

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06641

研究課題名(和文) LAPosomeの形成と成熟化の分子機構を明らかにする

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of LAPosome formation and maturation in macrophages

研究代表者

初沢 清隆 (HATSUZAWA, Kiyotaka)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：20256655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：MORN2発現M₂を用いた解析の結果、(1) SNARE蛋白質SNAP23はLAPosome形成に関与し、(2) SNAP23はより多くLAPosomeに局在すること、(3) SNAP23のリン酸化はLAPosome形成に影響せず、(4) リン酸化型SNAP23はLAPosome成熟を促進することが分かった。次に、MORN2の相互作用分子の解析の結果、(5) PI4キナーゼA (PI4KA) を同定した。(6) PI4KA阻害剤処理したM₂は、LAPosome形成が顕著に亢進した。以上から、MORN2はPI4KAに結合し不活性化することでLAPosome形成を亢進する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファゴサイトーシスの一種LAPでは、貪食した異物の分解の程度が厳密に制御され、代謝・再利用あるいは抗原提示への利用に振り分けられるが、その機構は未解明である。これらは生体の恒常性維持や防御機構に重要な反応であり、LAPすなわち「LAPosomeの形成と成熟化の分子機構」の解明は急務である。本研究では、SNAP23とそのリン酸化の関与、そしてMORN2と相互作用するPI4キナーゼAの関与を明らかにした。これらの成果は、LAP機構の理解に大きく貢献するとともに、LAP機能の不全で発症する自己免疫疾患などの治療法開発や創薬に資する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established macrophages (M₂) that overexpressed the LAP-related factor MORN2 and analyzed LAPosome formation and maturation. Using the M₂ that further co-expressed the SNARE protein SNAP23, we found that (1) SNAP23 is involved in LAPosome formation and (2) is more localized at LAPosome than usual. As a result of investigating the effects of phosphorylation of Ser95 of SNAP23, we found that (3) the phosphorylation of SNAP23 has no effect on LAPosome formation, and that (4) phosphorylated SNAP23 is involved in promoting LAPosome maturation.

Next, by analyzing of proteins that interact with MORN2, we identified (5) PI4 kinase A (PI4KA) as a protein that interacts with MORN2. (6) When M₂ was treated with a selective inhibitor of PI4KA, LAPosome formation was significantly enhanced. These results indicate that LAPosome formation is partially suppressed by PI4KA activity, but LAPosome formation may be promoted when PI4KA is inactivated by interaction with MORN2.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ファゴサイトーシス phagosome LAP LAPosome SNARE蛋白質 マクロファージ MORN2 LC3

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Phagosome は、マクロファージ(M)などの食細胞が外来物を認識しファゴサイトーシスによって形成される。一方、近年、オートファジー関連因子 LC3 の関与するファゴサイトーシスが発見され「LAP (LC3-associated phagocytosis)」と命名され、LC3 の局在化する phagosome は「LAPosome」と呼ばれる。Phagosome と LAPosome はともに、endosome や lysosome など内部オルガネラと部分的に融合しつつ経時的にその内部環境は変化する(「成熟化」と呼ぶ)。いずれの場合も、外来物は殺菌・分解・代謝され、生じた一部のペプチド断片は T 細胞に抗原提示される。両者の違いは、LAPosome において、外来物に依存して成熟化の進度がより厳密に制御される点が挙げられるが、その詳細な機能はよくわかっていない。本研究では、LAP 機能の解析に LAP 促進因子として同定された MORN2(membrane occupation and recognition nexus-motif protein 2)を過剰発現させた M を用いる。現在まで、LAPosome の形成と成熟に MORN2 がどのように機能するのか、また、LAPosome 成熟の調節機構は不明である。

