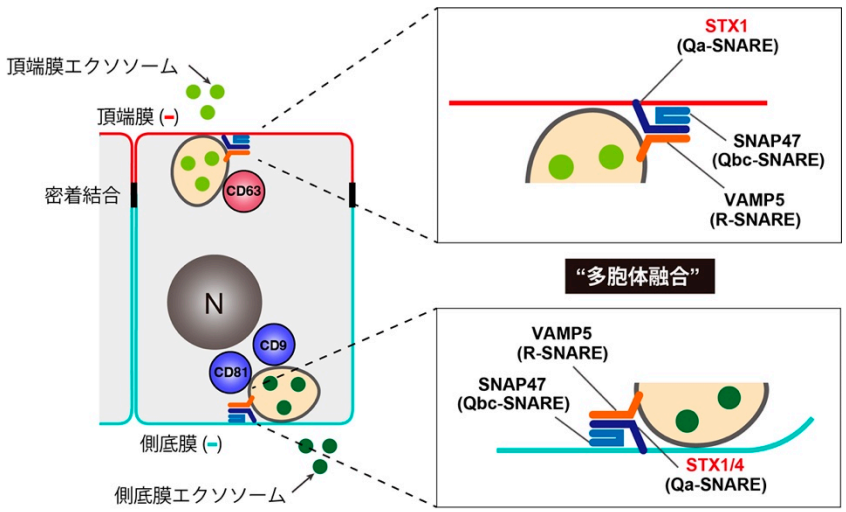
40　上皮細胞におけるエクソソームの極性分泌機構の解明	福田　光則

【目的】上皮細胞は密着結合を挟んで 2 種類の細胞膜（頂端膜と側底膜）を持ち、それぞれの膜から異なるタイプのエクソソーム、すなわち CD63 を豊富に含む頂端膜エクソソームと CD9 や CD81 を豊富に含む側底膜エクソソームを分泌している。これまでの私達の研究で、これら 2 種類のエクソソームの基となる多胞体の形成・輸送機構は全く異なることが明らかになっている。細胞膜まで輸送された多胞体は、最終的に頂端膜や側底膜と融合することで、エクソソームの分泌が起こるが、この最終ステップの分子基盤はこれまで謎に包まれていた。そこで本研究では、膜融合の普遍的制御因子である SNARE 複合体に着目し、SNARE 複合体を介した頂端膜・側底膜エクソソームの分泌機構を明らかにすることで、上皮細胞におけるエクソソームの極性分泌の分子機構の全容解明を目指した。

【方法】本研究ではまず、哺乳動物に存在する約 40 種類の SNARE 蛋白質を対象に、多胞体に局在するもの（R-SNARE）を免疫染色法により網羅的に探索した。次に、得られた候補 R-SNARE と複合体を形成可能な Qa/Qbc-SNARE を共免疫沈降法により同定した。最後に、候補 R/Q-SNARE 蛋白質を特異的な siRNA を用いて MDCK 細胞（上皮細胞モデル）でノックダウンし、頂端膜・側底膜エクソソーム分泌への効果を検証した。

【結果】ヒトやマウスに存在する全ての SNARE 蛋白質を対象とした網羅的な局在スクリーニングの結果、7 種類の SNARE 蛋白質が MDCK 細胞で CD63 陽性の多胞体に局在することが明らかになった。これらの候補の中で、極性を持たない HeLa 細胞でも CD63 陽性の多胞体に局在するものをさらに探索したところ、R-SNARE の VAMP5 が両者に共通して多胞体に最も良く局在することを見出した。次に、免疫沈降法を用いた網羅的な結合実験により、VAMP5 と対をなす Qbc-SNARE として SNAP47 を、Qa-SNARE としてシンタキシン 1A/1B/4（STX1/4）の 3 種類を同定することに成功した。Qa-SNARE の STX1/4 の MDCK 細胞での細胞内局在を検討したところ、STX1 は頂端膜・側底膜の両方の細胞膜に、STX4 は側底膜にのみ分布することが明らかになった。この分布と一致して、STX1 欠損細胞では VAMP5 や SNAP47 の欠損細胞と同じく、頂端膜・側底膜エクソソームの両方の分泌が阻害されていたが、STX4 欠損細胞では側底膜エクソソームの分泌のみが選択的に阻害されていた。興味深いことに、これらの SNARE 蛋白質は HeLa 細胞にも発現しており、ノックダウンによりエクソソーム分泌が顕著に阻害されることが明らかになった。また、STX1 と STX4 の同時欠損 HeLa 細胞では、エクソソーム分泌阻害に対する相加的な効果も観察されたことから、両者が独立に機能している可能性が強く示唆された。すなわち、SNARE 複合体によるエクソソーム分泌の制御機構も複数存在することから、極性の有無に関わらず、多胞体の融合レベルでも多様なエクソソームの産生（異質性）に貢献しているものと考えられた（Cell Struct Funct., 2023）。

