

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「高精度 1 分子観察によるエクソソーム膜
動態の解明」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者:鈴木 健一
(岐阜大学 糖鎖生命コア研究所 教
授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

がん細胞由来の細胞外小胞(エクソソームまたは small extracellular vesicles, sEV)は、将来の転移先の細胞に取り込まれた後、前転移ニッチを形成し、がん細胞が転移しやすい環境を形成すると報告されている。sEV と受容細胞との結合には、sEV 上のインテグリンと受容細胞上の細胞外マトリックスが関与するケースが多いことが示唆されていた。また、sEV 膜ではラフト脂質が豊富で、特に糖脂質ガングリオシドが最も濃縮されていると報告されている。また、インテグリンの細胞外マトリックスへの結合活性は、そのアスパラギン結合型(N 型)糖鎖の構造とガングリオシドにより制御されるとも報告されていた。

しかし、精製法の違いにより sEV 内の分子組成が異なるので、sEV にはサブタイプがあると示唆されていた。sEV 膜上のインテグリンが受容細胞膜への結合を仲介していることは証明されておらず、sEV の結合の制御機構も分子レベルでは不明であった。そこで本研究では我々の持つ高精度1分子観察技術をさらに改善して、各々の sEV1粒子の挙動と受容細胞膜上分子の相互作用の機序を明らかにしようと試みた。結果、以下に示す通り、1) sEV の膜物性、2) sEV と受容細胞との結合機構、3) sEV の結合や取り込み後の機能発現機構を解明した。また、それらを明らかにする上で必要な基盤技術の開発を進めた。

1) sEV のキャラクタリゼーション、膜物性測定

- a) 花島 G の固体 NMR 解析や蛍光寿命、異方性測定により、細胞外小胞(sEV)膜は表裏非対称性がある程度保たれ、細胞膜よりも sEV 膜の方がラフトが多いことを明らかにした。
- b) 鈴木 G による1分子観察の結果、がん細胞由来の細胞外小胞には、テトラスパニンの含量が大きく異なるサブタイプが存在することを発見した。
- c) 佐藤 G が開発した膜欠損認識プローブを用いた1分子観察の結果、sEV サブタイプごとに膜流動性が異なることを明らかにした。
- d) 許 G が開発したナノ流体デバイス aifA 中で、超解像顕微鏡法 (dSTORM 法)により、sEV の粒径分布を観察する手法を開発した。

2) sEV の受容細胞膜への結合機構の解明

- a) 鈴木 G による1分子観察の結果、sEV の受容細胞膜表面への結合は、インテグリンとラミニンとの結合によることを明らかにした。また、その結合機構も明らかにした。
- b) 鈴木 G による 1 分子観察の結果、sEV の受容細胞表面への結合は、a)に加え、糖脂質 GM1とラミニンとの結合も寄与することを明らかにした。
- c) 鈴木 G は、sEV を平面膜化し、1分子観察することで、分子の会合体形成や分子間相互作用を観察するシステムを開発した。
- d) 木塚 G による Glycomics 解析により、細胞膜よりも sEV 膜のインテグリン $\beta 1$ の方が、高分岐型 N 型糖鎖とシアル酸が多いことが明らかとなった。
- e) 安藤 G が全合成した数々の光反応性ガングリオシドプローブを用いた光架橋実験(鈴木 G)の結果、特定のガングリオシドとインテグリン $\beta 1$ が相互作用することを明らかにした。これは花島 G による表面プラズモン共鳴法実験や鈴木 G による1分子観察でも検証できた。

3) 受容細胞への sEV 結合・取り込み後の機能発現機構の解明

- a) 木塚 G は、生化学実験により、B16 メラノーマ細胞由来 sEV 中に高分岐型 N 型糖鎖合成酵素 GnT-V やシアル酸転移酵素 ST6GalI が濃縮されていて、受容細胞により取り込まれた後、受容細胞中で高分岐型 N 型糖鎖の量を増加させることを見出した。
- b) 鈴木Gは、生細胞中 20 nm の空間分解能、疑似リアルタイムで観察可能な2色同時超解像動画観察技術を開発した。これにより、sEV サブタイプが取り込まれる経路を明らかにした。また、3次元2色同時超解像観察システムも開発し、上記を3次元観察でも確認した。

