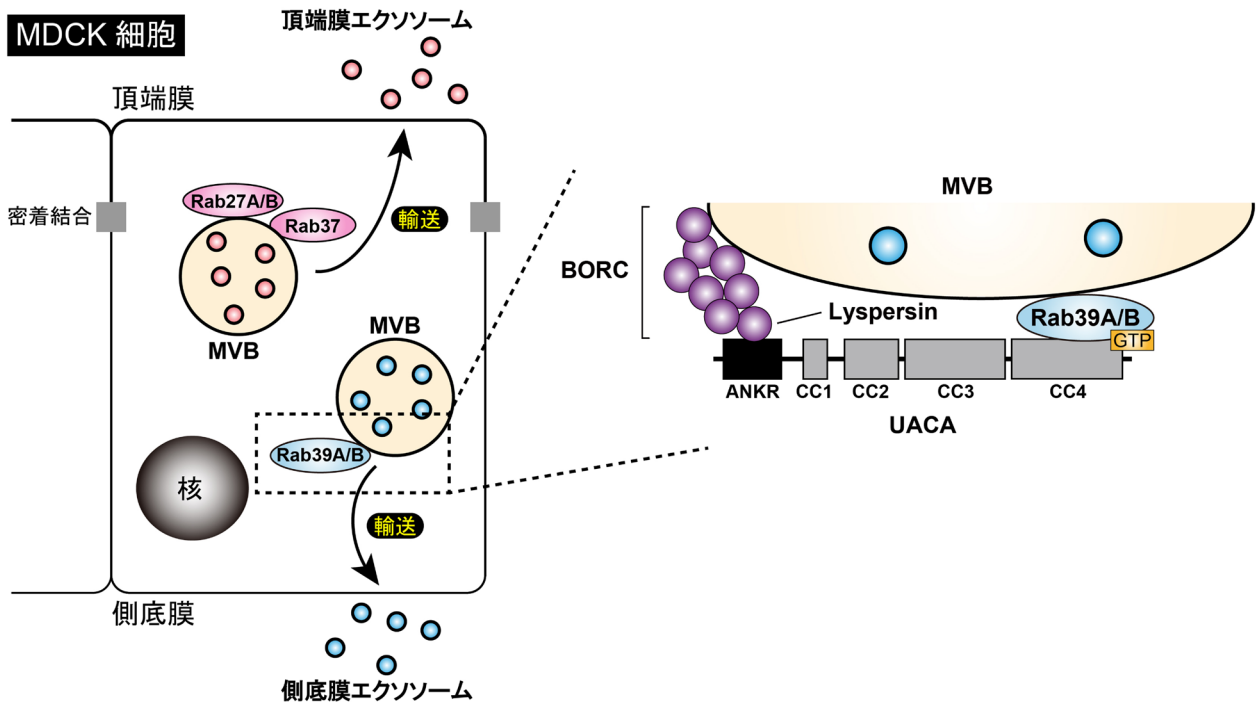


図3 Rab39A/Bが制御する側底膜エクソソームの細胞内輸送機構
 Rab39A/BはMVB上でUACA, BORCと複合体を形成することで、MVBを側底膜方向へと選択的に輸送し、側底膜エクソソーム分泌を制御する。BORCはヘテロ八量体で構成される複合体で、ここでは簡略化のため同じ形の丸八つで示す。

ソソームと呼ぶ)を回収し、質量分析を用いた網羅的な組成解析を行ったところ、たとえば頂端膜エクソソームではCD63が豊富であるのに対して、側底膜エクソソームではCD9, CD81が豊富であるなど、頂端膜エクソソームと側底膜エクソソームではタンパク質組成が大きく異なっていることを発見した⁶⁾。さらに、頂端膜エクソソームと側底膜エクソソームの形成機構の解明を目指し、MDCK細胞を用いて内腔小胞の形成に関わるESCRT複合体などのノッ