2. 研究の目的

申請者は、細胞内小胞輸送において膜融合を担う SNARE 蛋白質に着目し、ファゴサイトーシスの分子機構の解明を進めてきた。最近、細胞膜局在 SNARE 蛋白質である SNAP23 が phagosome の形成と成熟に機能すること、その機能は SNAP23 の 95 番目の Ser 残基 (S95) のリン酸化で制御されることを明らかにした。LAP に関する予備的実験から、MORN2 を過剰発現した M では LAPosome 形成効率が促進すること、また、その促進は SNAP23 の発現抑制によって減弱することを見出した。これらの結果は、MORN2 と LC3 が SNAP23 に作用し、LAP すなわち LAPosome の形成と成熟の進行を調節することが予想される。そこで、本研究では「LAPosome の形成と成熟化はどのように調節されるのか」を学術的「問い」とし、LAP における SNAP23 の機能および MORN 2 と LC3 による新規調節機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(外来遺伝子の安定発現 M 株の樹立) マウスマクロファージ様 J774 細胞に、mVenus (以下 mV)、mV-MORN2、Myc、Myc-SNAP23、mV & Myc-SNAP23、mV-MORN2 & Myc-SNAP23、mV & Myc-Alfa-SNAP23 wild-type (WT)、mV-MORN2 & Myc-Alfa-SNAP23 WT、mV-MORN2 & Myc-Alfa-SNAP23 S95A (SA : 非リン酸化型)、mV-MORN2 & Myc-Alfa-SNAP23 S95D (SD : 疑似リン酸化型)、mV-Alfa、mV-Alfa-MORN2、mV-Alfa & FLAG-PI4KA、mV-Alfa-MORN2 & FLAG-PI4KA をそれぞれ安定発現する株を樹立し実験に用いた。

(LAP assay) (1) 上記 と の M 株に大腸菌 (Rosetta DE3) を 60 分間与え、細胞を洗浄後に回収した。その抽出液を SDS-PAGE 後、抗 LC3 抗体および抗アクチン抗体で western blot 解析した。大腸菌を与えない場合の膜結合型 LC3-II を基準に大腸菌を与えた場合の LC3-II のバンドの増加率を LAP 効率とした。(2) 上記 と の M 株に酵母細胞壁成分 zymosan を 60 分あるいは 90 分間与え、抗 LC3 抗体を用いた免疫染色法により染色した。zymosan を含む全 phagosome と LC3 の局在化する LAPosome について共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSM780, Carl-Zeiss 社) にて画像を取得し解析し、LAPosome 数/全 phagosome 数を LAPosome 形成効率 (%) とした。また、SNAP23 の過剰発現の影響については上記 と 、SNAP23 のリン酸化の影響には

- 、FLAG-PI4KA の影響には - のそれぞれ M を用い同様に LAPosome 形成効率を検証した。

(**MORN2 と相互作用する分子の解析**) MORN2 と相互作用する分子を同定するため、Alfa タグと抗 Alfa-Nanobody(抗 Alfa-Nb)システムを用いた。上記 と の M 株に対し zymosan の有無で 1 時間処理した後、回収した細胞から細胞抽出液を調製した。これら細胞抽出液について抗 Alfa-Nb 結合セファロスで免疫沈降を行い、全沈降物を質量分析にて解析した(分析: EASY-nLC1000/Orbitrap Elite, Thermo Fisher Scientific 社、データ分析及び定量: Protease Discoverer 1.4, Xcalibur, Thermo Fisher Scientific 社、福島県立医科大学 和田郁夫教授との共同研究)。

4. 研究成果

A. MORN2 依存性 LAP の特徴と SNAP23 の関与について

(A-1) MORN2 に GFP バリエーションである mVenus (mV) を付加した mV-MORN2 を安定発現させたマウスマクロファージ様 J774 細胞(以下、M /mV-MORN2)を用いて LAP への影響を解析した。M /mV-MORN2 に大腸菌を取り込ませた場合、コントロールの M /mV に比べて膜結合型 LC3-II の増加が見られ、酵母細胞壁成分 zymosan の場合、LAPosome 形成効率は顕著に促進した。後者は、ROS 産生酵素 NOX2 の阻害剤 DPI で処理すると LAPosome 形成効率は減少した。この特徴は報告されている一般的な LAP と同様であることから、以降は **MORN2 依存性 LAP** と呼ぶこととした。