SNARE 複合体を介するエクソソームの極性分泌機構のモデル



40. 上皮細胞におけるエクソソームの極性分泌機構の解明

福田　光則

東北大学 大学院生命科学研究科 膜輸送機構解析分野

Key words：エクソソーム，多胞体，上皮細胞，SNARE 複合体，小胞輸送

緒　言

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エクソソームは、多胞体に由来する細胞外小胞の一種で、蛋白質・脂質・核酸など様々な生理活性物質を含んでいる。最近、1 つの細胞からサイズや組成の異なるエクソソームが放出されること、すなわち異質性（heterogeneity あるいは多様性）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十分には解明されていなかった［1］。私達はこれまで、密着結合により空間的・物理的に隔てられた 2 種類の細胞膜（頂端膜と側底膜）を持つ上皮細胞に着目し、それぞれの膜から分泌されるエクソソームの形成・輸送機構が全く異なることを明らかにしてきた。すなわち、CD63 を豊富に含む頂端膜エクソソームと CD9 や CD81 を豊富に含む側底膜エクソソームの形成は、それぞれ ALIX–Syntenin1–Syndecan1 複合体と中性スフィンゴミエリナーゼ 2 を介したセラミド代謝により別個に制御されていた［2］。また、これら 2 種類のエクソソームは、基となる多胞体のレベルで別個に頂端膜と側底膜方向へと輸送されており、その制御には異なるセットの低分子量 G 蛋白質 Rab（小胞輸送の普遍的制御因子）が関与していた［3〜5］。これらの Rab によって細胞膜まで輸送された多胞体は、最終的に頂端膜や側底膜と融合することで、エクソソームの分泌が起こるが、この最終ステップの分子基盤はこれまで謎に包まれていた。そこで本研究では、膜融合の普遍的制御因子である SNARE（soluble NSF attachment protein receptor）複合体に着目し［6］、SNARE 複合体を介した頂端膜・側底膜エクソソームの分泌機構を明らかにすることで、上皮細胞におけるエクソソームの極性分泌の分子機構の全容解明を目指した［7］。

方　法

1. 多胞体に局在する R-SANRE 蛋白質の同定

一般的に、SNARE 複合体は輸送小胞（多胞体）上の 1 種類の R-SNARE とターゲットとなる膜（頂端膜・側底膜）上の 2〜3 種類の Qa-SNARE と Qbc-SNARE（あるいは Qb-, Qc-SNARE）が束を形成し、2 つの膜を近接させることで膜の融合を促進する。ヒトやマウスなどの哺乳動物には約 40 種類の SNARE 蛋白質が存在することから、本研究ではまずこれらを全てクローニングし、蛍光蛋白質タグしたものを MDCK 細胞（イヌ腎臓由来の上皮細胞モデル）に発現することで、多胞体に局在するもの（R-SNARE）を免疫染色法により網羅的に探索した。

2. 候補 R-SANRE 蛋白質と複合体を形成する Qa/Qbc-SNARE 蛋白質の同定

上記のスクリーニングで得られた候補 R-SNARE と複合体を形成可能な Qa/Qbc-SNARE を網羅的に探索した。具体的には、候補 R-SNARE と全ての Qa/Qbc-SNARE の組み合わせで培養細胞に発現させ、共免疫沈降法により SNARE 複合体の形成を網羅的に検討した。同定した候補 R/Q-SNARE が実際に MDCK 細胞に発現していることを、特異的な抗体を用いた免疫ブロット法により検証した。

3. 頂端膜・側底膜エクソソーム分泌を制御する SNARE 複合体の同定

同定した候補 R/Q-SNARE を特異的な siRNA を用いて MDCK 細胞でノックダウンし、頂端膜・側底膜エクソソー

ム分泌への効果を検証した。同様なノックダウン実験を極性の無い HeLa 細胞を用いても行い、エクソソーム分泌への影響を検討した。

結果および考察

1. 多胞体に局在する R-SANRE・VAMP5 の同定

ヒトやマウスに存在する全ての SNARE 蛋白質を対象とした網羅的な局在スクリーニングの結果、7 種類の SNARE 蛋白質が MDCK 細胞で CD63 陽性の多胞体に局在することが明らかになった。これらの候補の中で、HeLa 細胞でも CD63 陽性の多胞体に局在するものをさらに探索したところ、R-SNARE の VAMP5 が両者に共通して多胞体に最も良く局在することを見出した（図 1）。

