

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462822

研究課題名(和文)人工ヌクレアーゼを用いた歯根膜細胞の細胞外マトリックス分泌機構の解明

研究課題名(英文) Application of artificial endonucleases to the exocytotic mechanism of extracellular matrix proteins from periodontal ligament cells.

研究代表者

田隈 泰信 (Takuma, Taishin)

北海道医療大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：40095336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集は、最新の遺伝子改変技術である。本研究では、第2世代のゲノム編集技術TALENと第3世代のCRISPR/Cas9を用い、歯根膜細胞の細胞外マトリックス分泌など、構成的な分泌機構の解明を目的とした。その前段階として、染色体を1セット(n)しかもたないHAP1細胞をモデル細胞として用い、構成的な分泌で重要な役割を果たすと予想されるSNAREファミリーの一員、SNAP23を選び、CRISPR/Cas9法で遺伝子KOを行った。その結果、SNAP23 KO細胞の増殖と構成的分泌に大きな異常が認められず、SNAP23はこれらの細胞過程に必須ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In previous studies, constitutive exocytosis was normal in HeLa cells, whose SNAP23 was knocked down by up to 90% with its specific siRNAs, although SNAP23 null mice resulted in embryonic lethality at E3.5 before uterine implantation. To evaluate the role of SNAP23 in cell proliferation and constitutive exocytosis, we knocked out the gene by the application of CRISPR/Cas9 technology to HAP1 cells, a near haploid human cell line. The SNAP23-/- HAP1 cells had a 2-base pair-deletion in the SNAP23 gene; no SNAP23 protein was detectable by western blotting. The initial growth rate of the KO cell line was decreased by 40%, although the constitutive exocytosis of CLuc, a secreted luciferase of Cypridina noctiluca, and GFP-tagged human growth hormone was normal. The DNA microarray analysis showed that SNAP23 KO markedly influenced the expression of many genes. These results demonstrate that SNAP23 is not essential for cell proliferation or constitutive exocytosis.

研究分野：口腔生化学

キーワード：ゲノム編集 SNARE 構成的分泌 CRISPR/Cas9 SNAP23 歯根膜細胞 HAP1細胞 TALEN

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経細胞や内分泌細胞などの「調節的分泌」では、シナプス(分泌)小胞膜と細胞膜の融合に3種類のSNAREタンパク質(VAMP2, Syntaxin1, SNAP25)とCa²⁺センサーのSynaptotagminとMunc18等が調節タンパク質として必須の役割を果たしていることは、遺伝子KOマウスの解析結果などから既に確立している(2013年ノーベル医学生理学賞)。しかし、線維芽細胞や骨芽細胞などによる細胞外マトリックス成分の分泌は非調節性の「構成的分泌」であり、分泌過程に関与するSNAREタンパク質は、いまだに同定されていない。我々はこれまで、siRNAを用いてSNAREタンパク質をノックダウンし、構成的分泌への影響を解析してきた。しかし、主要なSNAREタンパク質の遺伝子発現をタンパク質レベルで約90%抑制しても構成的分泌への影響は全く認められなかった(FEBS Lett. 2007; Cell Struct Funct. 2009; Mol Cell Biochem. 2012)。他方、最近、非神経細胞におけるSNAP25のホモログであるSNAP23の遺伝子KOマウスが、発生の極めて初期(胎生3.5日目)に死滅することが報告された(PLoS ONE, 2011)。遺伝子KOマウスから細胞が得られないため、分泌機構の破綻が発生停止の原因かどうかの解析は行われていない。

(2) 最近、「ゲノム編集」と呼ばれる人工ヌクレアーゼを用いる遺伝子改変技術が開発され、比較的容易に、これまで困難とされていたマウス以外の動物や培養細胞での遺伝子KOが可能となった。本研究では、当初、第2世代のゲノム編集技術であるTALEN(Transcription Activator Like Effector Nuclease)法を用いて、歯根膜細胞のSNARE遺伝子をKOし、細胞外マトリックス成分の分泌に対する影響を解析する計画を立案した。当時、我々は、既にTALENを用いHeLa細胞の遺伝子KOに挑戦し、予備的な結果を得ていた(日本生化学会学術大会、2013)。