(A-2) 次に MORN2 依存性 LAP における SNAP23 の関与を調べた。M /mV-MORN2 における LAPosome 形成効率は、SNAP23 の siRNA を導入しその発現を抑制した場合には減少し、Myc-SNAP23 を過剰発現させた場合には上昇した。一方、Myc-SNAP23 を単独発現させた M /Myc-SNAP23 では LAPosome 形成効率はコントロール細胞と変わらなかった。以上から、LAPosome 形成は MORN2 の発現が律速になっていること、つまり MORN2 の下流で SNAP23 が機能している可能性が考えられた。

(A-3) また、M /mV-MORN2 & Myc-SNAP23 に zymosan を与えた場合、Myc-SNAP23 が通常より多く局在する phagosome の割合の増加が観られた。次に、この細胞について phagosome 内の ROS 産生を FcOxyBURST 試薬(Invitrogen 社)を用いて調べた結果、コントロール細胞に比べ ROS 産生量が顕著に亢進していた。以上から、zymosan 取り込み時の MORN2 依存性 LAP において **SNAP23 は phagosome 膜上により多く局在化し、NOX2 複合体の会合を促進することで ROS 産生が亢進し、その結果、LAPosome 形成 (LC3 の局在化した phagosome 形成) が誘導される可能性が考えられた。**

(以上の結果は、Biology Open (2020) 9, bio051029. doi:10.1242/bio.051029 に発表)

B. LAPosome 形成と成熟における SNAP23 の 95 番目 Ser 残基(S95)のリン酸化の影響について

SNAP23 の S95 のリン酸化は Fc 受容体依存的な phagocytosis において phagosome 形成と成熟に抑制的に機能する。そこで、MORN2 依存性 LAP におけるリン酸化の影響を明らかにするため、SNAP23 の S95 のリン酸化変異体を発現する M /mV & Myc-Alfa-SNAP23 WT (コントロール細胞、以下、M /mV & M-A-SN23 WT)、M /mV-MORN2 & M-A-SNAP23 WT (以下、M /mV-M2 & M-A-SN23 WT)、M /mV-M2 & M-A-S23 SA、M /mV-M2 & M-A-SN23 SD の 4 種の細胞株を樹立した。

(B-1) これらの細胞株について zymosan を与えた時の

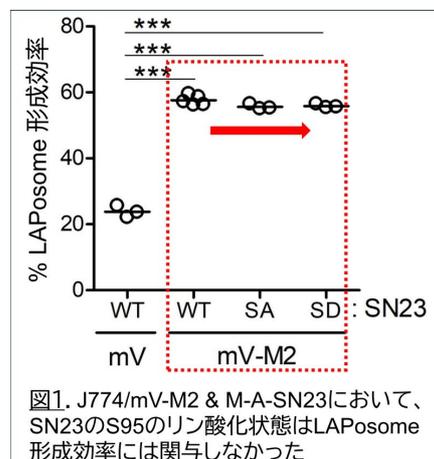


図1. J774/mV-M2 & M-A-SN23において、SN23のS95のリン酸化状態はLAPosome 形成効率には関与しなかった

LAPosome 形成効率を調べた結果、コントロール細胞に比べ M /mV-M2 & M-A-SN23 WT では促進が見られ、この促進は他のリン酸化変異体でも同程度だった(図1)。よって、LAPosome 形成効率に SNAP23 の S95 のリン酸化状態は関与しないことがわかった。

(B-2)次に SNAP23 のリン酸化状態の LAPosome 成熟への影響について、ライソゾームタンパク質 LAMP1 の LAPosome 局在化を指標に調べた。その結果、コントロール細胞に比べ M /mV-M2 & M-A-SN23 WT と M /mV-M2 & M-A-SN23 SD で成熟化の促進が見られた(図2)。さらに phagosome 膜上の SNAP23 の S95 は IKK2 (I B キナーゼ-2)によりリン酸化されることから、IKK2 の特異的阻害剤 **SC-514** 存在下に M /mV-M2 & M-A-SN23 WT と M /mV-M2 & M-A-SN23 SD の LAPosome 成熟への影響を調べた。その結果、後者では阻害剤の効果は見られなかったが、M /mV-M2 & SN23 WT では有意に LAPosome の成熟化が減弱した(図3)。