クダウンや阻害剤を用いた解析を行ったところ、頂端膜エクソソームの形成にはALIX-Syntenin 1-Syndecan 1と呼ばれるタンパク質複合体が、側底膜エクソソームの形成にはスフィンゴ脂質の一種であるセラミドが必要であることを見いだした⁶⁾。以上の結果は、MDCK細胞がエクソソームの多様性を研究する上で有用なモデル細胞であることを強く示唆している。

4. 頂端膜エクソソームと側底膜エクソソームの細胞内極性輸送

1) エクソソーム分泌に関わる Rab の探索

MDCK細胞が頂端膜エクソソーム、側底膜エクソソームを分泌するには、細胞内で形成された各エクソソームを含むMVBを頂端膜、側底膜方向へ選択的に輸送する必要がある。このMVBの選択的輸送機構を解明すべく、前述のRab27A/Bとともに欠損した*Rab27A/B*-DKO MDCK細胞を作製し⁷⁾、エクソソーム分泌を評価したところ、頂端膜エクソソーム分泌のみが部分的に阻害されることがわかった。この結果は、頂端膜エクソソームの一部、および側底膜エクソソームはRab27A/B非依存的な機構により各細胞膜方面へ輸送される可能性を強く示唆する。

前述のように、Rabは哺乳類に約60種類保存されており、現在までにその機能が未解明のアイソフォームも多数存在する。そこで我々は、上述のRab27A/B非依存的なMVB輸送機構は他のRabアイソフォームにより制御されている可能性が高いと推測し、頂端膜エクソソームと側底膜エクソソームの細胞内輸送に関与するRabアイソフォームの探索を行った。具体的には、MVBに局在し、かつKOによりエクソソーム分泌に影響を与えるRabアイソフォームを探索したところ、Rab27A/B以外にRab37とRab39A/Bを同定することに成功した⁸⁾。興味深いことに、*Rab37*-KO細胞では*Rab27A/B*-DKO細胞と同じく、頂端膜エクソソーム分泌が部分的に阻害されるのに対し、*Rab39A/B*-DKO細胞では側底膜エクソソーム分泌のみが阻害されることがわかった。また、*Rab37*-KO細胞、*Rab39A/B*-DKO細胞のどちらもMVBの形態や数、頂端膜・側底膜の極性形成に異常は認められなかった。これまでにRab37とRab39A/BがMVB輸送やエクソソーム分泌に関連するという報告はなかったことから、Rab37、Rab39A/BはそれぞれMVBを選択的に頂端膜、側底膜方向へ輸送し、エクソソーム分泌を制御する新規因子と考えられる(図3)。

2) Rab39A/Bのエフェクタータンパク質UACA

前述のように、RabはGTPと結合した活性化状態でエフェクターと複合体を形成し、小胞や細胞小器官の輸送を制御する(図2)。先行研究で我々は、Rab39A/Bのエフェクター候補としてuveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats (UACA)を同定している⁹⁾。UACAはN末端からC末端にかけて、一つのankyrin repeat domain (ANKR)、四つのcoiled-coil (CC) domain (以下CC1~CC4と記載)を持つタンパク質で(図3)、これまでにNF- κ B経路との関連性などが報告されているが¹⁰⁾、エクソソーム分泌に関する報告はなかった。そこでUACA-KO MDCK細胞を作製し、エクソソーム分泌への影響を評価したところ、

UACA-KO細胞では*Rab39A/B*-KO細胞と同じく、側底膜エクソソームの分泌のみが阻害されることがわかった。さらにこの表現型は全長のUACAの再発現によりレスキューされるが、Rab39A/Bとの結合領域(CC4)を欠損した変異体の再発現ではレスキューされなかった⁸⁾。この結果は、UACAがRab39A/Bと複合体を形成することで、側底膜エクソソームの分泌を制御している可能性を強く示唆する(図3)。また、HeLa細胞(ヒト子宮頸がん由来)やMCF10A(ヒト乳腺上皮由来)細胞においても、Rab39A/BあるいはUACAのKDがエクソソーム分泌を阻害することが確認されたことから、Rab39A/B-UACA複合体が制御するエクソソーム分泌制御機構は幅広い細胞種、動物種で保存されていると考えられる。

