

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22570189

研究課題名(和文)ファゴソーム成熟を司るSNAP-23の新奇機能の解明

研究課題名(英文)Analyses of a novel function for SNAP-23 in phagosome maturation

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) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：食細胞におけるファゴソーム成熟化は、内部オルガネラの複雑な膜融合反応を伴うことが予想されるが、その分子機構はほとんどわかっていない。

本研究では、細胞膜局在SNAREタンパク質の1つSNAP-23が、ファゴサイトーシスのみならず、ファゴソーム内部の活性酸素産生、酸性化、ライソソームとの膜融合といった成熟過程に機能することを明らかにした。また、新たに構築したSNAP-23の一分子FRET解析系を用い、細胞膜ではVAMP5とsyntaxin3、ファゴソーム膜ではVAMP7とSNARE複合体形成することを見出した。しかし、VAMP5がファゴサイトーシスに機能する結果は得られていない。

研究成果の概要(英文)：Phagosome maturation in phagocytes is thought to be accomplished by membrane fusion of phagosome with other organelles, but the molecular mechanism in this process remains unknown.

In this study, we have found SNAP-23, a plasma membrane-localized SNARE, functions not only in phagocytosis but also in phagosome maturation processes such as production of reactive oxygen species and acidification within phagosomes and fusion of phagosome with lysosome. To trace a conformational change of SNAP-23 during fusion event, we established a single-molecule fluorescence resonance energy transfer system for SNAP-23. Using this system, we have found a forming SNARE complex with VAMP7 on phagosomal membrane and a novel complex including VAMP5 and syntaxin3 on plasma membrane. This suggests that SNAP-23 mediates the membrane fusion of phagosome with lysosome by forming a SNARE complex with VAMP7. Unfortunately, we have never found a positive function of VAMP5 in phagosome formation and maturation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：SNAREタンパク質 ファゴサイトーシス ファゴソーム 膜融合 マクロファージ 生体防御

1. 研究開始当初の背景

マクロファージなどの食細胞は、生体防御の最前線で病原微生物などの侵入に対処する。この防御反応で重要なのは、ファゴサイトーシス(取り込み)過程とファゴソームの成熟(ファゴソーム内での殺菌・分解・除去反応)の過程である。前者については、異物の取り込みの際、内部のいくつかのオルガネラから膜成分が供給される。私たちを含む複数のグループは、その際の膜融合機構を明らかにしてきた。一方、後者は、ファゴソームへエンドソームやライソソームからさまざまな成分の供給される反応で、例えば活性酸素種産生のための分子装置、内部酸性化のためのプロトンポンプや加水分解酵素など異物代謝には重要な過程である。しかし、それらを受け渡す膜融合機構はほとんどわかっていない。

私たちは、ファゴサイトーシスに機能する細胞膜局在の膜融合装置 SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor)-attachment protein receptor)タンパク質を明らかにするために、その1つ SNAP-23 の解析を進めていた。その過程で、SNAP-23 はファゴサイトーシスではなく、むしろファゴソームの成熟化に機能する予備的データを得たことが、本研究を着想するに至った背景・経緯である。

2. 研究の目的

ファゴソーム成熟を司る膜融合反応は、ファゴソーム膜上の SNARE タンパク質とエンドソームやライソソーム上の SNARE タンパク質が最適な組み合わせで、かつ順序よく機能し進行すると考えられる。SNAP-23 は細胞膜局在 SNARE タンパク質であり、ファゴソーム膜上で機能することが予想される。本研究では、これまで未知の SNAP-23 のファゴソーム膜上での膜融合反応、つまりファゴソーム成熟過程における新奇機能を解明するとともにそのパートナーとなりうる SNARE タンパク質の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ファゴソーム成熟過程の解析

pH 指示薬である pHrodo (インビトロジェン社)が結合した黄色ブドウ球菌(pHrodo-SA)を用いて、ファゴソームの成熟過程における酸性状態を解析した。mVenus (黄緑色蛍光タンパク質)を付加した SNAP-23 の過剰発現マクロファージと mVenus 過剰発現マクロファージについて pHrodo-SA を与え、経時的に反応を止め、酸性化に伴う赤色蛍光を定量し比較検証した。

