

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790083

研究課題名(和文)マクロファージ古典的活性化のキーとなる小胞体アミノペプチダーゼの分泌とその制御

研究課題名(英文)Contribution of ER-aminopeptidase secretion to classical activation of macrophages

研究代表者

後藤 芳邦(GOTO, Yoshikuni)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：90455345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近、私たちは小胞体アミノペプチダーゼ1(ERAP1)がマクロファージにおいて細菌由来のリポ多糖刺激に伴い小胞体から細胞外へと分泌され、貪食活性を亢進することを明らかにした。本研究では、ERAP1の分泌がリポ多糖だけではなく、様々な細菌・ウイルス構成因子によって惹起されることや、ERAP1分泌を直接引き起こす下流の因子(TNF- α とIFN- γ)の同定に成功した。また、ERAP1の小胞体貯留/分泌のスイッチングに關与するドメインの同定やERAP1が複合体を形成し、マクロファージの貪食活性亢進に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently we demonstrated that endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) was secreted from macrophages in response to LPS and IFN- γ , and it enhanced their phagocytic activity. In this study, we analyzed the mechanisms of ERAP1 secretion and phagocytosis activation by secreted ERAP1. TLR ligands such as exogenous lipopolysaccharide, lipoprotein and DNA induced secretion of the enzyme from the murine macrophage cell line RAW264.7 and murine peritoneal macrophages. These secretions were suppressed by deletion of either TNF- α or type 1 IFNR gene, suggesting that TNF- α and type I IFN expressed by TLR signaling are important for ERAP1 secretion. On the other hand, we found the exon 10 sequence of ERAP1 gene is crucial for ER-retention and extracellular ERAP1 complexed with several cytokines showed more effective on phagocytosis than ERAP1 only. These results suggest that ERAP1 secretion is key event for classical activation of macrophages.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アミノペプチダーゼ マクロファージ LPS インターフェロン トール様受容体 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

小胞体アミノペプチダーゼ1 (ERAP1) は小胞体内腔に局在し、MHC クラス I 分子に供される抗原ペプチドを生成する酵素として知られてきた。しかしながら、最近我々は、エンドトキシン刺激に伴い活性化されたマクロファージでは、本酵素が細胞外へと分泌されることを明らかにした。さらに、細胞外に分泌された ERAP1 はマクロファージの貪食活性を亢進することも見出した。すなわち、獲得免疫のキー分子として機能している ERAP1 は、ウイルスや細菌感染時という働き時に細胞外でマクロファージの活性化を介して自然免疫をも調節する極めて重要な酵素であることを示唆している。

2. 研究の目的

今回、ERAP1 の分泌機構および ERAP1 分泌によるマクロファージの活性化の分子機構を解析することでアミノペプチダーゼによる新しい生体防御システムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)ERAP1 分泌リガンドの探索

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に種々のトール様受容体 (TLR) リガンド (Pam3CSK4, FSL-1, ODN1826, Poly(I:C)) を処理し、24-48 時間後の培養上清中の ERAP1 量をウエスタンブロットにより検出した。また、LPS を腹腔内投与したマウスの血中 ERAP1 濃度をウエスタンブロットにより検討した。

(2)ERAP1 分泌機構の解明

MyD88 および TRIF 遺伝子欠損マウス由来の腹腔内マクロファージを用いて LPS 依存的な ERAP1 の分泌を検討した。また、TLR 下流因子に当たる IFN- β 、TNF- α が ERAP1 の分泌に及ぼす影響について両遺伝子欠損マウスの腹腔内マクロファージを用いて検討した。

(3)ERAP1 の分泌を制御する分子内ドメインの同定

ERAP1 は分子中央に他の類縁酵素にはない挿入配列 (exon 10) を有する。そこで、本領域の欠失変異体を作製し、HEK293 細胞に強制発現することで ERAP1 の小胞体貯留/分泌に及ぼす影響について検討した。

(4)ERAP1 複合体による貪食活性亢進
LPS/IFN- γ で処理した RAW264.7 細胞の培養上清を超遠心分離により上清と沈殿に分離した。得られた沈殿中の成分を免疫電顕、ウエスタンブロットやショットガンプロテオミクス法により解析した。また、本複合体成分 (沈殿画分) を RAW264.7 細胞に処理し、貪食活性への寄与を解析した。