以上から、MORN2 依存性 LAP では、phagosome 膜上に SNAP23 が多く局在化することで LC3 が集積し、IKK2 活性によって SNAP23 がリン酸化状態になり、ライソゾームとの融合(LAPosome 成熟)が促進される可能性が考えられる。IKK2 は LC3 と相互作用する LIR モチーフを有することから、LAPosome にリクルートされやすくなっているのかもしれない。

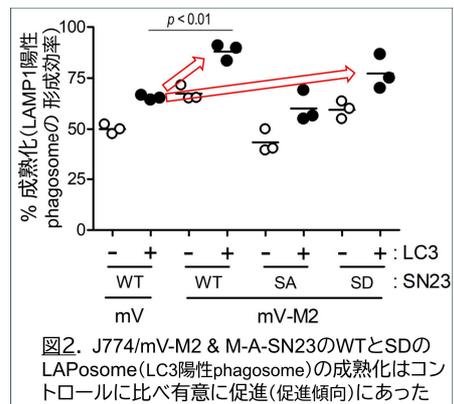


図2. J774/mV-M2 & M-A-SN23のWTとSDの LAPosome(LC3陽性phagosome)の成熟化はコントロールに比べ有意に促進(促進傾向)にあった

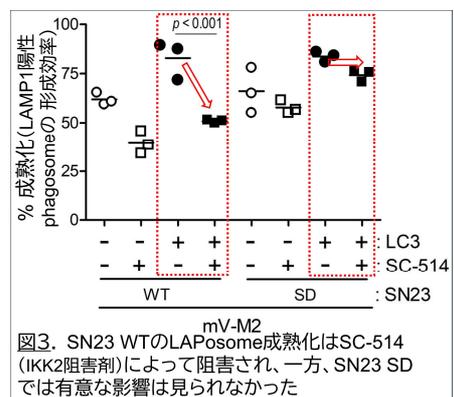


図3. SN23 WTのLAPosome成熟化はSC-514 (IKK2阻害剤)によって阻害され、一方、SN23 SDでは有意な影響は見られなかった

C. MORN2 と相互作用する分子の同定について

MORN2 と相互作用する分子に対する質量分析の結果、M /mV-Alfa-MORN2 において zymosan 有の条件で複数の分子と有意な相互作用が見られた。それらの分子から、膜コンタクトやエンドサイトーシスなど細胞内輸送に関連する PI4 キナーゼ A (PI4KA; phosphatidylinositol 4-kinase A)を有望な候補としてクローニングし、MORN2 との相互作用と LAP における機能を解析した。

(C-1) HEK293T 細胞に mV-Alfa または mV-Alfa-MORN2 と FLAG-PI4KA を一過的に共発現し、それらの細胞抽出液について抗 Alfa-Nb あるいは抗 FLAG 抗体で免疫沈降実験を行った。その結果、抗 FLAG 抗体で mV-Alfa-MORN2 との相互作用が確認できた。また、一過的発現に用いた組合せを安定発現する M 株をそれぞれ樹立し、同様に免疫沈降実験を行った結果、抗 Alfa-Nb を用いることで mV-Alfa-MORN2 と FLAG-PI4KA との相互作用が確認できた。

(C-2) M /mV-Alfa-MORN2 と M /mV-Alfa-MORN2 & FLAG-PI4KA、またコントロールとして M /mV-Alfa と M /mV-Alfa & FLAG-PI4KA について zymosan を与えて LAPosome 形成効率を調べ、FLAG-PI4KA 発現の影響を検討した。その結果、FLAG-PI4KA 発現の影響は見られなかった。FLAG-PI4KA の発現量や適切な局在化が不十分な可能性が考えられたため、PI4KA 特異的阻害剤 **GSK-A1** の影響を調べた。初めに、LAPosome 形成効率が阻害されると予想し、M /mV-Alfa-MORN2 と M /mV-Alfa-MORN2 & FLAG-PI4KA について調べたところ、GSK-A1 添加は、むしろ LAPosome 形成効率を促進した(図4)。