- c) 鈴木 G は、sEV の受容細胞への結合後に起こるシグナル伝達機構とその意義を明らかにした。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. sEV 取り込み後の受容細胞上の糖鎖構造改変機構の解明

概要: 分岐型 N 型糖鎖やシアル酸はがん細胞で多いが、特に sEV 上で高濃度であることを明らかにした。さらに、高分岐型 N 型糖鎖合成酵素やシアル酸転移酵素が sEV 中に濃縮されること、濃縮される前に酵素で切断されること、その sEV が受容細胞に取り込まれた後に、受容細胞上で高分岐型 N 型糖鎖の発現量を増加させること、を明らかにした。(Hirata et al., *iScience*, 2023)

2. がん細胞由来 sEV の受容細胞への特異的結合機構の解明

概要: sEV 上のインテグリンと受容細胞上のラミニンが特異的に結合することにより、EV と受容細胞が結合する機構、他の ECM と sEV の結合が起こりにくい機構の詳細を明らかにした。

3. がん細胞由来 sEV の受容細胞形質膜上でのシグナル伝達機構の解明

概要: 2色同時1分子・超解像顕微鏡観察によって、sEV 中インテグリンと受容細胞上ラミニンが結合した後に、受容細胞内で誘起される一連のシグナル伝達の分子機序を詳細に解明することに成功した。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 超解像動画観察技術による形質膜・内膜における分子間相互作用観察・解析技術の開発

概要: 本研究で開発した超解像動画観察技術を発展させて、2色同時超解像動画観察や1分子・超解像動画同時観察技術を開発した。形質膜や内膜上で非常に多くの構造間、構造-分子間、分子間の相互作用の機序を解明するための強力な手法を開発した。

2. sEV 膜内分子間相互作用解析法の開発

概要: sEV 膜内での分子間相互作用を検出するための手段として、同位体標識プローブの NMR 解析法や光反応性ガングリオシドプローブを用いた光架橋法を開発した。これらは、従来の界面活性剤を加えて行う免疫沈降法に比べると摂動が少ないので、相互作用分子を同定する新しい方法として大いに期待できる。

3. sEV の平面膜化による分子間相互作用解析法の開発

概要: sEV 膜上の分子間相互作用を検出するための手法として、sEV 膜に摂動をかけて平面膜化する手法を開発した。これにより、例えば sEV 膜上分子の会合体形成や分子間相互作用の詳細を1分子観察により明らかにすることができる。

< 代表的な論文 >

1. Hirata, T., Harada, Y., Hirose, K. M., Tokoro, Y., Suzuki, K. G. N., Kizuka, Y. N-acetylglucosaminyltransferase-V (GnT-V)-enriched small extracellular vesicles mediate N-glycan remodeling in recipient cells. *iScience*, 26, 105747, 2023.

概要: B16 細胞由来 sEV 中に高分岐型 N 型糖鎖合成酵素(GnT-V)やシアル酸転移酵素(ST6Gal1)が濃縮されることを見出した。SPPL3 で切断されてから、GnT-V は sEV に取り込まれることも明らかになった。取り込まれた受容細胞中で高分岐型 N 型糖鎖の量が増加することを見出した。

2. Yasuda, T., Watanabe, H., Hirose, K. M., Suzuki, K. G. N., Suga, K., Hanashima, S.

Fluorescence spectroscopic analysis of lateral and transbilayer fluidity of exosome membranes. *Langmuir*, 38, 14695-14703, 2022.

