

[総説]

SNAREへの道

田隈 泰信

北海道医療大学歯学部生化学分野

A passage to SNAREs

Taishin TAKUMA

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Although the “SNARE hypothesis” finally produced 3 Nobel laureates in 2013, the role of SNAREs in constitutive exocytosis, the main secretory route of most cells, has remained obscure. Here I describe a short history of a small biochemical laboratory where the role of SNAREs in this pathway has been the main focus of

investigation. The record looks at SNAREs from two angles : 1) a passage to the visualization of SNAREs and constitutive exocytosis, and 2) a passage to the gene knockout of the SNAP23 that had been seen as the most plausible SNARE for constitutive exocytosis.

はじめに：SNAREとの出会い

開口分泌の膜融合機構として「SNARE仮説」が世に出たのは1993年のことである（図1）(Sollner et al.,

1993). Nature誌に掲載されたRothmanらの“総説”のような論文を読んだ時、私は晴天の霹靂に撃たれ、荒野に延びるロング・アンド・ワインディングロードに一人置き去りになったような気がしたものである。1983年の米

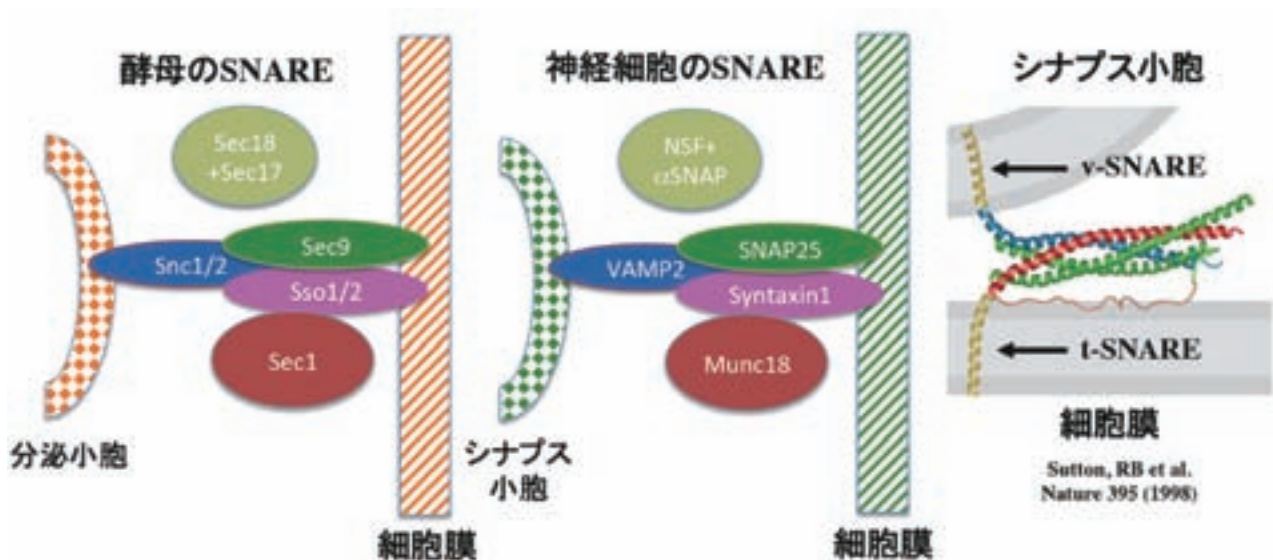


図1 酵母と神経細胞のSNARE. SNARE仮説が提唱されるはるか以前から、酵母の温度感受性変異株で同定された分泌関連遺伝子と相同の遺伝子産物（色と位置を一致させてある）が、神経細胞でも検出されていた。右端は、シナプス小胞のv-SNAREであるVAMP2（青）とシナプス前膜のt-SNAREであるSyntaxin1（赤）、SNAP25（緑）の各SNAREモチーフ同士が、しめ縄のようにコイルドコイル結合を形成しているところ。

国NIH留学以来、私は曲がりなりにも分泌機構を研究しているつもりでいた。にもかかわらず、“総説”に引用されている文献を、自分の研究に関連しているとは、それまで一度も考えたことがなかったからである。Rothmanの「SNARE仮説」では、分泌タンパク質の合成される粗面小胞体から、ゴルジ装置を経て分泌小胞となり、細胞膜と融合して細胞外に放出されるまで、分泌ルートで起こる全ての膜融合反応は、SNAREと呼ばれる1群のタンパク質によってコントロールされている。そして、この膜融合機構は、酵母から哺乳類の脳に至るまで、全ての細胞に共通する一般原理として提示された。

“総説”を読んだ時、“分泌の研究は終わった”と私は思った。残された仕事は、様々な細胞の分泌経路に、約40種類のSNAREを割り振るだけである。あれから丁度20年後の2013年、ついにRothmanを含む3人の分泌学者がノーベル医学・生理学賞を獲得した。「SNARE仮説」は、分泌機構の一般原理として確立したのであるか？

ノーベル賞は出たものの、開口分泌の大部分を占める構成的分泌に関わるSNAREの役割は、いまだほとんど手付かず状態にある。本総説では、SNARE仮説の誕生に続き、構成的分泌におけるSNAREの役割解明に挑んだ、1小研究室の苦闘の軌跡を、可視化への道、ノックアウト (KO) への道、という2つの視点から、記録にとどめたいと思う。

1. SNARE仮説の誕生 調節的, 構成的, 自発的分泌

生体には、ホルモンを分泌する内分泌細胞や消化酵素を分泌する外分泌細胞、抗体を分泌する免疫系細胞など、分泌に特化した細胞が無数に存在する。一見、分泌とは無縁と思われる骨や結合組織に存在する細胞も、コラーゲンやプロテオグリカンなど、細胞外マトリックス成分を盛んに分泌している。奇妙に聞こえるかも知れないが、分泌機構が関わるのは分泌だけではない。細胞膜上に存在するホルモン受容体やイオンチャネルのような膜タンパク質も、合成の場である粗面小胞体から細胞膜への輸送に、分泌メカニズムが利用されている。さらに、分裂・増殖する細胞が小さくならず、本来のサイズを維持するには細胞膜の供給が不可欠であるが、この膜供給にも分泌機構が関与しており、出芽酵母ではこの過程が盛んに研究された (Novick et al., 1981)。このように分泌機構は、あらゆる細胞の増殖と分化に必須の役割を果たしている。

一般に、分泌は“調節的分泌”と“構成的 (非調節的?) 分泌”の2種類に分類される。耳下腺細胞のアミ

ラーゼ分泌のような“調節的分泌”では、分泌されるアミラーゼは前もって合成され、分泌顆粒の中に貯えられている。アミラーゼの分泌量は、分泌刺激の強さに応じて起こる、分泌顆粒膜と細胞膜の膜融合の頻度によって“調節”される。他方、抗体分泌のような“構成的分泌”では、抗体の種類と量の調節は、抗体産生細胞の分化誘導や遺伝子発現などの上流部で終了し、抗体の合成から放出までの過程はノンストップで (構成的に) 進行する。

しかし、全ての分泌はこの範疇にピタリとおさまるものであろうか。ある時、私は気道粘膜上皮細胞のムチン分泌に関する論文を読みながら、奇妙な感覚を覚えた (Adler et al., 2013)。正常な気道粘膜を染色しても、ムチンを含む分泌顆粒はほとんど認められない。気道を潤す必要十分な量のムチンは、ほとんど構成的に分泌されており、分泌されたムチンは水に溶けて気道内に薄く広がる。他方、喫煙や細菌感染により炎症を起こした粘膜を染色すると、ムチンを含む分泌顆粒が細胞質をビッシリと埋め尽くしている。炎症時のムチン分泌は明らかに調節的で、炎症性因子の刺激によって増強される。分泌されるムチンは、量が多過ぎて気道内の水を吸収しても薄く広がることができず、ムチン塊となって気道の違和感をさらに増強する。

気道粘膜のムチン分泌は、炎症時に、構成的分泌から調節的分泌へと転換するのであろうか。実は、構成的に見える正常粘膜の分泌も、プリン受容体にATPが結合することによって起こる調節的分泌に、一応は分類されている。プリン受容体を介した同様のメカニズムは唾液腺導管でも確認されており (Shitara et al., 2009)、かなり広範に分布しているものと想像される。プリン受容体を介したこの種の分泌は、穏やかな安定した環境では、細胞や組織に固有の一定したリズムで起こる“自発的分泌”であり、調節的な意味はほとんどないと思われる。“自発的分泌” = “平穏な分泌”あるいは“幸福な分泌”という奇妙な観念が芽生えたのかもしれない。

ノーベル賞から漏れた研究者

今や分泌機構の主役となったSNARE仮説は、3つの領域の研究成果が合体することで形成された。3領域とは、1) 酵母の細胞内小胞輸送の研究、2) ゴルジ装置における小胞輸送の研究、そして、3) 神経シナプスにおける神経伝達物質の放出機構の研究である。ノーベル賞を受賞したSchekmanは、1979年以降、酵母の温度感受性変異株を利用して細胞内小胞輸送に関わる多数の遺伝子を同定し、機能を明らかにしてきた (Novick et al.,

1981) (Kaiser & Schekman, 1990). SNARE仮説を提唱したRothmanは、1980年、細胞からゴルジ装置を取り出し、無細胞の小胞輸送系を再構築し、1988年に仮説の基礎となったNSFとSNAPを発見した (Rothman, 2014). “SNARE”とは、この“SNAP”の“Receptor”を意味する。受賞者の中で一番若いSüdhofは、神経伝達物質の放出機構を研究する多数の研究者と協力・競合しながら、1990年、シナプス小胞でカルシウム・センサーの役割を果たすシナプトタグミンを発見した (Perin et al., 1990).