LysoTrackerRed (LTR: インビトロジェン社)によりマクロファージのライソソームを標識し、IgG でオプソニン化したラテックスビーズを与えファゴソームを形成させた。形成初期には無色のファゴソームが LTR によ

り赤色化する割合(ファゴソーム数)を経時的に計測した。これらを上述の mVenus-SNAP-23 過剰発現細胞、および siRNA により SNAP-23 発現を抑制した細胞について検証した。

EGFP (緑色蛍光タンパク質)は、酸性環境で消光することから、ラテックスビーズを精製 EGFP でコートし、さらに抗 EGFP 抗体でオプソニン化したものを作成した。これをマクロファージに取り込ませ、顕微鏡観察下に形成したファゴソームの蛍光の強弱で、分類し定量した。これらを、SNAP-23 発現抑制細胞について行った。

(2) ファゴソームとライソソームの融合解析

・Rhodamine B (赤色蛍光)結合デキストランをマクロファージに一晩与え、培地を交換し5-7時間培養することでライソソームを標識した。この状態に IgG オプソニン化ラテックスビーズを取り込ませ、形成初期には無色のファゴソームが、ライソソームとの膜融合により経時的に赤色化する割合を計測した。これらを mVenus-SNAP-23 過剰発現細胞、および siRNA により SNAP-23 発現を抑制した細胞について検証した。

(3) SNAP-23 の1分子 FRET 解析

SNAP-23 の過剰発現や発現抑制実験では、この分子が実際に膜融合に機能するかわからない。SNAP-25 (SNAP-23 のアイソフォーム)に関する先行研究で、X 線構造解析から SNARE 複合体形成時に分子内で近接する部位に2色の蛍光タンパク質を導入することにより1分子 FRET 解析が行われていた。そこで、これを模して SNAP-23 の2つの SNARE モチーフ (SN1 と SN2) について、SN1 の N 末端側に TagGFP2、SN2 の N 末端側に TagRFP を導入した。コントロールとして、SN2 の C 末端側に TagRFP を導入した。これらをマクロファージで発現させ、細胞膜やファゴソーム膜上において、458nm で励起し蛍光波長スペクトラムをとり、505nm (TagGFP2)と 580nm (TagRFP)の蛍光強度比を FRET 効率とした。FRET が検出されれば、SNAP-23 がその場で SNARE 複合体形成している(膜融合に機能している)状態と考えることができる。

4. 研究成果

(1) SNAP-23 過剰発現マクロファージの解析

・mVenus 発現マクロファージ(コントロール)と mVenus-SNAP-23 発現マクロファージについて以下の解析を行い、SNAP-23 の発現により、ファゴソームの成熟化が亢進していることを明らかにした。

精製ファゴソームの解析

・ラテックスビーズをマクロファージに取り

込ませ、形成したファゴソームを経時的に回収精製した。コントロールに比べ、mVenus-SNAP-23 細胞では、ファゴソーム形成の早い段階からライソゾームタンパク質や液胞型 ATPase のサブユニットの局在化が見られた。また、活性酸素種 (ROS) 産生に関わる分子 (gp91^{phox} や p22^{phox}) の局在は早い段階にみられ、その後は速やかに減少していた。これらから、SNAP-23 はファゴソームとライソゾームの膜融合や、ROS 産生分子の局在化に機能する可能性が考えられる。

ファゴソームの内部酸性化を指標にした解析

・ pHrodo-SA を用いた解析から、SNAP-23 発現細胞ではコントロールに比べて赤色蛍光強度が高くなった。これはファゴソーム内部の酸性化の亢進により、pHrodo が蛍光を発するようになったためであり、SNAP-23 がファゴソームの酸性化の促進に機能することが考えられる。

・ LysoTrackerRed を用いたシングルファゴソームレベルでの酸性化を解析した結果、SNAP-23 発現細胞では、ライソゾームとの膜融合あるいは内部の酸性化が亢進していることがわかった。