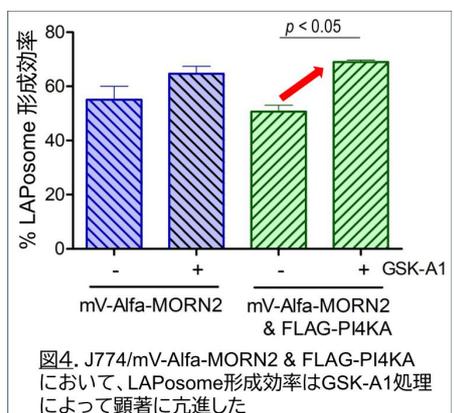


図4. J774/mV-Alfa-MORN2 & FLAG-PI4KA において、LAPosome形成効率はGSK-A1処理によって顕著に亢進した

次に、M /mV-Alfa と M /mV-Alfa & FLAG-PI4KA について同様に GSK-A1 添加の効果を調べたところ、より顕著な LAPosome 形成効率の促進が見られ、それは M /mV-Alfa-MORN2 の場合と同程度の高い効率だった (図 5)。

以上の結果から、PI4KA は MORN2 と相互作用すること、PI4KA 活性の阻害は LAPosome 形成効率を促進することがわかった。これらから、通常 PI4KA の活性は LAPosome 形成に阻害的に機能するが、zymosan を与えた M においては、PI4KA と MORN2 との相互作用によりそのキナーゼ

活性が抑制され、LAPosome 形成が促進される可能性が考えられる。MORN2 を介した PI4KA 活性と SNAP23 局在化の制御、そして LC3 局在化と LAPosome 成熟との関連の解明は今後の課題である。

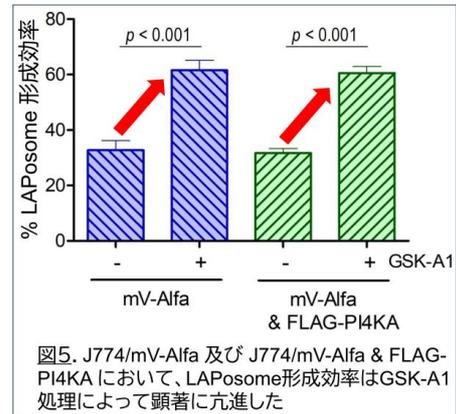


図5. J774/mV-Alfa 及び J774/mV-Alfa & FLAG-PI4KA において、LAPosome形成効率はGSK-A1 処理によって顕著に亢進した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maya Morita, Mayu Kajiye, Chiye Sakurai, Shuichi Kubo, Miki Takahashi, Daiki Kinoshita, Naohiro Hori, Kiyotaka Hatsuzawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of MORN2 stability and regulatory function in LC3-associated phagocytosis in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Open.	6. 最初と最後の頁 bio051029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.051029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiyotaka Hatsuzawa, Chiye Sakurai	4. 巻 63
2. 論文標題 Regulatory Mechanism of SNAP23 in Phagosome Formation and Maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yonago Acta Med.	6. 最初と最後の頁 135-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2020.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶江真由、高橋美紀、森田真矢、櫻井千恵、初沢清隆
2. 発表標題 非標準的オートファジーLAP (LC3-associated phagocytosis) に関連するMORN2は、ユビキチン-プロテアソーム系で限定分解される
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井千恵、初沢清隆
2. 発表標題 ファゴサイトーシスにおけるSNAP-23リン酸化の機能は受容体依存的である
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田真矢、梶江真由、櫻井千恵、初沢清隆
2. 発表標題 MORN2はSNAP-23のファゴソーム膜局在量を増加させ、非標準的オートファジーを亢進する
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川武早希、櫻井千恵、初沢清隆
2. 発表標題 MORN2依存性LAPにおけるリン酸化SNAP23の役割
3. 学会等名 第65回 日本生化学会 中国四国支部例会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐々木航斗、初沢清隆
2. 発表標題 LAP関連因子MORN2と相互作用するPI4キナーゼAのLAP効率に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回 日本生化学会 中国四国支部例会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐々木航斗、初沢清隆
2. 発表標題 LAP関連因子MORN2と相互作用する分子の同定とそのLAP効率に及ぼす影響
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学研究成果リポジトリ
<https://repository.lib.tottori-u.ac.jp/ja/list/authors/%E3%83%8F/04750>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------