(3) TALENベクターの作製は煩雑なため、海外の企業に外部委託していたが、作製に数ヶ月の時間を要し、しかもある時期から入荷が極めて不安定となった。そこで、TALENの使用を中止し、より簡便で自前の作成が可能な第3世代のゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9法を採用することにした。また、HeLa細胞は60年以上にわたって継代培養されてきた癌細胞であり、染色体によっては数が正常の2本を大幅に超えている可能性がある。その結果、TALENを用いた実験では標的遺伝子の完全KO細胞のクローニングが成功しなかった。この経験をふまえ、遺伝子改変を行うモデル細胞として、ヒト骨髄性白血病由来の培養細胞で、生殖細胞のように大部分の染色体を1セット(n)しかもたないほぼハプロイドのHAP1細胞を用いることとした。以上2点の変更後SNAP23遺伝子のKOに挑戦

したところ、2塩基を欠失したフレームシフト変異をもつSNAP23KO HAP1細胞を得ることができた。この研究論文は、現在投稿中である。

2. 研究の目的

(1) 歯と歯槽骨の間に存在する歯根膜は、日常の咀嚼や健全な歯の保持、また歯科矯正時の歯の移動に極めて重要な役割を果たしている。歯根膜細胞は、多様な細胞外マトリックス成分を構成的に分泌しているが、この分泌過程にどのようなSNAREが関与しているかは全く不明である。関与するSNAREを明らかにするため、本研究では、最近進歩が著しいゲノム編集技術を用い、歯根膜細胞のSNARE遺伝子を順次KOし、その機能解析を行うことを計画した。

(2) 歯根膜細胞の分泌機構を研究する前段階として、第2、第3世代のゲノム編集技術の効果を、HeLa細胞とHAP1細胞をモデル細胞として、その構成的分泌にたいする影響を検討した。

(3) KOする標的遺伝子としてSNAP23を選択した。SNAP23は、神経・内分泌細胞の調節的開口分泌において主要な役割が確立しているSNAP25のホモログであり、ユニークな分子構造をもつため、他のSNAREによって代替される可能性が低いと考えられた。さらに、過去のsiRNAを用いたSNAP23ノックダウン実験の結果と、最近報告されたSNAP23KOマウスの結果に大きな乖離が存在していたからである。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集技術として、第2世代のTALEN法と第3世代のCRISPR/Cas9法を用いた。

(2) モデル細胞としてHeLa細胞とヒトの骨髄性白血病細胞に由来するHAP1細胞を使用した。

(3) 構成的分泌の指標として、ウミホタルの分泌型ルシフェラーゼ(CLuc)とGFP融合ヒト成長ホルモン(hGH-GFP)を用いた。培養液に放出されるルシフェラーゼ活性を測定することで分泌を定量化し、hGH-GFPを共焦点レーザー顕微鏡下で観察することにより、分泌経路に異常がないか定性的に観察した。

(4) SNAREタンパク質の発現はウェスタンブロット法で解析した。

(5) 遺伝子KOによる他の遺伝子発現への影響は、DNAマイクロアレイによって解析した。初期発生に関わると考えられるいくつかの遺伝子については、mRNAの発現レベルを定量PCRによって測定した。

(6) 細胞増殖に対する影響を見るため、培養 3 日目の Calcein-AM の取込量を定量することで細胞数を測定した。

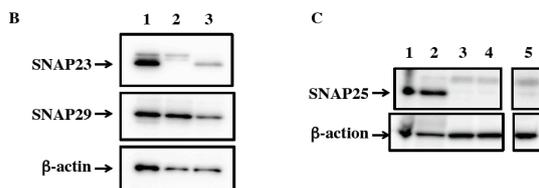
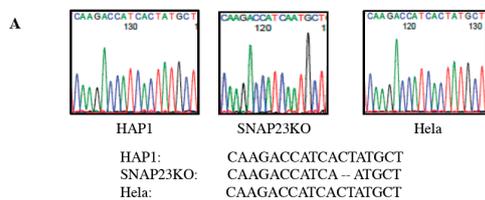
(7) ゲノム編集実験によるオフターゲット効果の有無は、exosome 解析により検証した。発現の変化した遺伝子相互の関係は pathway 解析により検討した。遺伝子発現の変化が標的遺伝子 KO の直接的な影響か否かを、KO 遺伝子のレスキュー実験によって検証した。