ゴルジ装置や神経細胞に、酵母の小胞輸送に関与する遺伝子群と相同性を有するタンパク質が数多く存在することは、SNARE仮説の提唱されるはるか以前から知られていた (図1)。しかし、それらの知見がSNARE仮説を生むことはなかった。3分野の知見が統合されSNARE仮説が生まれるきっかけは何だったのか？SNARE仮説の誕生には、ノーベル賞から漏れた一人の研究者の重要な貢献があった。その論文はSNARE仮説が提唱される前年、Montecuccoというイタリア人研究者によってNature誌に発表された (Schiavo et al., 1992).

Montecuccoは、破傷風毒素やボツリヌス毒素が神経伝達物質の放出を止め、神経麻痺を引き起こすメカニズムを研究していた。活性化された神経毒素は、大小2つのサブユニットからなり、分子量の大きい重鎖は神経細胞に取り付き、分子量の小さい軽鎖を神経細胞に注入する役割をもつ。Montecuccoらは、アミノ酸配列のホモロジー検索から、軽鎖の配列中に、亜鉛を活性中心にもつ

金属プロテアーゼのコンセンサス配列を発見した (図2)。そこで、精製した神経細胞の抽出液に軽鎖を作用させ、何が分解されるかを調べた。その結果、破傷風毒素とボツリヌス毒素Bの軽鎖は、ともにシナプトブレビン (別名VAMP2) だけを、特異的に分解することが明らかとなった。この画期的な研究によって、神経毒素の作用機構が解明されると同時に、シナプス小胞に発現する機能不明のタンパク質、VAMP2の役割が美事に解き明かされたのである (Schiavo et al., 1992).

VAMP2の相同遺伝子は、酵母から哺乳類の脳まで、広範に保存されている。VAMP2以外にも、酵母の小胞輸送に関わる相同遺伝子産物が、ゴルジ装置や神経細胞に数多く存在することは既に述べた。それらが、分泌経路の中で、酵母の小胞輸送と同様の機能を果たすと考えるのはごく自然なことである。酵母の遺伝学的研究を母として、膜融合機構の一般原理が誕生する、まさにその時は満ちた。そして、Rothmanの「SNARE仮説」が、世に出た (図1) (Sollner et al., 1993). 「SNARE仮説」の初版は、現在のものとはかなり異なり、大きな間違いも含まれている。しかし、その慧眼と有無を言わせぬ説得力には敬服せざるを得ない。不勉強の言い訳に過ぎないが、Rothmanの「SNARE仮説」が出るまで、膜融合の一般原理は、凡夫の想像力をはるかに超えていた。

SNAREとは

SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) とは、細胞内の小胞輸送にお

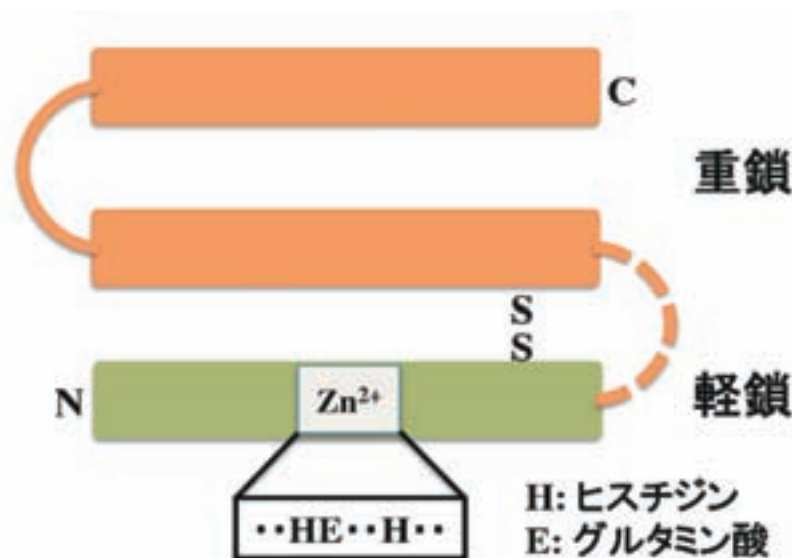


図2 破傷風毒素とボツリヌス毒素に共通する構造。重鎖と軽鎖の間が切断され、SS結合で両者が結合状態にあるとき、神経毒の活性を示す。軽鎖の中央部に金属 (亜鉛) プロテアーゼの短いコンセンサス配列 (---HE---H---) が発見されたことで、メカニズムの解明につながった。

いて、小胞とその輸送先の標的膜を融合させるために働く1群の膜タンパク質をさす (Hong, 2005). 輸送小胞膜のv-SNARE (vesicle-SNARE) と、標的膜のt-SNARE (target-SNARE) には、SNAREモチーフと呼ばれる約70アミノ酸からなる α ヘリックス構造が存在する。適当な組合せのv-SNAREとt-SNAREは、SNAREモチーフ同士、横並びに結合し、しめ縄が巻き付くようにコイルドコイル構造を形成する (図1の右端)。このSNARE複合体が形成されることで、小胞膜と標的膜は、接近・接触し、融合すると考えられている。

生体における分泌ルートは、合成の場から細胞膜の特定領域での放出まで、分泌物によって厳密に決まっており、ルートの逸脱は生死に関わる重大な結果をまねく。他方、細胞には分泌ルートとは逆に、細胞内に物質を取り込み、利用または分解するエンドソーム・リソソーム系の小胞輸送ルートが存在する。ほぼ逆向きの2つの輸送ルートには、現在、かなり広い交差領域があると考えられている。このように複雑に入り組んだ細胞内“物流”において、SNAREには“お届け先”と“配達時刻”を厳密に規定する役割が想定されている (Jahn & Scheller, 2006)。

2. 可視化への道：GFP融合タンパク質

2008年にノーベル化学賞を受賞した下村脩先生が、オワンクラゲから発見した緑色蛍光タンパク質GFP (Green Fluorescence Protein) は、1990年代の半ばからタンパク質を可視化する用途に広く利用されるようになった。緑の蛍光を発するGFP融合タンパク質は、固定や免疫染色をしなくても、生きた細胞内でタンパク質の動態を観察できる、極めて有益な研究ツールである。しかし、我々がSNAREタンパク質の可視化に挑戦した20世紀末、培養細胞に発現ベクターを導入し、SNAREのGFP融合タンパク質を可視化した論文はまだ発表されていなかった。

すべては試行錯誤だった。GFPをSNAREタンパク質のN端に融合するかC端に融合すべきか、という基本的な選択から、SNAREタンパク質の膜への取り込みや複合体の形成にGFPが影響するかどうかなど、検討すべき項目は実験のたびに増加した。「地方の大学で研究をしていて一番困るのは、失敗談を聞けないことだ。成功談はどこにいても聞ける。じきに論文となって出てくるから」。誰の言葉だったろう。研究を効率的に進めるには、試行錯誤の共有が極めて重要という意味である。共焦点レーザー顕微鏡を通して見ているGFP-SNAREが正常な像なのか、それとも強力なプロモーターで強制発現

しているため、異常な事態に陥っているのか、試行錯誤に終わりは見えなかった。荒川俊哉博士は、明海大学歯学部から着任早々、際限なく増え続ける各種のSNARE発現ベクターを次々と作製し、分子生物学的研究を力強く牽引してくれた。

苦勞して書いた論文を読み直すと、実験をしていた当時の、海図も羅針盤もなく海を漂っているような不安な感覚がよみがえるのを覚える (Takuma et al., 2002)。v-SNAREとして分泌小胞に存在すると思われたVAMP2は、大部分ゴルジ領域に発現し、細胞膜がわずかに光る程度で、肝心の細胞質にはGFPに光る小胞はほとんど見られなかった (図3)。t-SNAREとして細胞膜に発現すると予想していたGFP-SNAP23は、核を除く細胞質全体に存在した。薬理学分野の森田貴雄先生からのアドバイスだったと思うが、サポニンを用いて細胞膜に穴をあけ、細胞質のGFP-SNAP23を除いたとき、細胞膜がGFPで光るのを初めて確認することができた。

最も当惑したのは、t-SNAREとして細胞膜に発現すると思われたSyntaxin4が、細胞膜ではなく、未同定の巨大な膜構造に存在したことであった (図3)。その膜構造は、GFPと融合していないSyntaxin4を発現した場合にも観察された。Syntaxin4とGFP-VAMP2を共発現すると、両者は複合体を形成し、巨大な膜構造はGFP-VAMP2の強い蛍光を放った。ただし、Syntaxin4とVAMP2の複合体が形成されるのは、両方とも膜貫通ドメインをもつ場合に限られ、どちらかの膜貫通ドメインを除くと複合体は形成されなかった。

Syntaxin4が細胞膜まで輸送されるのを初めて確認できたのは、Syntaxin4と細胞内で複合体を形成することが知られているMunc18cを共発現したときだった (図3)。Munc18cはSyntaxin4と1:1で結合し、Syntaxin4同士が結合して集合体を形成するのを妨げ、巨大な膜構造が作られるのをブロックしたと思われる。同時に、Munc18cはSyntaxin4とVAMP2が合成過程で早熟な結合をするのを妨げ、それらが細胞膜と分泌小胞まで輸送され、t-SNARE、v-SNAREとして本来の機能を発揮するのを助ける、シャペロンの役割を果たしていると考えられた (図4) (Takuma et al., 2002)。

