OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	c-Src regulates formation and secretion of exosome by direct interaction with Alix
Author(s)	桒原, 敦
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92174
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　栗原 敦　）	
論文題名	c-Src regulates formation and secretion of exosome by direct interaction with Alix （c-SrcはAlixとの直接の相互作用を介してexosomeの形成・分泌を制御する）

非受容体型のチロシンキナーゼc-Srcは多種のがんにおいてその活性亢進が認められるがん原遺伝子であり、それゆえに生体内では厳密に制御されている。c-Srcはそのリン酸化と脱リン酸化によって制御されるメカニズムがこれまで詳細に研究されてきたが、それと同時に細胞内の局在によっても制御されうる。

本研究では、活性化したc-Srcがエンドソーム系の一部である多胞体（MVE, multivesicular endosome）へとリクルートされ、多胞体の小胞（ILVs, Intraluminal vesicles）内に取り込まれて細胞外小胞"エクソソーム"として分泌されることを発見した。また同時にc-Srcの活性化はc-Srcタンパク質自身を含んだエクソソームの分泌量を増加させていた。c-Srcの変異体を用いた解析から、この過程にはc-Srcのキナーゼ活性だけでなくSH2・SH3ドメインを介した相互作用も必須であると判明した。この結果を踏まえエクソソーム中のc-Src結合タンパク質の解析を行ったところ、Alixがc-Srcによるエクソソームの制御に関わるタンパク質として同定された。

本研究の解析では、AlixのC末端側プロリンリッチドメイン(PRD)とc-SrcのSH3ドメインが結合しており、先行研究ですでに報告されていたc-SrcのSH2ドメインとAlix Bro1ドメイン中のリン酸化チロシンの結合はエクソソームの制御に影響しなかった。また、c-Srcの活性化によって増えるエクソソームの分泌はAlixのノックダウンにより抑制され、野生型Alixの発現を戻すことによってレスキューされた。これに対してPRDを欠くAlix変異体の発現によってはレスキューされず、PRDとSH3ドメインを介した結合によってエクソソームの分泌が制御されていることが明らかになった。

Alixはエンドソーム内腔への小胞形成を実行するESCRT machineryと相互作用するタンパク質であるので、エクソソームの分泌量増加は小胞形成段階での増加であると考えられた。この可能性を確かめるため、細胞から分離した細胞質とエンドソーム膜を用いて*in vitro*でMVE形成を再構成する実験系を構築し小胞形成を定量したところ、エクソソームの分泌量と同様にMVEの形成はc-Srcの活性に依存的であった。また、AlixのPRDを欠いた変異体を用いても同様に、野生型のAlixに比べPRDを欠く変異体ではMVE形成能が低下しており、エクソソームの分泌量増加はエンドソームでの小胞形成過程での増加である事が示された。

以上の結果によりc-Srcは活性化するとMVEへとリクルートされてILVに取り込まれ、エクソソームの分泌を増加させることが明らかとなった。また、これにはc-SrcとAlixの結合が必要であり、c-SrcのSH3ドメインとAlixのPRDが結合していた。こうしたエクソソームの分泌量増加は小胞の形成過程での増加であることも明らかとなった。これらの結果はc-Srcがエクソソームを制御するだけでなく、細胞が活性化したc-Srcタンパク質を細胞外へと分泌していることを意味している。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ 栄原　敦 ）	
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	岡田　雅人
	副 査　教授	石谷　太
	副 査　教授	高木　慎吾

論文審査の結果の要旨

非受容体型のチロシンキナーゼ c-Src は多種のがんにおいてその活性亢進が認められるがん原遺伝子産物であり、それゆえ生体内では厳密に制御され、特にリン酸化と脱リン酸化を介する活性制御メカニズムが明らかにされている。一方近年、細胞内の局在変化によっても制御されることも見出されているが、その分子機序は不明のままである。本研究では、活性化 c-Src がエンドソーム系の一部である多胞体（MVE）へとリクルートされ、多胞体の小胞（ILVs）内に取り込まれて"エクソソーム"として分泌されること、また同時に c-Src の活性化はエクソソームの分泌を増強することを発見した。c-Src の変異体を用いた解析から、この過程には c-Src のキナーゼ活性だけでなく SH2, SH3 ドメインを介した相互作用も必須であることを明らかにした。さらに、エクソソーム中の c-Src 結合タンパク質の解析を行い、Alix を c-Src によるエクソソームの制御に関わるタンパク質として同定した。また、Alix の C 末端側プロリンリッチドメイン（PRD）と c-Src の SH3 ドメインが結合することを明らかにした。さらに、Alix のノックダウン実験や、野生型 Alix や変異体を用いたレスキュー実験により、Alix の PRD と c-Src の SH3 ドメインを介した相互作用がエクソソーム分泌の制御に必須であることを証明した。次に、c-Src と Alix の機能を明らかにするために、細胞質とエンドソーム膜を用いて *in vitro* で MVE 形成を再構成する実験系を構築した。その結果、エクソソーム分泌量と MVE の形成が c-Src の活性に依存的であり、また、Alix の PRD を欠いた変異体では MVE 形成能が低下することから、c-Src 活性化によるエクソソームの分泌量亢進は、Alix によるエンドソームの小胞形成の活性化によることを明らかにした。

以上の成果は、活性化 c-Src が自らを含むエクソソーム産生を亢進し c-Src タンパク質を細胞外へと分泌することによってがん化を抑制する新たな機構の存在を示唆するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。