これらの結果から、SNAP-23 はファゴソームの成熟化 (特に内部酸性化) に機能する可能性が考えられる。

ファゴソームとライソゾームの膜融合解析

・ SNAP-23 過剰発現細胞において、あらかじめライソゾームを Rhodamine B デキストランで標識した状態で、シングルファゴソームを観察した結果、赤色蛍光を獲得したファゴソームの割合がコントロールに比べ早い時間から多く見られた。これは、SNAP-23 がファゴソームとライソゾームの直接の膜融合に機能している可能性が考えられる。

(2) siRNA による SNAP-23 発現抑制マクロファージの解析

・ SNAP-23 発現抑制細胞では、ファゴサイトーシス自体が抑制されていた。つまり、SNAP-23 は取り込み過程にも機能することが明らかになった。そこで、発現抑制細胞を用いて成熟過程を調べる際には、形成されたシングルファゴソームについて解析を行った。さらに、SNAP-23 を過剰発現し機能回復 (レスキュー) 実験を行った結果、SNAP-23 がファゴソームの成熟化過程で機能することが明らかになった。

ファゴソームの内部酸性化を指標にした解析

・ EGFP でコートし (さらに IgG でオプソニン化し) たラテックスビーズを用いてシングルファゴソームを解析した。このビーズはファゴソーム内部の酸性化によって、EGFP シグナルが減弱する。また、この場合、内部に

取り込まれたことを確認するために、TagRFP 結合の Fc 受容体 (FcγRIIa) を発現するマクロファージを用いた。取り込まれたファゴソームには TagRFP-FcR が局在するので赤色蛍光の輪郭で区別できる。赤色のファゴソーム内 EGFP シグナルの経時的な変化を定量した。SNAP-23 を発現抑制した細胞では、コントロールに比べて EGFP シグナルの減弱が抑制されていた。

・ また、LysoTrackerRed を用いた解析においても、SNAP-23 発現抑制細胞では、ファゴソームへの LysoTrackerRed の蓄積が阻害傾向だった。

以上の SNAP-23 発現抑制と先述の過剰発現の結果から、SNAP-23 はファゴソームの内部酸性化に機能することが明らかになった。

ファゴソームとライソゾームの膜融合解析

・ SNAP-23 発現抑制細胞について、Rhodamine B デキストランを用いたライソゾームとの融合解析を行った。コントロールに比べ、ファゴソームとライソゾームの融合は有意に抑制されていた。また、解析前に SNAP-23 を過剰発現させた場合、このライソゾームとの融合阻害が回復したことから、見られた抑制は SNAP-23 特異的な効果であることがわかった。

これらの結果から、SNAP-23 はファゴソーム膜上の SNARE タンパク質としてエンドソームやライソゾームとの膜融合に機能し、内部の酸性化などの成熟化を制御していることが明らかになった。

(3) SNAP-23 の 1 分子 FRET 解析によるファゴソーム膜上での動的機能の解明

・ SNAP-23 の分子内に TagGFP2 と TagRFP を導入したプローブにおいて FRET シグナルが検出できる条件について検証した。

細胞膜上での FRET 解析

・ マクロファージの細胞膜に局在する種々の SNARE タンパク質と共発現させたところ、VAMP5 の場合に顕著な FRET シグナルが見られた。また、VAMP5 と syntaxin3 (stx3) を組合わせた場合、より強いシグナルが見られ、これらのシグナルはコントロールのプローブでは見られなかった。これらの結果から、作製した FRET プローブが SNARE 複合体形成の検出に使用可能であること、また、これまで知られていなかった SNAP-23/stx3/VAMP5 の SNARE 複合体が存在しうることが明らかになった。

ファゴソーム膜上での FRET 解析

・ SNAP-23 がファゴソーム成熟で機能するためには、ファゴソーム膜上でエンドソームやライソゾームの SNARE タンパク質と複合体形成すると考えられ、それらについて FRET プローブを用い解析した。初めに、ザ

イモサンにより形成させたファゴソーム膜上の FRET シグナルを調べたが、経時的なシグナルの変動は検出できなかった。

・次に、エンドソーム・リソソーム局在の VAMP3, 4, 7, 8 を FRET プローブと共に発現させ、ファゴソーム膜上の FRET シグナルを解析した。その結果、唯一 VAMP7 を発現させた場合、顕著な FRET シグナルが検出できた。この時、細胞膜上のシグナルは検出されず、またコントロールのプローブでもファゴソーム膜上にはシグナルは見られなかった。つまり、ファゴソーム膜上に見られたシグナルは成熟過程における SNAP-23 の動的変化（構造変化）と考えられる。