作製したSNARE発現ベクターの一部は、唾液腺における機能解析のため (Takuma et al., 1997; Takuma et al., 2000; Takuma et al., 2013)、アデノウイルス・ベクターに移し換えられ、マウス顎下腺の腺体に注入された後、発現をチェックする段階まで進んだ。しかし、GFP-SNAREの*in vivo*実験は、諸般の事情で、残念ながら未完成に終わった。

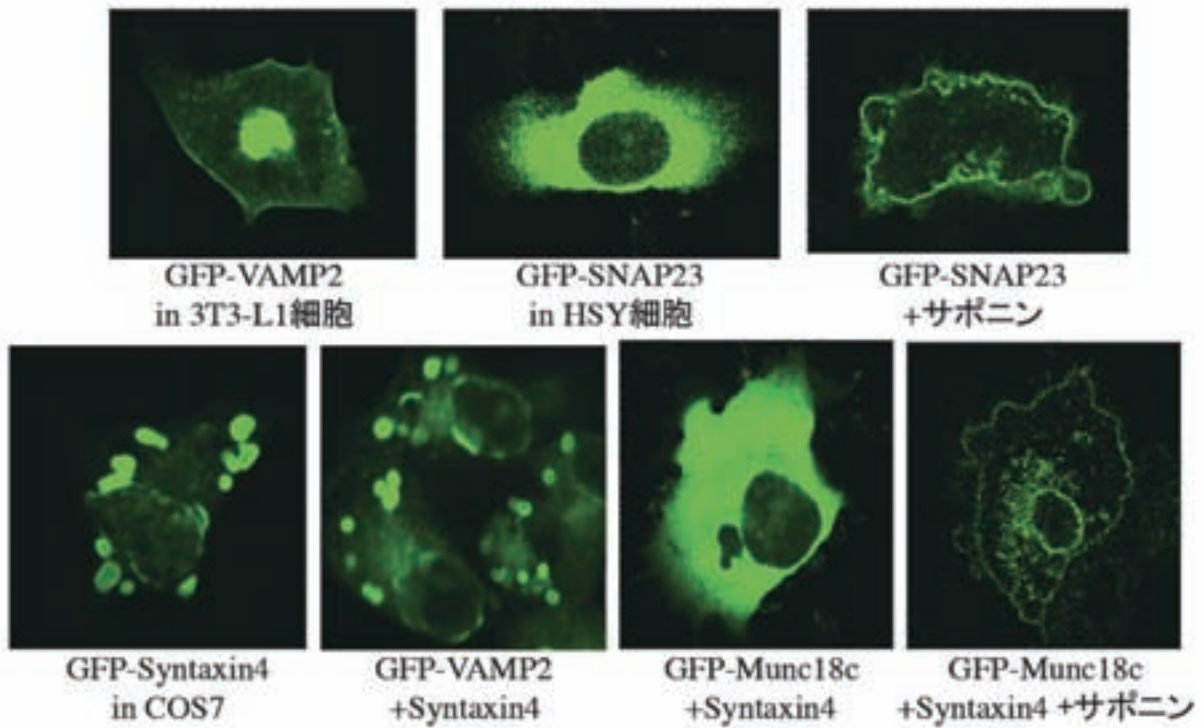


図3 培養細胞に発現させたGFP-SNARE. GFP-VAMP2はゴルジ領域と細胞膜に、GFP-SNAP23は核を除く細胞質全体に、また、GFP-Syntaxin4は未同定の膜構造に発現した。GFP-VAMP2とSyntaxin4を共発現すると、GFP-VAMP2はSyntaxin4と同じ膜構造に移行した（下の左から2番目）。サポニン処理とMunc18cの共発現により、SNAP23とSyntaxin4の細胞膜局在を初めて確認できた。

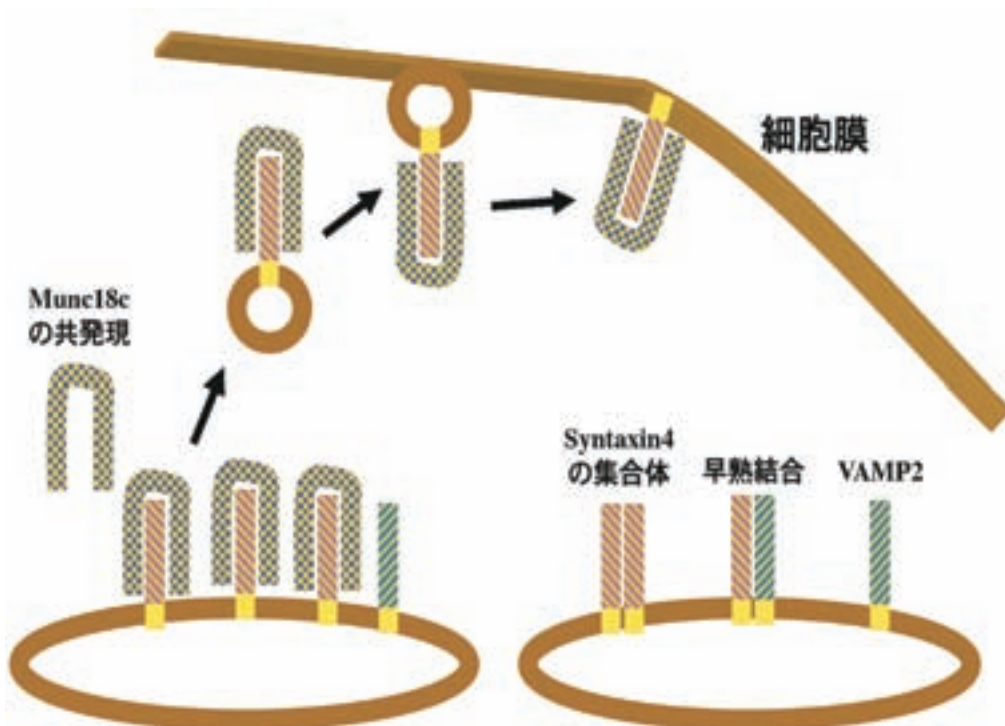


図4 Munc18cのシャペロンとしての役割. Munc18cはSyntaxin4と1:1で結合し、Syntaxin4同士の集合体形成、および、VAMP2との合成途上での早熟な結合を妨げ、Syntaxin4とVAMP2が本来の機能を発揮するのを助けていると考えられる。

分泌の可視化へ

SNAREの可視化が一段落した後、測定の容易な分泌物をもたない培養細胞の構成的分泌を定量するため、私は北里大学医学部の高橋正身教授から、ヒト成長ホルモン (hGH) のプラスミドを分けて頂いた。これをPC12細胞とヒト唾液腺由来のHSY細胞に導入し、培養液に放出されるhGHをELISA法で測定した。予想通り、神経・内分泌細胞のモデル細胞であるPC12細胞では、 Ca^{2+} 依存性の調節的分泌が、HSY細胞では、構成的分泌が確認された (Oishi et al., 2006)。さらに分泌過程を可視化するため、プラスミドからhGHのcDNAを切り出し、GFPと融合してhGH-GFP発現ベクターを作製した。これをPC12細胞とHSY細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で分泌小胞 (分泌顆粒) の動態を観察したが、分泌像そのものを観察することはできなかった (Oishi et al., 2006)。

そこで次に、分泌小胞にどのようなv-SNAREが発現しているかを同定するため、GFPと融合したVAMP2, VAMP7, VAMP8などのv-SNAREと、ヒト成長ホルモンの免疫染色による染め分けに挑戦した。その結果、GFP-VAMP2, およびGFP-VAMP7の一部が、ヒト成長ホルモンを含む分泌小胞の免疫学的局在と一致して観察された (Oishi et al., 2006)。これらの研究には、矯正学分野の大学院生、大石洋平君が参加し、困難な実験に果敢に挑み、辛抱強く実験してくれた。

全反射蛍光顕微鏡による観察

分泌像を一般の共焦点レーザー顕微鏡で観察するのは極めて困難と悟った私は、全反射蛍光 (TIRF: Total In-

ternal Reflection Fluorescence) 顕微鏡の導入を決意した。全反射蛍光顕微鏡は、使い方を工夫すると1分子のイメージングも可能となる、画期的な顕微鏡技術である。原理を図5に示す。光が屈折率の大きい透明物体から屈折率の小さい物質に入射するとき、入射角がある角度以上になると光が全反射することは理科の時間に学習した。全反射というと100%反射するように想像するが、実は極めて微弱な光 (エヴァネッセント光) が境界面からトンネル効果で反対側にもしみ出している。エヴァネッセント光は、距離に比例して指数関数的に減弱するため、蛍光物質を励起しうる範囲は境界面からせいぜい100 nm前後に限られる。このため、細胞全体にGFP融合タンパク質を発現させた場合でも、観察可能な蛍光タンパク質はカバーガラスに接した細胞膜近傍に限られる。TIRFのこのような性質は、分泌小胞と細胞膜の融合過程や分泌物の放出など、開口分泌を観察するのに極めて都合がよい (図5)。TIRFの動画では、開口分泌は暗黒の夜空に広がる花火のように見える。TIRF顕微鏡の導入を決意してから、実際に分泌像を観察するまで1年近くかかったが、この間、機器のセットアップから観察技術まで、薬理学分野の谷村明彦先生には、レーザー顕微鏡に引き続き、数多くの貴重なアドバイスを頂いた。

期待に反し、最初に観察したhGH-GFPの分泌像は、夜空に広がる美しい花火とは似ても似つかぬものであった。hGH-GFPを含む小胞は、まるでハエの幼虫のように、HeLa細胞の辺縁部までクネクネと移動し、そこで突然プツンと消えた (Okayama et al., 2009)。「えっ？これが分泌？嘘だろう？」と疑った程である。図6に示す、花火のようにはじける分泌像も確かに見られた