4. 研究成果

(1) SNAP23KO HAP1 細胞の樹立

我々は、当初 TALEN-Fork1 プラスミドと HeLa 細胞を用いて SNAP23KO 細胞の樹立を試みた。しかし、変異細胞には 3 ないし 3 の倍数塩基を欠失したインフレーム変異染色体が常に残存し、完全 KO 細胞は得られなかった。我々は、この実験結果を、完全 KO 細胞は増殖することができずに死滅したものと解釈したが、同時に、複数の染色体にフレームシフト変異を導入する実験の難しさを実感した。

そこで、外部委託に頼らなければならない TALEN-Fork1 プラスミドの使用を中止し、ゲノム編集を自前で作成可能な CRISPR/Cas9 に変更した。また、染色体数が何本あるか不明な HeLa 細胞から、生殖細胞のように染色体を 1 セットしかもたない HAP1 細胞に変更した。その結果、SNAP23 遺伝子の第 4 エクソンに 2 塩基欠失のフレームシフト変異の起こった SNAP23KO HAP1 細胞の樹立に成功した。



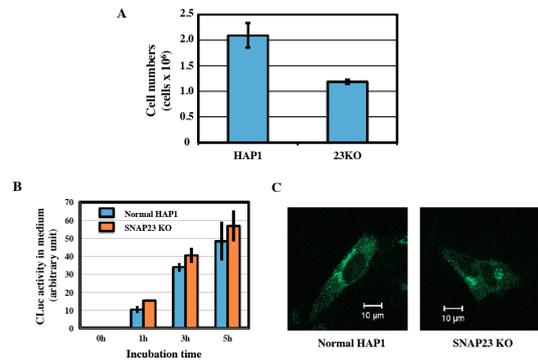
(図 B: 1, HAP1; 2, SNAP23KO; 3, HeLa)

(図 C: 1, ラット脳; 2, PC12; 3, HAP1; 4, SNAP23KO; 5, HeLa)

(2) 細胞増殖と構成的分泌

SNAP23KO HAP1 細胞と正常な HAP1 細胞の、低細胞密度での初期増殖速度を比較したところ、SNAP23KO 細胞は正常細胞より約 40% 増殖速度が低下していた。しかし細胞の形態には異常は認められなかった。

次に KO 細胞と正常細胞に CLuc と hGH-GFP プラスミドを導入し、構成的分泌に変化が見られるか検討した。しかし、CLuc の定量的な分泌と hGH-GFP の分泌像に変化は認められなかった。



(3) 遺伝子発現の変化

SNAP23KO HAP1 細胞と正常細胞から RNA を調製し、遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイによって解析した。SNAP23 の遺伝子 KO は他の SNARE 遺伝子の発現にほとんど影響しなかった一方、多くの遺伝子の発現を強力に増強または抑制した。これらの変化が CRISPR/Cas9 法のオフターゲット効果によるものかどうか、exome 解析によって調べたが、オフターゲット効果の可能性を示すデータは得られなかった。また、発現の変化した遺伝子間の pathway 解析を行ったが、過去の膨大な研究の中から、有意な関連を示唆するデータを発見することはできなかった。

(4) 定量 PCR とレスキュー実験

初期発生に関係すると思われるいくつかの遺伝子を選び、定量 PCR によって発現量を調べたところ、SNAP23KO による著しい発現低下が確認された。これらの変化が、SNAP23KO の直接的な影響か否を、SNAP23 発現ベクターを用いたレスキュー実験によって検討したが、BAMP7 の発現がわずかに上昇した以外に、調べた遺伝子発現の回復は認められなかった。