概要: sEV に蛍光プローブを導入し、蛍光異方性測定したところ、ラフト様(Lo)相と非ラフト様(Ld)相の混合相の異方性を示すことを明らかにした。また、sEV 膜中 C-laurdan で測定した GP 値(流動性の指標)も混合相に近いことを見出した。sEV 膜中での蛍光寿命測定では、内層と外層とで膜環境が異なっていることを見出した。これらの結果は、sEV 膜では表裏非対象性は維持され、ラフトドメインが豊富であることを示唆している。

3. Komura, N., Kato, K., Udagawa, T., Asano, S., Tanaka, H.N., Imamura, A., Ishida, H., Kiso, M., Ando, H. Constrained sialic acid donors enable selective synthesis of α -glycosides. *Science*, 364, 677-680, 2019.

概要: ガングリオシドの化学合成時に、シアル酸を立体選択的に結合させる必要があり、困難な点であった。この問題を大環状シアル酸を用いることで解決した。すなわち、大環状シアル酸によって、 α -グルコシド結合でシアル酸をつなぐことができ、系統的なガングリオシド合成法が確立された。これにより、光反応性または同位体標識ガングリオシドプローブ合成が飛躍的に進み、本研究で何種類も合成して調べることができるようになった。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「1分子イメージング」グループ

研究代表者: 鈴木 健一(岐阜大学糖鎖生命コア研究所 教授)

研究項目

- ・ガングリオシドとインテグリンの結合の生化学的あるいはイメージングによる探索と機能制御の解明
- ・sEV の1粒子追跡による受容細胞との結合機構の解明
- ・超高精度イメージングによる sEV の受容細胞による取り込み経路の解明と取り込み後の機能発現の検証
- ・sEV 平面膜化と分子間相互作用の1分子イメージングによる解明
- ・sEV 上のリガンドによる受容細胞膜上における信号伝達誘起と受容細胞改変機構の解明

② 「糖鎖合成化学」グループ

主たる共同研究者: 安藤 弘宗(岐阜大学糖鎖生命コア研究所 教授)

研究項目

- ・同位体標識ラベル脂質プローブの合成
- ・ビオチン化または蛍光ラベル光反応性ガングリオシドアナログの合成

③ 「NMR 解析」グループ

主たる共同研究者: 花島 慎弥(鳥取大学大学院工学研究科 教授)

研究項目

- ・膜脂質の NMR 解析法の開発と膜ドメイン構造解明や膜脂質表裏非対称性の検証
- ・インテグリンとガングリオシドの結合の NMR 法による検出

④ 「糖鎖生化学」グループ

主たる共同研究者: 木塚 康彦(岐阜大学糖鎖生命コア研究所 教授)

研究項目

- ・sEV 膜上のインテグリン糖鎖の Glycomics/Glycoproteomics と N 型糖鎖の改変
- ・sEV による受容細胞膜上分子の N 型糖鎖の改変

⑤ 「ナノ流体デバイス」グループ

主たる共同研究者: 許岩 (大阪公立大学大学院工学研究科 准教授)

研究項目

・ナノ流体デバイス aifA を用いた sEV の粒径ごとの分画手法の確立

⑥ 「膜環境プローブ解析」グループ

主たる共同研究者: 佐藤雄介 (東北大学大学院理学研究科 准教授)

研究項目

・膜欠損認識蛍光プローブを用いた sEV サブタイプごとの膜物性の解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- 1) 同じ CREST 細胞外微粒子領域の秋吉チームの古川グループとガングリオシドによる sEV の ECM 結合活性制御機構についての共同研究を行っている。
- 2) 細胞外微粒子さがけの星野歩子先生から sEV 産生細胞 (ヒト乳がん細胞) を送っていただいた。
- 3) sEV の人工膜化の実験で、神戸大学バイオシグナル総合センター森垣憲一教授から、パターン化膜を供給していただいている。
- 4) 多くの細胞外小胞の研究者の先生方から講演依頼を受け、発表させていただいている。