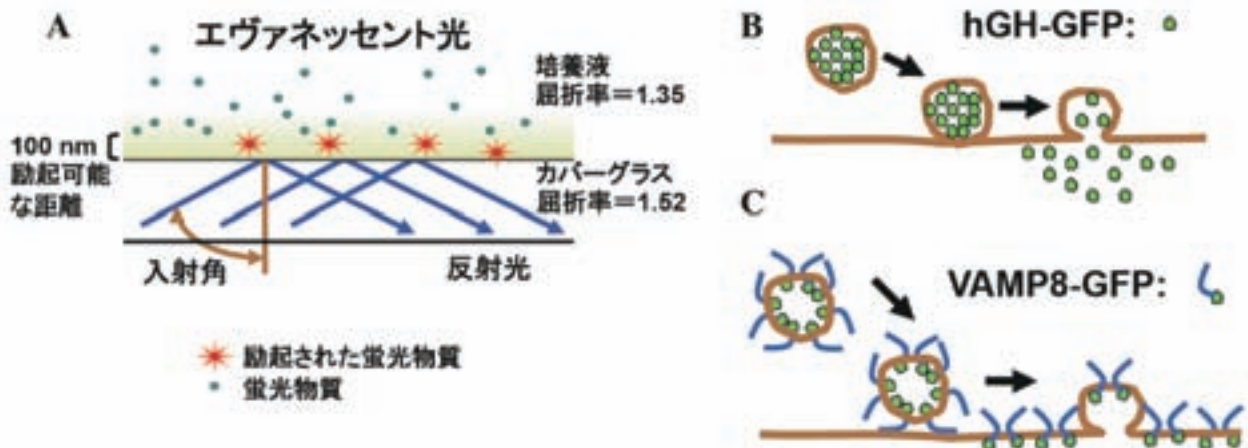


図5 全反射蛍光顕微鏡の原理。(A) カバーガラスの反対側にしみ出す微弱なエヴァネッセント光は、表面からせいぜい100 nm以内にある蛍光物質だけを励起するため、(B) hGH-GFPの放出や (C) VAMP8-GFPの細胞膜への移動を観察するのに極めて都合がよい。

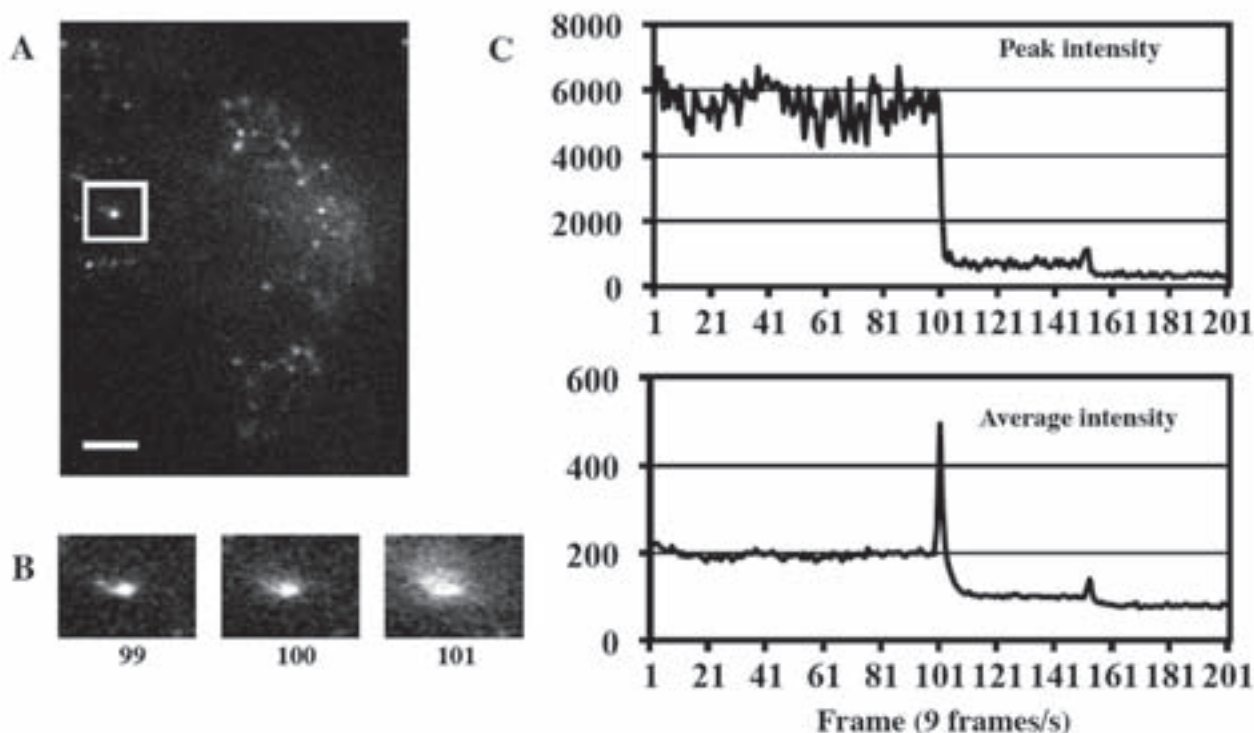


図6 ヒト成長ホルモン (hGH-GFP) のTIRF分泌像. hGH-GFPが暗黒の夜空に花火のように広がる像は滅多に見えず, ハエの幼虫がクネクネと細胞の辺縁部まで移動し, 突然消えるパターンが大部分だった. 雑誌のwebsiteではsupplementデータとして動画を見ることができる.

が, 10回の実験で1回あるかどうかの頻度であった (雑誌のwebsiteでは, いくつかの動画を見ることができます).

VAMP8-GFPの膜融合像にも全く異なる2つのタイプが観察された (Okayama et al., 2009). 1つはバースト型と名付けた一般的なもので, VAMP8-GFPを発現した小胞は細胞膜と完全に融合し, VAMP8のGFP蛍光は細胞膜上に拡散した (図7). もう1つのタイプは“kiss-and-run”という変わった名前をもつ分泌様式と似ていた. VAMP8-GFPを発現したチューブ状の小胞は, 細胞膜と接触するが, 細胞膜と一体化することなく, 内容物を放出した後, 細胞膜から離れ, 細胞内部へと引き返すように見えた. 他のv-SNARE候補についても同様の実験をおこなったが, 膜融合像を観察することはできなかった. 2004年以降, 大石洋平君の後を受け, 矯正学分野の岡山三紀助教が, 持ち前の器用さを発揮し, 辛抱強く実験を続けてくれた.

TIRF顕微鏡は, 現在, 赤い蛍光を発するRFP融合タンパク質と緑色の蛍光を発するGFP融合タンパク質を同時に観察できる2色TIRFシステムへとバージョンアップし, 分泌成分とSNARE, あるいはv-SNAREとt-SNAREなど, 2成分を同時に観察可能な状況にある. hGH-GFPとv-SNAREが二色刷りの花火となって, 大川端の夜

空に美しく広がるのを, いつか見てみたいものである. 構成的分泌の主要なv-SNAREは何か, 複数のVAMPファミリー・メンバーが関わっているとしたらどのような割合か, 今後の研究で解明されることを期待したい.

3. ノックアウト (KO) への道: siRNAとゲノム編集

siRNA

構成的分泌に関わるSNAREの役割を確立するには, 各SNARE遺伝子をノックアウトし, 分泌への影響を確認する以外にない. しかし, 遺伝子ノックアウト・マウスを必要に応じて作製できるのは, つい最近まで, 毎年数千万円の科学研究費を運用できる一握りの研究室に限られていた. 世紀が変わろうとしていたまさにそのとき, 目的とする遺伝子の発現を, 弱小研究室でも手軽に制御できる夢の核酸試薬, siRNAが登場した. なんとよい時代に生まれ合わせたものか, 私は己の幸運を感謝したものである.

siRNAは全長20~25塩基の短い2本鎖RNAで, 3'側に2塩基のオーバーハングをもつ (図8). 1998年, 線虫で遺伝子発現を効果的に阻害することが発見され, その後2001年にヒトの細胞でも有効性が証明された. 発見