4. 研究成果

(1)ERAP1 リガンドの探索

我々は既に、ERAP1 を分泌させる因子として TLR4 リガンドである LPS を同定した。そこで、他の TLR リガンドについて ERAP1 分泌に及ぼす影響を調べた結果、RAW264.7 細胞では MyD88 依存性シグナル経路を有する TLR のリガンド、TLR2/1 リガンド (Pam3CSK4)、2/6 リガンド (FSL-1)、9 リガンド (ODN1826) を IFN- γ と共処理することで ERAP1 分泌が認められた。一方で TRIF 経路を有する TLR3 のリガンド poly (I:C) では IFN- γ の有無に関わらずほとんど ERAP1 分泌が認められなかった (図 1)。この結果は、ERAP1 分泌における MyD88 経路の重要性を示唆している。また、ERAP1 がほとんどの TLR シグナリングの活性化で分泌されることから、ERAP1 分泌がマクロファージの古典的活性化における普遍的なイベントであることが示唆された。すなわち、分泌された ERAP1 による貪食活性亢進は生体防御において重要な役割を果たしている可能性が高い。

また、LPS を腹腔投与したマウスでは投与 12-24 時間後に血中に ERAP1 が認められた。一方で、LPS 未投与マウスでは ERAP1 はほとんど確認できなかった。すなわち、個体レベルにおいても ERAP1 は TLR シグナリング依存的に分泌されることが分かった。

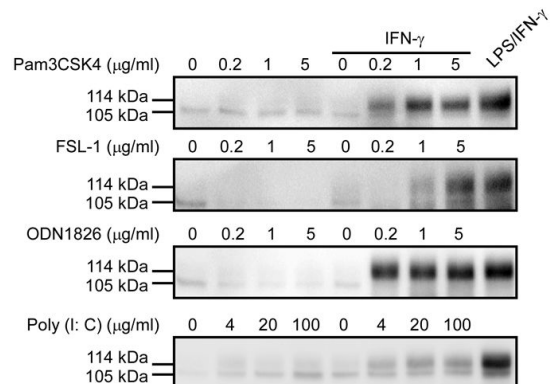


図 1. TLR リガンドによる ERAP1 の分泌

(2)ERAP1 分泌機構の解明

予想通り MyD88 遺伝子欠損マウス由来の腹腔内マクロファージでは LPS や Pam3CSK4 依存的な ERAP1 の分泌はほとんど認められなかった (図 2)。一方で、TRIF 遺伝子欠損マウス由来のマクロファージでは同刺激依存性 ERAP1 分泌は野生型マクロファージに比べて若干低下が認められただけであった。以上より、ERAP1 の分泌には MyD88 経路の活性化が必須であることが分かった。



図 2. MyD88 および TRIF 遺伝子欠損による ERAP1 分泌への影響

MyD88経路の下流ではTNF- α やIFN- β の発現/分泌が促進される。そこで両分子のERAP1分泌における影響を遺伝子欠損マウス由来マクロファージを用いて解析したところ、いずれの分子の欠損もERAP1分泌をほぼ完全に抑制した(図3)。すなわち、ERAP1分泌はTLR下流のTNF- α 、IFN- β が惹起していることが示唆された。

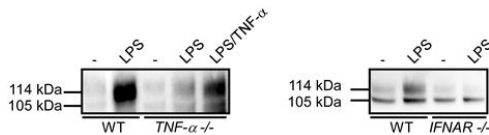


図3. TNF- α および IFN- β の遺伝子欠損による ERAP1 分泌への影響

(3)ERAP1 の分泌を制御する分子内ドメインの同定

ERAP1 の exon 10 は他の類縁酵素(M1 アミノペプチダーゼファミリー酵素)に認められない特徴的な挿入配列である。また、細胞膜や細胞質に局在することが多いM1 アミノペプチダーゼの中で、ERAP1 は小胞体内腔に局在し、刺激に応じて分泌されるという極めて特異な性質を示す。これらのことからERAP1 の exon 10 配列は ERAP1 の局在調節に関与している可能性が考えられたので、本配列の欠失変異体を HEK293 細胞に強制発現させた。その結果、野生型酵素を発現させた細胞では細胞内に ERAP1 の発現が認められ、細胞外にはほとんど分泌されなかったが、exon 10 欠失変異体では、細胞外にほぼ全て分泌された(図4)。以上の結果は ERAP1 の exon 10 が本酵素の小胞体貯留と分泌を制御することを示唆している。