3) UACAとBORCの相互作用

MVBを側底膜方向へ輸送するには、微小管上を順行性輸送される必要がある。以前のinteractomeの研究で、UACAはLyspersinと呼ばれるタンパク質と相互作用することが報告されている^{11,12)}。Lyspersinは、BLOC-1-related complex (BORC)と呼ばれる、MVBやリソソーム上に局在し、MVB/リソソームの微小管上順行性輸送を制御する巨大なタンパク質複合体の構成因子である¹³⁾。このため、*Lyspersin*をKOしたHeLa細胞では、MVB/リソソームが輸送できず核周辺に凝集することが報告されている¹⁴⁾。

実際にLyspersinとUACAの相互作用を共免疫沈降実験により検証したところ、細胞内でのUACAとLyspersinの結合が確認された。また、Lyspersinとともに、BORC構成因子であるSnapinもUACAと共免疫沈降されたことから、UACAはLyspersinタンパク質というよりもBORCと相互作用していると考えられる。さらに、LyspersinはUACAのANKRと結合すること、ANKRを欠損した変異体ではUACA-KO MDCK細胞で観察された側底膜エクソソーム分泌阻害がレスキューされなかったことから⁸⁾、UACAとLyspersin (BORC)の相互作用が側底膜エクソソーム分泌に必要であることが明らかになった(図3)。

4) Rab39A/Bが制御する側底膜エクソソーム輸送機構

前述のように、UACAは異なる領域でLyspersin、およびRab39A/Bと結合する(図3)。そこで、LyspersinとRab39A/Bが同時にUACAと結合できるか、免疫沈降を用いて検討したところ、実際にRab39A/B-UACA-Lyspersinという三者複合体を形成できることがわかった。

最後に*Lyspersin*-KO MDCK細胞を作製し、各エクソソーム分泌への影響を評価したところ、頂端膜エクソソーム、側底膜エクソソームともに顕著な分泌阻害が観察された。また、HeLa細胞での報告¹⁴⁾と同じく、*Lyspersin*-KO

MDCK細胞でもMVBの核周辺への顕著な蓄積が観察されたことから、各エクソソームを含有するMVBを頂端膜、側底膜方向へ輸送できず、エクソソーム分泌阻害が起きていると考えられる。

上述のように、*Rab39A/B*-DKO細胞や*UACA*-KO細胞では側底膜エクソソーム分泌のみが阻害される。したがって、*Rab39A/B*-*UACA*-Lyspersin (BORC) 複合体は、MVBの側底膜方向への輸送を選択的に制御しており⁸⁾ (図3)、BORC自身はMVBの頂端膜方向への輸送にも関与していると推測される。本稿前半で述べたように、*Rab27A/B*と*Rab37*は頂端膜エクソソームの分泌にのみ関与する。これらのRabとBORCとの関係性についての報告は現状ないが、何かしらの(直接的・間接的)相互作用を介して頂端膜エクソソーム輸送を制御している可能性は十分考えられ、今後の研究の進展が期待される。

5. おわりに

本稿では、MDCK細胞から分泌される頂端膜、側底膜エクソソームの選択的な分泌機構について、細胞内のエクソソーム輸送(正確には、エクソソームの元となる内腔小胞を含有するMVBの輸送)という観点から解説した。エクソソームが分泌されるには、輸送されたMVBが輸送先の細胞膜と融合する必要があるが、現状、この細胞膜とMVBの融合過程の分子基盤についてもほとんど解明されていない。今後、この融合過程の分子基盤が解明されれば、エクソソーム分泌、特にエクソソームの多様性を生み出す分子基盤の真の理解へとつながるとともに、エクソソームが関与する疾患の予防、治療等への応用・発展が期待できる。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、共同研究者ならびに所属研究室のメンバーの尽力により達成できた成果です。この場を借りて心から感謝申し上げます。