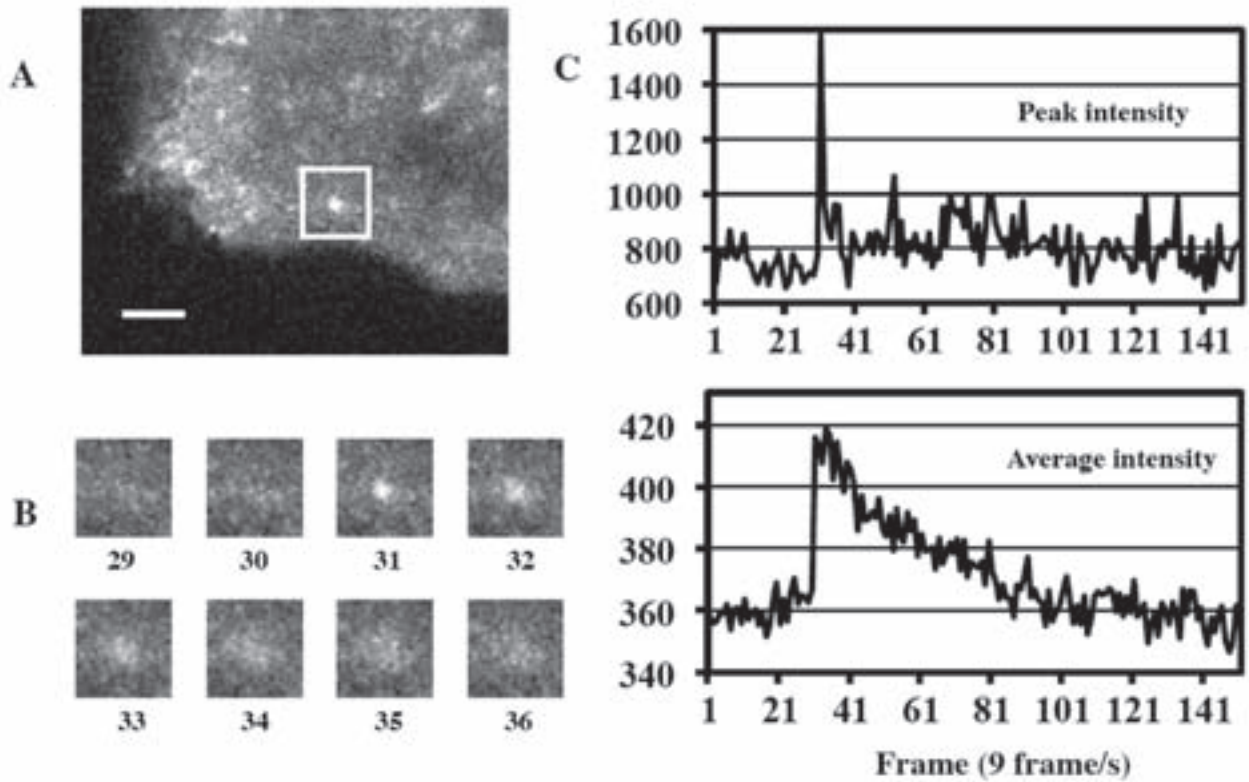


図7 VAMP8-GFPを発現する小胞が細胞膜と融合するTIRF像. ここでは小胞と細胞膜の一体化が見られるが, “kiss-and-run” と呼ばれる一過性の融合像も認められた.

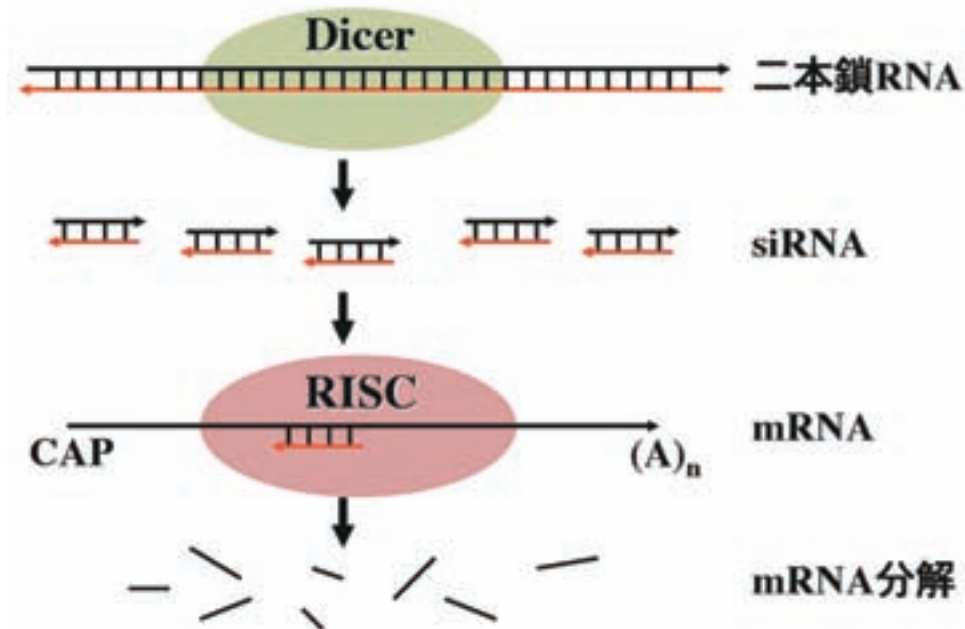


図8 siRNAによるmRNAの分解. siRNAは全長20~25塩基の短い2本鎖RNAで, 3'側に2塩基の出っ張りをもつ. Dicerと呼ばれる酵素により, 細胞内で2本鎖RNAが加水分解されることで生成する. 作られたsiRNA, および細胞外から導入されたsiRNAは, RISCと呼ばれる酵素複合体により1本鎖となり, 標的のmRNAと結合してこれを分解する.

者であるFireとMelloは, 2006年にノーベル医学・生理学賞を受賞している. ウイルス感染等に対する防御システムとして, また, miRNAのように, 発生段階の遺伝子

発現を制御するシステムとして進化したと考えられている. 細胞内で二本鎖RNAを分解し, siRNAまたはmiRNAを作り出す酵素はDicer, 作られたsiRNAまたは

miRNAを1本鎖にし、これと協働して標的となるmRNAを分解する酵素複合体はRISCと呼ばれる(図8)。siRNAは標的mRNAを分解し、タンパク合成を最大で90%程度まで阻害するが、この阻害は数日で回復するためノックダウン(KD)と呼ばれ、遺伝子の塩基配列を変異させ、発現を100%止めるノックアウト(KO)とは、ボクシング用語で分かりやすく区別されている。我々は、当初siRNAの発現ベクターを導入し、SNARE遺伝子の発現抑制を試みたが、明らかな阻害効果を確認するには到らなかった。その後、siRNAを設計・供給する試薬メーカーが多数現れ、siRNA技術は急速に普及した。2005年以降、我々はsiRNAの発現ベクターをやめ、SNAP23はじめSyntaxin類、VAMP類のsiRNAを多数設計・購入し、ノックダウン効率の高いsiRNAを選択・導入する方針を取った。

SNAP23のノックダウン

神経細胞や内分泌細胞に限定的に発現するSNAP25とは対照的に、SNAP23は、ほとんど全ての細胞に発現するため、SNAP25の普遍型相同体(ユビキタス・ホモロ

グ)と考えられている。神経細胞におけるSNAP25の重要性は、ノックアウト・マウスの研究で確立しており(Washbourne et al., 2002)、一般細胞ではSNAP23がSNAP25の役割を担うものと想像されていた。一方、SNAP25の遺伝子ファミリーには、他にSNAP29とSNAP47(Holt et al., 2006)が知られていたものの、構造的な類縁性は低く、SNAP23をノックダウンしたとき、他のSNAPが代わりを務める可能性は極めて低いと想像された。以上の理由で、私は、ノックダウン実験の最初の標的として、SNAP23が最も確実性が高いと判断した。おそらくSNAP23は細胞の生存に必須であり、ノックダウンのレベルが高過ぎると細胞は死滅するとさえ予想していた。

ところが予想は美事に外れ、SNAP23の発現をタンパク質レベルで90%抑制したにもかかわらず、HeLa細胞の増殖には何の影響もなく、構成的分泌も全く低下しなかった(図9)(Okayama et al., 2007)。念のため、HeLa細胞にSNAP25が発現しているかどうか確認したが、発現はなく、また、SNAP29の代償的な増加も認められなかった。おまけに、SNAP23と同時にSyntaxin4をダブ

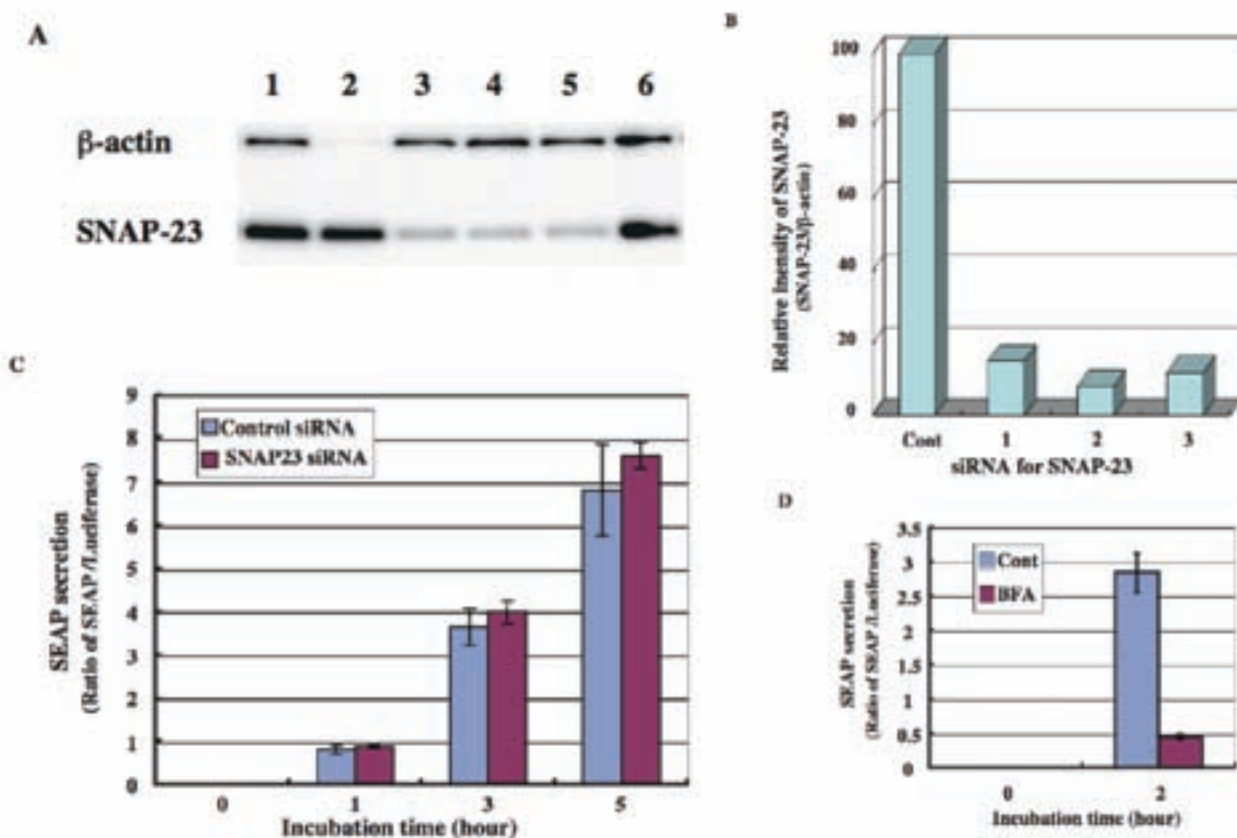


図9 SNAP23のノックダウン実験。(A) SNAP23にたいする3種類のsiRNA(3, 4, 5レーン)と β アクチンに対するsiRNA(2レーン: ポジティブ・コントロール)によるノックダウンとその定量 (B)。SNAP23の発現はほぼ90%抑制されたが、ヒト胎盤の分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)の構成的分泌は正常であった (C)。他方、分泌阻害剤のプレフェルディンA(BFA)は、SEAP分泌を強く阻害した (D)。