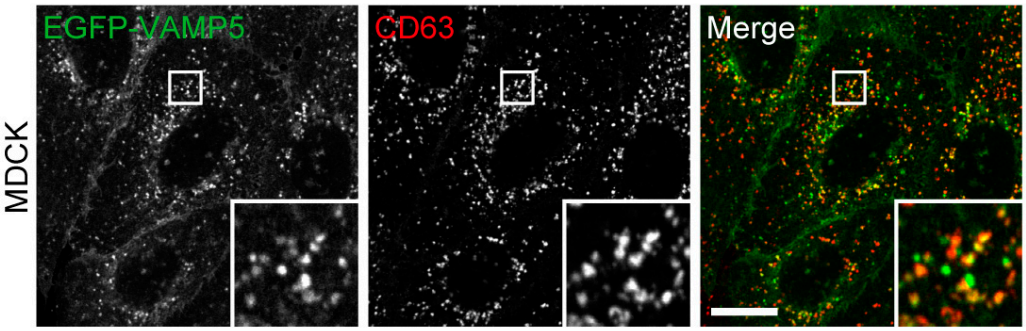


図 1. MDCK 細胞における VAMP5 と CD63（多胞体マーカー）との共局在
挿入図は四角部分の拡大図を示す。スケールバー：20 μm。

2. VAMP5 と対をなす Qa/Qbc-SNARE の同定

次に、網羅的な免疫沈降法を用いた結合実験により、VAMP5 と対をなす Qbc-SNARE として SNAP47 を、Qa-SNARE としてシンタキシン 1A/1B/4（STX1/4）の 3 種類の同定に成功すると共に、3 者が実際に複合体を形成することも確認できた（図 2）。また、これらの SNARE 蛋白質の発現を特異的な抗体を用いて検討したところ、いずれも MDCK 細胞や HeLa 細胞で内在性に発現していることが明らかになった。

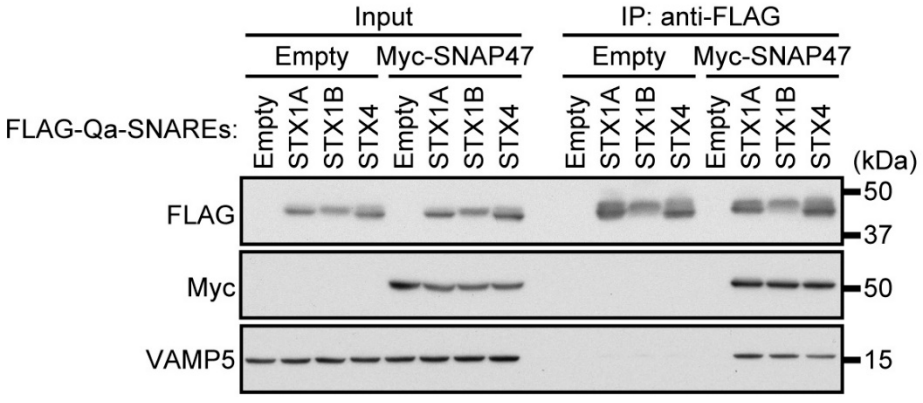


図 2. VAMP5–SNAP47–STX1/4 の *in vitro* での SNARE 複合体の形成
HEK293T 細胞に FLAG タグ付きの Qa-SNARE（STX1/4）と Myc タグ付きの SNAP47 を発現させ、抗 FLAG タグ抗体を用いた免疫沈降法（IP）により内在性の VAMP5 との結合を評価した。

3. SNARE 複合体による頂端膜・側底膜エクソソームの分泌制御機構

上記 2 で同定した Qa-SNARE の STX1/4 の MDCK 細胞での細胞内局在を検討したところ、STX1 は頂端膜・側底膜の両方の細胞膜に、STX4 は側底膜にのみ分布することが明らかになった。この分布と一致して、STX1 欠損細胞では VAMP5 や SNAP47 の欠損細胞と同じく、頂端膜・側底膜エクソソームの両方の分泌が阻害されていたが、STX4 欠損細胞では側底膜エクソソームの分泌のみが選択的に阻害されていた（図 3 及び図 4）。興味深いことに、これらの SNARE 蛋白質は HeLa 細胞にも発現しており、ノックダウンによりエクソソーム分泌が顕著に阻害されることが明らかになった。また、STX1 と STX4 の同時欠損 HeLa 細胞では、エクソソーム分泌阻害に対する相加的な効果も観察されたことから、両者が独立に機能している可能性が強く示唆された。すなわち、SNARE 複合体によるエクソソーム分泌の制御機構も複数存在することから、極性の有無に関わらず、多胞体と細胞膜の融合レベルでも多様なエクソソームの産生に貢献しているものと考えられた［7］。