文 献

- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., & Turbide, C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.*, **262**, 9412–9420.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010) *Rab27a* and *Rab27b* control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 19–30, 1–13.
- Homma, Y., Hiragi, S., & Fukuda, M. (2021) Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J.*, **288**, 36–55.
- Alexander, M., Hu, R., Runtsch, M.C., Kagele, D.A., Mosbrugger, T.L., Tolmachova, T., Seabra, M.C., Round, J.L., Ward, D.M., & O'Connell, R.M. (2015) Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat. Commun.*, **6**, 7321.
- van Niel, G., Carter, D.R.F., Clayton, A., Lambert, D.W., Raposo, G., & Vader, P. (2022) Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 369–382.
- Matsui, T., Osaki, F., Hiragi, S., Sakamaki, Y., & Fukuda, M. (2021) ALIX and ceramide differentially control polarized small extracellular vesicle release from epithelial cells. *EMBO Rep.*, **22**, e51475.
- Homma, Y., Kinoshita, R., Kuchitsu, Y., Wawro, P.S., Marubashi, S., Oguchi, M.E., Ishida, M., Fujita, N., & Fukuda, M. (2019) Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **218**, 2035–2050.
- Matsui, T., Sakamaki, Y., Nakashima, S., & Fukuda, M. (2022) *Rab39* and its effector *UACA* regulate basolateral exosome release from polarized epithelial cells. *Cell Rep.*, **39**, 110875.
- Mori, Y., Matsui, T., Omote, D., & Fukuda, M. (2013) Small GTPase *Rab39A* interacts with *UACA* and regulates the retinoic acid-induced neurite morphology of *Neuro2A* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **435**, 113–119.
- Dang, H.V., Sakai, T., Pham, T.A., Tran, D.H., Yorita, K., Shishido, Y., & Fukui, K. (2015) Nucling, a novel apoptosis-associated protein, controls mammary gland involution by regulating *NF- κ B* and *STAT3*. *J. Biol. Chem.*, **290**, 24626–24635.
- Huttlin, E.L., Ting, L., Bruckner, R.J., Gebreab, F., Gygi, M.P., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Colby, G., Baltier, K., et al. (2015) The BioPlex network: A systematic exploration of the human interactome. *Cell*, **162**, 425–440.
- Huttlin, E.L., Bruckner, R.J., Paulo, J.A., Cannon, J.R., Ting, L., Baltier, K., Colby, G., Gebreab, F., Gygi, M.P., Parzen, H., et al. (2017) Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*, **545**, 505–509.
- Pu, J., Schindler, C., Jia, R., Jarnik, M., Backlund, P., & Bonifacio, J.S. (2015) BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning. *Dev. Cell*, **33**, 176–188.
- Filipek, P.A., de Araujo, M.E.G., Vogel, G.F., De Smet, C.H., Eberharter, D., Rebsamen, M., Rudashevskaya, E.L., Kremser, L., Yordanov, T., Tschakner, P., et al. (2017) LAMTOR/Ragulator is a negative regulator of *Arl8b*- and BORC-dependent late endosomal positioning. *J. Cell Biol.*, **216**, 4199–4215.

著者寸描**●松井 貴英** (まつい たかひで)

東北大学大学院生命科学研究所膜輸送機構解析分野助教, 博士 (生命科学).

■**略歴** 2009年東北大学理学部生物学科卒業. 14年同大学院生命科学研究所修了 (福田光則研究室). 東京大学医学系研究科分子生物学分野 (水島昇研究室) で4年間のポストドクを経て, 18年より現所属にて特任助教. 19年より現職.

■**研究テーマと抱負** 細胞外小胞の形成, 輸送, 分泌の分子メカニズムの解明. 細胞生物学視点から, 未解決問題だらけの細胞外小胞分野を切り拓いていきたい.

■**ウェブサイト** http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/fukuda_lab/home-ja.html

■**趣味** 料理, 読書.

●福田 光則 (ふくだ みつのり)

東北大学大学院生命科学研究所 教授.

その他については本誌79巻11号 (2007), p.1073をご参照ください.

■**ウェブサイト** <https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail---id-1724.html>