ル・ノックダウンしても、構成的分泌に異常は認められなかった(図10)(Okayama et al., 2007).

C端の8アミノ酸を欠いたSNAP23を脂肪細胞に過剰発現すると、もともと存在する正常なSNAP23の働きが妨げられ、インスリン刺激によるGLUT4(ブドウ糖輸送体)の細胞膜へのリクルートが阻害される(Kawanishi et al., 2000). このドミナント・ネガティブ効果が、構成的分泌でも確認できるかどうか、8アミノ酸を欠いたSNAP23の発現ベクターをHeLa細胞に導入し、過剰発現の影響を調べた。しかし、SNAP23とSyntaxin4のSNARE複合体形成ではドミナント・ネガティブ効果が確認されたものの、構成的分泌は全く正常であった(Okayama et al., 2007). 以上の結果から、我々は、構成的分泌にSNAP23が必須ではないという結論に到達した。

この結論は、我々のその後の研究で繰り返し確認された(Okayama et al., 2009; Okayama et al., 2012). ノックダウンの標的として、私はSNAP23が最も確実性が高いと考えたが、案の定、VAMPファミリーやSyntaxinファミリーでも、構成的分泌に必須のSNAREは、これまでのところ確認されていない(Gordon et al., 2010). また、全遺伝子を対象とした大規模・網羅的研究においても、主要なSNAREのノックダウンは、構成的分泌に深刻な影響を与えなかった(Bard et al., 2006). それでは、構成的分泌にSNAREは必要ないのであろうか。

siRNAによるノックダウンでは、少なくとも標的タン

パク質の10%程度は残存する。正常細胞内にSNAREが過剰に存在することを想定し、ノックダウン後に残る10%程度のSNAREでも、構成的分泌やエンドサイトーシスが十分にまかなえるとする議論が行われた(Bethani et al., 2009). しかし、我々の実験では、膜融合過程で形成されるトランス型SNARE複合体の量も、各SNAREのノックダウンと平行して、著しく減少することから、SNAREが過剰に存在するという見方は否定された(図11)(Okayama et al., 2012). しかし、構成的分泌におけるSNAREの役割について、遺伝子発現を完全には抑制できないノックダウン実験の結果から、最終的な結論を導くことには無理があった。

ノックアウト・マウス

2011年、SNAP23の遺伝子KOマウスの作製が試みられた(Suh et al., 2011). しかし、SNAP23KOマウスは、胎生3.5日目の桑実胚という極めて早い時点で死滅することが明らかとなり、KOマウスは得られなかった。胎生致死をうけて、コンディショナルKOマウスの作製も試みられたが、成功しなかった。これらの研究から、SNAP23が初期発生に極めて重要な役割を果たしていることは明らかとなったが、胎生致死の原因は不明のまま残された。発生停止の原因として、1) SNAP23がKOされた結果、細胞の分裂・増殖に必須の構成的分泌がストップしたため、2) SNAP23は発生初期の細胞分化に必須であり、次の発生ステージに進めなかったため、と

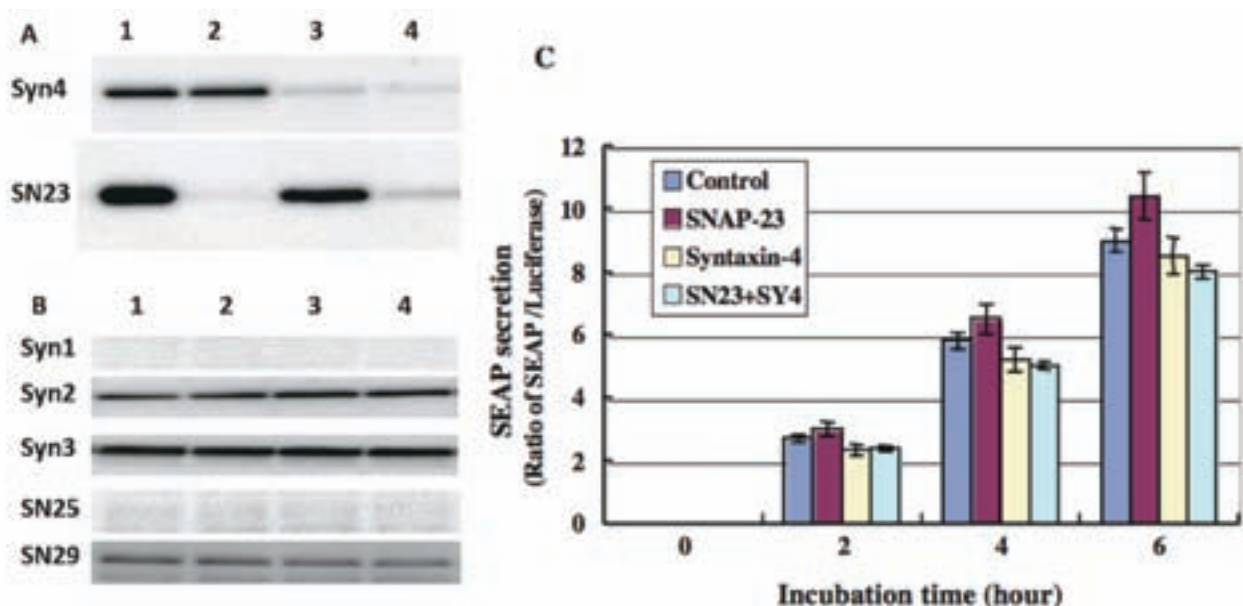


図10 Syntaxin4とSNAP23のダブル・ノックダウン。(A, B) 1, コントロールのスクランブルsiRNA, 2, SNAP23のsiRNA, 3, Syntaxin4のsiRNA, 4, SNAP23とSyntaxin4のsiRNAのミックスによる発現抑制効果。HeLa細胞にはSyntaxin1とSNAP25の発現はなく、他のSyntaxinやSNAP類が代償的に増加することもなかった。(C) Syntaxin4とSNAP23のダブル・ノックダウンはSEAPの構成的分泌に影響しなかった。

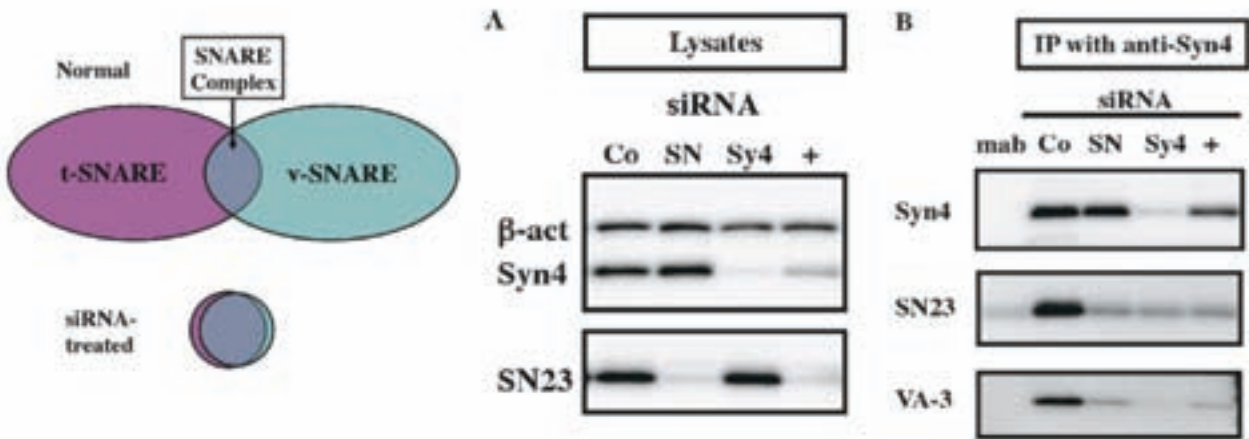


図11 SNAREは過剰に存在するか？SNAREが過剰に存在する場合，siRNAによってノックダウンしても，形成されるSNARE複合体の量は減少しないはずである（左図）．しかし，Syntaxin4とSNAP23をノックダウンすると，細胞内に残存するSNARE量（A）とSNARE複合体の量（B）は，平行して減少し，過剰量存在する可能性は否定された．Co，コントロールsiRNA；SN，SNAP23；Sy4，Syntaxin4；+，SNAP23とSyntaxin4のsiRNAのミックス；mab，コントロール・マウス抗体； β -act， β アクチン．