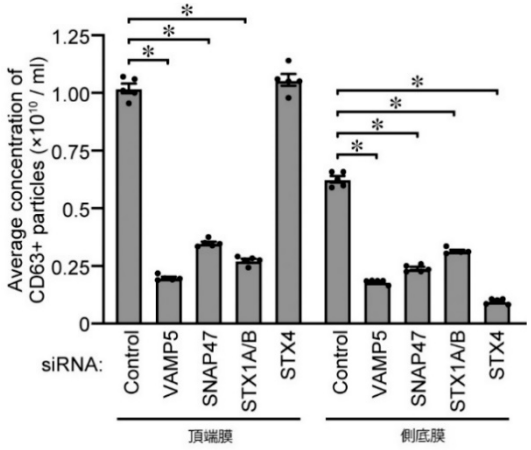


図 3. SNARE 蛋白質のノックダウンによるエクソソームの極性分泌への影響
特異的な siRNA を用いて SNARE 蛋白質のノックダウンを行い、頂端膜・側底膜エクソソーム分泌への影響を検討した。側底膜にのみ局在する STX4 は側底膜エクソソームの分泌のみに、他の SNARE 蛋白質は両方のエクソソーム分泌に関与していた。Tukey's test、*P＜0.01。

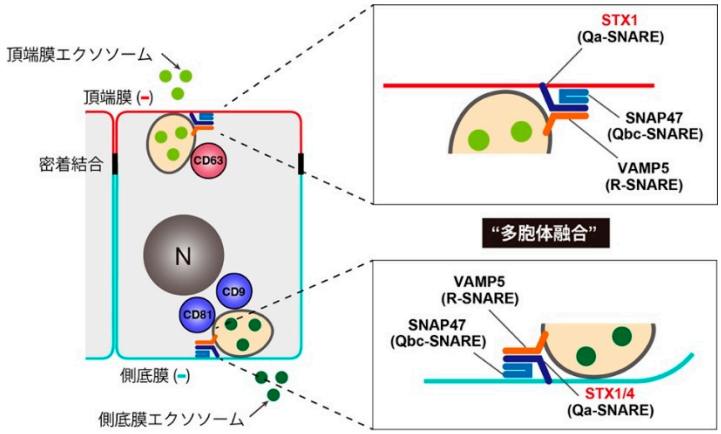


図 4. SNARE 複合体を介するエクソソームの極性分泌機構のモデル
多胞体と細胞膜の融合には、1 種類の R-SNARE と 2 種類の Q-SNARE（Qa/Qbc-SNARE）が強固な束を形成することで、膜の融合を促進する。MDCK 細胞の頂端膜側では STX1 を含む複合体が特異的に、側底膜側では STX1/4 を含む 2 種類の複合体が機能する［7］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、日本医科大学先端医学研究所遺伝子制御学部門の松井貴英講師である。

文　献

1) Kalluri R, LeBleu VS. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. Science. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. PMID: 32029601 DOI: 10.1126/science.aau6977

2) Matsui T, Osaki F, Hiragi S, Sakamaki Y, Fukuda M. ALIX and ceramide differentially control polarized small extracellular vesicle release from epithelial cells. EMBO Rep. 2021 May 5;22(5):e51475. Epub 2021 Mar 16. PMID: 33724661 DOI: 10.15252/embr.202051475

3) Homma Y, Hiragi S, Fukuda M. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. FEBS J. 2021 Jan;288(1):36-55. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32542850 DOI: 10.1111/febs.15453

4) Homma Y, Kinoshita R, Kuchitsu Y, Wawro PS, Marubashi S, Oguchi ME, Ishida M, Fujita N, Fukuda M. Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells. J Cell Biol. 2019 Jun 3;218(6):2035-2050. Epub 2019 May 9. PMID: 31072826 DOI: 10.1083/jcb.201810134

5) Matsui T, Sakamaki Y, Nakashima S, Fukuda M. Rab39 and its effector UACA regulate basolateral exosome release from polarized epithelial cells. Cell Rep. 2022 May 31;39(9):110875. PMID: 35649370 DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110875

6) Jahn J, Scheller RH. SNAREs–engines for membrane fusion. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Sep;7(9):631-43. Epub 2006 Aug 16. PMID: 16912714　DOI: 10.1038/nrm2002

7) Matsui T, Sakamaki Y, Hiragi S, Fukuda M. VAMP5 and distinct sets of cognate Q-SNAREs mediate exosome release. Cell Struct Funct. 2023 Oct 27;48(2):187-198. Epub 2023 Sep 14. PMID: 37704453 DOI: 10.1247/csf.23067