(5) SNAP23 は構成的分泌に必須ではない

我々は、過去に siRNA を用いたノックダウン実験により、SNAP23 が培養細胞の構成的分泌に必須ではないという報告をしてきた。しかし、siRNA は、最大で遺伝子発現を 90% 抑制するが、その効果は一時的であり、しかも 100% の抑制ではないという致命的な弱点もっていた。今回のゲノム編集技術による SNAP23KO で、細胞増殖と構成的分泌にほとんど影響しなかったことから、SNAP23 が培養細胞の構成的分泌に必須ではないということは、完全に証明された。

(6) コンディショナル・KO マウス

最近、SNAP23 のコンディショナル・KO マウスが 2 つの研究室で作製されたが、得られた結果は必ずしも一致していない。主に免疫細胞の分化を調べた研究では、SNAP23 は免疫細胞の生存に必須であり、また線維芽細胞の生存にも不可欠であった。他方、膵臓と耳下腺の外分泌を調べた研究では、それぞれの調

節的な分泌には必須であるが、構成的な分泌や膀胱の分化や生存には必須ではなかった。今回の結果は、膀胱や耳下腺における研究結果と通じるものが認められた。

(7) SNAP23KO マウスが胎生致死の理由

SNAP23KO マウスが子宮に着床する前の胎生 3.5 日目に死滅する理由は、今のところ不明である。着床前の受精卵では活発なオートファジーが行われており、オートファジーが阻害された受精卵は着床前に死滅することが知られている。オートファジーは、オートファゴソームとリソソームの膜融合によって起こり、この膜融合過程に Syntaxin17 と VAMP8 の関与が知られている。SNAP23 がここに関与しているかどうか、大変興味深い。本研究論文は、現在投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①田隈泰信 SNARE への道 (総説) 北海道医療大学歯学雑誌、査読無し 35 巻 1 号 Page 1-15 2016

<http://id.nii.ac.jp/1145/00010499/>

[学会発表] (計 7 件)

①荒川俊哉, 岡山三紀, 溝口到, 田隈泰信. SNARE タンパク質ノックアウト HAP1 細胞の遺伝子発現比較解析. 第 89 回日本生化学会大会 (仙台), 2016 年 9 月.

②荒川俊哉, 岡山三紀, 溝口到, 田隈泰信. SNARE ノックアウト HAP1 細胞における遺伝子発現解析-SNAP23, Syntaxin4, Syntaxin2 ノックアウトでの遺伝子発現比較. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌), 2016 年 9 月.

③田隈泰信, 荒川俊哉, 岡山三紀, 溝口到. CRISPR/Cas9 法で SNAP23 を KO した細胞の機能解析. 第 60 回日本唾液腺学会学術集会 (東京), 2015 年 12 月.

④荒川俊哉, 岡山三紀, 溝口到, 田隈泰信. SNAP23 および Syntaxin4 ノックアウト HAP1 細胞における遺伝子発現と細胞機能の解析. 第 88 回日本生化学会合同大会 (神戸), 2015 年 12 月.

⑤荒川俊哉, 岡山三紀, 溝口到, 田隈泰信. SNAP23 ノックアウト HAP1 細胞の機能解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 (新潟), 2015 年 9 月.

⑥ Takuma T, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I. Is SNAP23 essential for constitutive exocytosis? 93rd IADR General Session (ボストン, 米国), 2015 年 3 月.

⑦田隈泰信, 荒川俊哉, 岡山三紀, 溝口到. SNARE タンパク質の TALEN を用いた機能解析. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (福岡), 2014 年 9 月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田隈 泰信 (TAKUMA, Taishin)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号: 40095336

(2) 研究分担者

荒川 俊哉 (ARAKAWA, Toshiya)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号: 40306254

(3) 研究分担者

岡山 三紀 (OKAYAMA, Miki)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号: 30382500