いう2つ可能性が考えられた．しかし，SNAP23はSNAREであり，前者の可能性が圧倒的に高いことは，誰もが予想していた．

ゲノム編集

日本生化学会で「ゲノム編集」が取り上げられたのは，企業のランチョンセミナーを除くと，2014年に企画された「次世代ゲノム編集技術の展望」というフォーラムが最初である．演題登録の期限を過ぎ，Late breaking abstractという形にはなったが，我々が生化学会で初め

てTALENによるSNAP23のゲノム編集について発表した2013年秋，ゲノム編集に関わる発表は，他に1演題もなかった．

2013年の早春，Nature誌にTALENを使った遺伝子ノックアウトの論文（Kim et al., 2013）を見つけたとき，“ついにその時が来た”と私は直感した．SNAP23がKOできる．私はこの論文を2013年6月，「ねらった遺伝子をKOする人工ヌクレアーゼTALENの有望なタレント」と題して，本誌の最近のトピックス欄に紹介した．

TALENの構造と働きを図12に示す．2匹の芋虫のよ

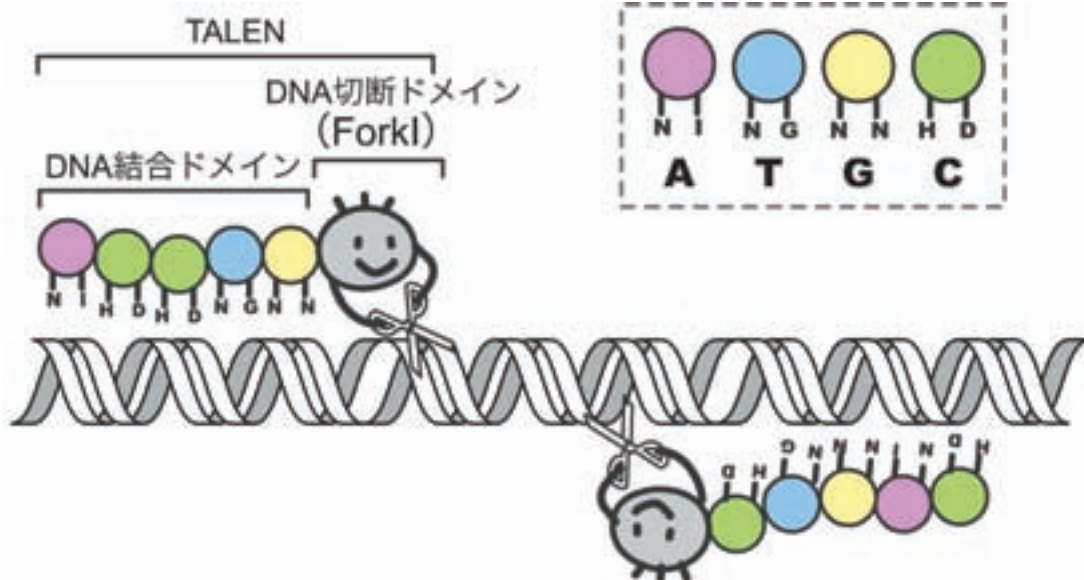


図12 TALENによるゲノム編集．TALENはDNA結合ドメインと制限酵素ForkIがキメラ融合したタンパク質である．2本のTALENが，標的配列をはさんで向かい合うように，ワンセット2組の発現ベクターを複製し，細胞に導入する．

うなTALENタンパク質が、標的配列をはさんで向かい合うように、ワンセット2本のTALEN発現ベクターを設計する。TALENは、芋虫の体節に似たDNA結合ドメインで塩基配列を認識し、標的遺伝子に結合すると、頭部にキメラ融合された制限酵素Fork1のハサミを使ってDNAを切断する。切断されたDNAは、あわてて修復に努めるが、鋳型が存在しないため正しい修復はほぼ不可能であり、欠失や誤った配列の挿入により高い確率でフレーム・シフト変異を起こす。

しかし、実験は、またしても“パイオニア研究”の困難に直面した。困難の第1は、近隣の某国から順調に供給されるはずのTALENベクターの入荷に半年以上もかかり、実験の予定が立たなかったことである。歴史問題がサイエンスの世界にも影響するのだろうかと心配になったこともある。

第2の困難は、純粋にサイエンス上の問題で、遺伝子ノックアウト細胞が取れなかったことである。SNAP23遺伝子から2カ所の標的配列を選び、2セット4本のTALENベクターを設計した。それらをHeLa細胞に導入し、変異の入った細胞を濃縮・選択後、細胞をクローニングする。得られた細胞の標的配列を大腸菌に移し、シークエンスして変異を調べる。上記の実験には膨大な労力を要するが、その重荷は1人、荒川准教授の肩に掛かった。

遺伝子KO実験では、2本の相同染色体上にある同一遺伝子を同時に切断し、両方にフレーム・シフト変異を起こさせる必要がある。片方の染色体の遺伝子が切断されずに残れば、表現型はほぼ正常となる。また、DNAが切断され、欠失が起こったとしても、3塩基または3の倍数の塩基が欠失した場合（イン・フレーム変異）、合成されるタンパク質は、1ないし数アミノ酸が欠失するだけで、ほぼ正常に機能する可能性がある。さらに、HeLa細胞は1951年に樹立され、60年以上も培養されてきた癌細胞であり、染色体数は2組とは限らず、染色体の種類によっては、2nを大幅に超えることも考慮しなければならない。

我々は、SNAP23遺伝子の完全KO細胞が得られない原因について、ポジティブな（都合のいい）解釈を取った。すなわち、遺伝子KOマウスの結果から見て、SNAP23は細胞の生存と増殖に必須であり、そのため完全なKO細胞は死滅し、不完全な変異細胞だけが生き残ったと解釈したのである。しかし、この解釈の当否を検証するには、Cre/loxPシステムによるコンディショナルKO細胞を作成する必要がある。

CRISPR/Cas9

そのころ、入荷がいつになるか先の読めない外部依存のTALEN実験を中止し、研究室で作製可能なCRISPR/Cas9ベクターに乗り換える検討を始めた。CRISPR/Cas9は、細菌に感染するバクテリオファージやプラスミドに対し、細菌側がもつ獲得免疫系のような高度な防衛システムである。細菌は、侵入してきたウイルスを断片化し、その配列をCRISPRのRNA配列中に“ガイド配列”として記憶する。次に同じウイルスが侵入すると、記憶している“ガイド配列”を使ってCRISPRがウイルスに結合し、CRISPRと行動をともにするDNA分解酵素複合体Cas（CRISPR associated）が、これを分解・退治するという仕組みである。これを高等生物のゲノム編集に最適化したものが、CRISPR/Cas9である。生物界には、強力な“矛”のあるところ、それを防御する賢明な“盾”が“必ず”存在し、勝負が一方向的にならないように、見えざる手によってバランスが保たれている、という説がある。出典は不明だが、この哲学的洞察の正しさは、ここでもまた証明されたようである。

2014年12月、CRISPR/Cas9についてネット検索していた私の視線が、“ハプロイド培養細胞（HAP1細胞）の遺伝子ノックアウト”というフレーズの上に、ピタリと止まった。

HAP1細胞

HAP1細胞は、ヒトの骨髄性白血病細胞に由来し、生殖細胞のように、大部分の染色体を1セットしか持たない、ほぼハプロイドの培養細胞である（図13）。HAP1細胞を用いることによって、染色体が何本あるか分からず、不完全なKO細胞しか取れないという、HeLa細胞で味わった、強いフラストレーションから解放される。さらに有り難いことに、当時ウイーンに本社を置いていたHaplogen（現Horizon）社は、遺伝子を選び注文すると、ノックアウトされたクローン細胞を送り届けてくれる。その天国のようなサービス内容を知ったとき、私はとても信じられなかった。注文直後に起こった企業の買収騒ぎで、一時は地獄に落ちるか心配したが、予定より1か月遅れの2015年3月、細胞は届いた。CRISPR/Cas9法によって、SNAP23遺伝子にフレーム・シフト変異をもつ細胞が2株クローン化され、そのうちの1クローンが届いたのである（我々がオーダーし、作製されたこれらの細胞は、既に市販されている）。念のためシークエンスしたところ、標的配列中の2塩基が欠失しており、間違いなくフレーム・シフト変異が起こってい



(Horizon Genomics)

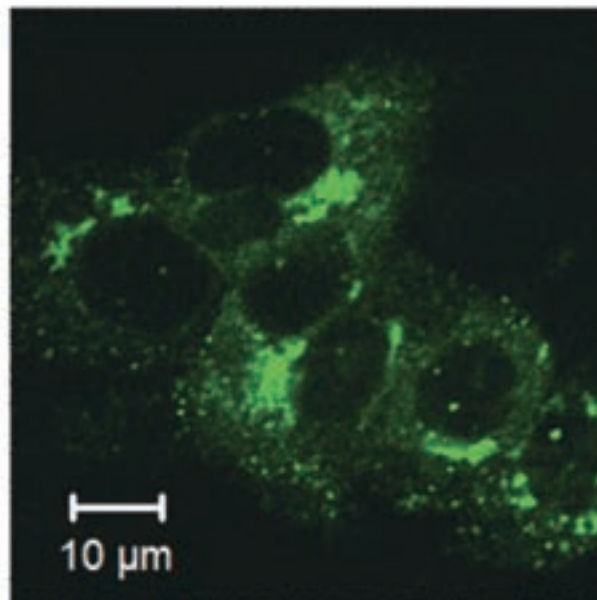


図13 HAP1細胞と染色体. いくつかの染色体に転座等が見られるが、ほぼ1倍体であり、標的遺伝子をノックアウトするには、1箇所フレーム・シフト変異を入れるだけでよい. 右図は、CRISPR/Cas 9を用いSNAP23遺伝子をノックアウトしたHAP1細胞に、hGH-GFPを発現させたもの. 細胞増殖と構成的分泌に異常は見られなかったが、発生・分化に関わる可能性のある遺伝子に発現低下が認められた.