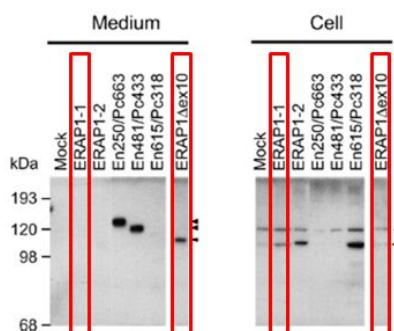


図4. ERAP1 exon10 欠失による小胞体貯留/分泌への影響

(4)ERAP1 複合体による貪食亢進

LPS/IFN- γ で活性化した RAW264.7 細胞の培養上清から超遠心分離により得られた沈殿画分の免疫電顕の結果、ERAP1 が分泌小胞であるエキソソーム中に含まれていることを明らかにした。この小胞には、未活性化 RAW264.7 細胞より得られたエキソソーム

とは異なりTNF- α やCCL3などいくつかのサイトカインが含まれていることがショットガン解析やウエスタンブロットにより確認された。また、ERAP1 を含んだエキソソームを RAW264.7 細胞に処理したところ、ERAP1 単体や ERAP1 を含まないエキソソームで処理した場合に比べて有意に貪食活性が亢進された。また、本エキソソームによる貪食活性は ERAP1 阻害剤やサイトカイン阻害剤によって抑制された。以上の結果は、ERAP1 のマクロファージ活性化効果は他のサイトカインとの相互作用を介して相乗/相加的に亢進されると考えられる。

以上、本研究を通して、ERAP1 分泌がマクロファージの古典活性化において普遍的なイベントであることや ERAP1 分泌の分子機構、分泌された ERAP1 がマクロファージによる生体防御の要である貪食や NO 産生において他の因子と協調しつつ極めて重要な役割を担っていることが示唆された。

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4件)

Goto Y., Ogawa K., Nakamura T.J., Hattori A., and Tsujimoto M.: "Substrate-dependent nitric oxide synthesis by secreted endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in macrophages." *Journal of Biochemistry* 157(6). 439-449 (2015), 査読有 doi: 10.1093/jb/mvv001

Goto Y., Ogawa K., Nakamura T.J., Hattori A., and Tsujimoto M.: "TLR-Mediated Secretion of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 from Macrophages" *Journal of Immunology* 192 (9). 4443-4452 (2014), 査読有 doi: 10.1049/jimmunol.1300935

Ogawa Y., Ohnishi A., Goto Y., Sakuma Y., Watanabe J., Hattori A., and Tsujimoto M.: "Role of glutamine-169 in the substrate recognition of human aminopeptidase B" *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects* 1840 (6). 1872-1881 (2014), 査読有 doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.002

Hattori A., Goto Y., Tsujimoto M.: "Exon 10 coding sequence is important for endoplasmic reticulum retention of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1" *Biol. Pharm. Bull.* 35 (4). 601-605 (2012), 査読有 doi: 10.1248/bpb.35.601

〔学会発表〕(計4件)

後藤 芳邦、小川 健司、中村 孝博、服部 明、辻本 雅文:”小胞体アミノペプチダーゼ1 遺伝子欠損による腹腔内マクロファージの Fc 受容体依存性貪食活性の低下” 第87回日本生化学会大会. 2014年10月18日 京都国際会議場(京都府京都市)

後藤 芳邦、小川 健司、中村 孝博、服部 明、辻本 雅文: "マクロファージ古典的活性化に重要なトール様受容体を介した小胞体アミノペプチダーゼの分泌" 第86回日本生化学会大会. 2013年9月11日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

後藤 芳邦、小川 健司、服部 明、辻本 雅文: "分泌型小胞体アミノペプチダーゼによる Arg 産生を介したマクロファージの NO 産生亢進" 第18回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2013年8月16日 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)

後藤 芳邦、小川 健司、服部 明、辻本 雅文: "小胞体アミノペプチダーゼの分泌を介したマクロファージの NO 産生亢進" 第85回日本生化学会大会. 2012年12月16日 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
“タンパク質分解酵素”を標的とした“クスリ”の可能性に迫る!

<http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/puroteorisisu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 芳邦 (GOTO, Yoshikuni)
帝京平成大学・薬学部・講師
研究者番号: 90455345