

**【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