た. SNAP23KO細胞は、正常HAP1細胞と比べ、増殖速度はやや低下するものの正常に分裂増殖し、CLucとhGH-GFPの構成的分泌には全く差が認められなかった(図13). これはどんでん返しであろうか. ノックアウト・マウスの実験結果に基づく大方の予想に反し、SNAP23は、細胞増殖と構成的分泌に必須ではなかった. 我々がノックダウン実験から導き出した結論は、正しかったのである.

正常細胞とKO細胞の遺伝子発現を、DNAマイクロアレイにより比較したところ、SNAP23以外のSNARE遺伝子の発現には全く異常が見られなかったものの、発生と分化に関わる可能性のある多数の遺伝子に著しい発現低下が認められた(投稿準備中). 全エクソンの塩基配列を網羅的に調べる、エクソーム解析のデータからは、CRISPR/Cas9が標的以外の遺伝子を攻撃する、オフターゲットの兆候は認められなかった. SNARE遺伝子であるSNAP23のKOが、どうして発生や分化に関わる遺伝子の発現に影響を及ぼすのか. これまでに蓄積された膨大な研究データに基づくパスウェイ解析では、全く説明がつかない.

大変興味深い問題が提起されたところで、私の持ち時間は尽きた.

終わりに：SNAREに囚われて

SNAREへの道は、敬愛するデビッド・リー監督の最後の映画「インドへの道」のパクリである. 私にとっ

てSNAREは、いまだに謎めいて捉え難い、偉大な存在である. SNAREとの衝撃的な出会いから20余年、何とか一歩でもそこに近づきたいと、細々とした歩みを続けてきた. 分岐点は随所にあり、全く別のテーマに移る機会さえあったと思う.

あるとき私はSNAREという単語を辞書で調べてみた. 驚いたことに、SNAREは単に頭文字をくっつけて発音しやすく並べたものではなく、意味をもつ単語であった. SNAREは、ワイヤーで作られた輪形のワナを意味した. 実物を見たこともないのに、私は、子供の頃から、この恐ろしいワナの存在を知っていた. 野ウサギは、いつもの通り道に仕掛けられた針金の輪を見つけると、どうしてもその輪をくぐり抜けてみたくなり、魅せられたように、ピョンと飛び込んでしまうというのだ. 子供の私にはとても信じられない話だったが、ピーターラビットの著者が描いたとしか思えない、美事なSNAREのスケッチ画を見たとき、私はゾッとした. あの時、私は荒野の道で、SNAREに囚われていたようだ.

謝 辞

二度目の総説執筆を快く許可して下さった石井久淑編集長に感謝申し上げます. 総説の中にお名前を記させて頂いた諸先生には、研究を進める上で大変お世話になりました. 心から感謝申し上げます. また、研究についてディスカッションし、アドバイスを頂いた唾液腺ゼミの

諸先生，中でもこれまで長い間お付き合い下さった倉橋昌司先生，東城庸介先生，谷村明彦先生，石井久淑先生，小原伸子先生，根津顕弘先生，森田貴雄先生のご親切に深く感謝申し上げます。さらに，小生の頼りない研究活動を温かく支えて下さった歯科矯正学分野の溝口到教授と臨床口腔病理学分野の安彦善裕教授には感謝の言葉もありません。本当にお世話になりました。最後に，長い間辛抱強く実験をサポートしてくれた生化学分野の荒川俊哉准教授，歯科矯正学分野の岡山三紀助教に心から感謝申し上げます。尚，ゲノム編集以降の研究費の一部は，2014～2015年度北海道医療大学個性差健康科学研究所の補助金によって賄われたことを付記し，ここに感謝の意を表します。

文 献

- Adler KB, Tuvim MJ & Dickey BF. Regulated mucin secretion from airway epithelial cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4 : 1–9, 2013.
- Bard F, Casano L, Mallabiarrena A, Wallace E, Saito K, Kitayama H, Guizzunti G, Hu Y, Wendler F, Dasgupta R, Perrimon N & Malhotra V. Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization. *Nature* 439 : 604–607, 2006.
- Bethani I, Werner A, Kadian C, Geumann U, Jahn R & Rizzoli SO. Endosomal fusion upon SNARE knockdown is maintained by residual SNARE activity and enhanced docking. *Traffic* 10 : 1543–1559, 2009.
- Gordon DE, Bond LM, Sahlender DA & Peden AA. A targeted siRNA screen to identify SNAREs required for constitutive secretion in mammalian cells. *Traffic* 11 : 1191–1204, 2010.
- Holt M, Varoqueaux F, Wiederhold K, Takamori S, Urlaub H, Fasshauer D & Jahn R. Identification of SNAP–47, a novel Qbc–SNARE with ubiquitous expression. *J. Biol. Chem.* 281 : 17076–17083, 2006.
- Hong W. Snares and traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1744 : 120–144 2005.
- Jahn R & Scheller RH. SNAREs—Engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 : 631–643, 2006.
- Kaiser CA & Schekman R. Distinct sets of sec genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61 : 723–733, 1990.
- Kawanishi M, Tamori Y, Okazawa H, Araki S, Shinoda H & Kasuga M. Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3–L1 adipocytes. Mediation of complex formation between Syntaxin4 and VAMP2. *J. Biol. Chem.* 275 : 8240–8247, 2000.
- Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, Kim S, Lee C, Jeong E, Chung E, Kim D, Lee MS, Go EM, Song HJ, Kim H, Cho N, Bang D, Kim S & Kim JS. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat. Biotechnol.* 31 : 251–258, 2013.
- Novick P, Ferro S & Schekman R. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25 : 461–469, 1981.
- Oishi Y, Arakawa T, Tanimura A, Itakura M, Takahashi M, Tajima Y, Mizoguchi I & Takuma T. Role of VAMP–2, VAMP–7, and VAMP–8 in constitutive exocytosis from hsy cells. *Histochem. Cell Biol.* 125 : 273–281, 2006.
- Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I, Tajima Y & Takuma T. SNAP–23 is not essential for constitutive exocytosis in HeLa cells. *FEBS Lett.* 581 : 4583–4588, 2007.
- Okayama M, Arakawa T, Tanimura A, Mizoguchi I, Tajima Y & Takuma T. Role of VAMP8/endobrevin in constitutive exocytotic pathway in HeLa cells. *Cell Struct. Funct.* 34 : 115–125, 2009.
- Okayama M, Shitara A, Arakawa T, Tajima Y, Mizoguchi I & Takuma T. SNARE proteins are not excessive for the formation of post–Golgi SNARE complexes in HeLa cells. *Mol. Cell Biochem.* 366 : 159–168, 2012.
- Perin MS, Fried VA, Mignery GA, Jahn R & Sudhof TC. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345 : 260–263, 1990.
- Rothman JE. The principle of membrane fusion in the cell (nobel lecture). *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 53 : 12676–12694, 2014.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR & Montecucco C. Tetanus and botulinum–b neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359 : 832–835, 1992.
- Shitara A, Tanimura A, Sato A & Tojyo Y. Spontaneous oscillations in intracellular Ca²⁺ concentration via purinergic receptors elicit transient cell swelling in rat parotid ducts. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297 : G1198–1205, 2009.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument–Bromage H, Geromanos S, Tempst P & Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion.

Nature 362 : 318–324, 1993.

Suh YH, Yoshimoto–Furusawa A, Weih KA, Tessarollo L, Roche KW, Mackem S & Roche PA. Deletion of SNAP–23 results in pre–implantation embryonic lethality in mice. PLoS One 6 : e18444, 2011.

Takuma T, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I, Tanimura A & Tajima Y. Trafficking of green fluorescent protein–tagged SNARE proteins in HSY cells. J. Biochem. 132 : 729–735, 2002.

Takuma T, Arakawa T & Tajima Y. Interaction of SNARE proteins in rat parotid acinar cells. Arch. Oral Biol. 45 : 369–375, 2000.

Takuma T, Shitara A, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I & Tajima Y. Isoproterenol stimulates transient SNAP23–VAMP2 interaction in rat parotid glands. FEBS Lett. 587 : 583–589, 2013.

Takuma T, Tagaya M & Ichida T. Evidence for the putative docking/fusion complex of exocytosis in parotid acinar cells. FEBS lett. 404 : 34–36, 1997.

Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, Lopez–Bendito G, Molnar Z, Becher MW, Valenzuela CF, Partridge LD & Wilson MC. Genetic ablation of the t–SNARE SNAP–25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. Nat. Neurosci. 5 : 19–26, 2002.



田隈 泰信

昭和49年 3月 北海道大学理学部生物学科 卒業

昭和49年 4月 城西歯科大学口腔解剖学第1講座 (久米川正好教授) 助手

昭和55年12月 北海道大学 理学博士

昭和56年 4月 東日本学園大学歯学部口腔生化学講座 (市田篤郎教授) 講師

昭和58年 3月 米国NIH (Dr. Bruce Baum) 留学 (昭和59年 9月まで)

平成10年 6月 北海道医療大医学歯学部生化学分野 教授