これらの結果から、SNAP-23 は実際にファゴソーム膜上でライソソームとの膜融合（恐らく VAMP7 との SNARE 複合体形成）に機能することが明らかになった。

（４）ファゴサイトーシスにおける VAMP5 の機能解析

・SNAP-23 の FRET プローブ解析から、細胞膜上で SNAP-23/stx3/VAMP5 からなる新規 SNARE 複合体が形成される可能性が考えられた。そこで、VAMP-5 の過剰発現マクロファージを作製し、その局在を調べると、細胞膜と形成されたファゴソーム膜に見られた。また、この細胞についてファゴサイトーシス効率への影響を解析したが、顕著な変化は見られなかった。したがって、この新規 SNARE 複合体がファゴサイトーシス反応に関与する可能性は低いと考えられる。

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 6 件)

1. Canton J, Ndjamen B, Hatsuzawa K, Kima PE. Disruption of the fusion of Leishmania parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection. **Cell Microbiol.** **14**, 937-948, 2012. 査読有、DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01767.x
2. Campbell-Valois FX, Trost M, Chema li M, Dill BD, Laplante A, Duclos S, Sadeghi S, Rondeau C, Morrow IC, Bell C, Hatsuzawa K, Thibault P, Desjardins M. Quantitative proteomics reveals that only a subset of the endoplasmic reticulum contributes to the phagosome. **Mol Cell Proteomics.** **11**, M111.016378, 2012. 査読有、DOI : 10.1074/mcp.M111.016378 mcp.M111.016378.

3. Sakurai C, Hashimoto H, Nakanishi H, Arai S, Wada Y, Sun-Wada GH, Wada I, Hatsuzawa K. SNAP-23 regulates phagosome formation and maturation in macrophages. **Mol. Biol. Cell.** **23**, 4849-4863, 2012. 査読有、DOI: 10.1091/mbc.E12-01-0069
4. 初沢清隆、櫻井千恵、和田郁夫、「細胞がものを食べる仕組み」生物の化学 遺伝（エヌ・ティー・エス社）65 巻、68-73、2011. 査読無
5. Ndjamen B, Kang BH, Hatsuzawa K, Kima PE. Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cell Microbiol.** **12**, 1480-1494, 2010. 査読有、DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01483.x
6. 初沢清隆、「ファゴサイトーシスにおける SNARE タンパク質の関与」、生体の科学（医学書院）、61 巻、216-221、2010. 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 櫻井千恵、初沢清隆、和田郁夫「SNAP-23 の Ser95 リン酸化はファゴサイトーシス効率の調節に機能する」第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜（横浜）
2. 櫻井千恵、初沢清隆、和田郁夫「The SNARE Proteins regulate Phagocytosis and Phagosome Maturation in J774 Macrophages」EMBO Conference on “Subversion of Host Cellular Organization and Function by Pathogens”, 2012 年 5 月 7 日、Eurotel Victoria Villas (Villars-sur-Ollon/スイス)
3. 櫻井千恵、初沢清隆、和田郁夫「SNAP-23 のファゴサイトーシスおよびファゴソーム成熟への関与」第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 27 日、北海道大学（札幌）
4. 櫻井千恵、初沢清隆、和田郁夫「マクロファージにおける SNAP-23 の分子内 FRET 解析」第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 27 日、北海道大学（札幌）

5. 初沢清隆、櫻井千恵、和田郁夫
「細胞内膜におけるカーゴダイナミクスの制御について」
第 83 回日本生化学会・第 33 回日本分子生物学会 合同年会、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド（神戸）
6. 初沢清隆、橋本裕美、和田郁夫
「小胞体局在 SNARE タンパク質による phagocytosis の調節」
第 62 回日本細胞生物学会大会、2010 年 5 月 21 日、大阪国際会議場（大阪）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

和田 郁夫 (WADA, Ikuo)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40182969