

平成21年 6月10日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570183
 研究課題名（和文） SNARE タンパク質によるファゴサイトーシスと抗原提示反応の
 制御機構の解明
 研究課題名（英文） Study on phagocytosis and antigen presentation
 regulated by SNARE proteins
 研究代表者
 初沢 清隆（HATSUZAWA KIYOTAKA）
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：20256655

研究成果の概要：病原体などの異物は、通常私たちの体に侵入してもマクロファージなどの免疫細胞によって処理される。この場合の処理とは、細胞の中に特異的に取り込まれ分解されることを意味する。取り込みは「ファゴサイトーシス」と呼ばれ、またこの際に生じる分解される場所を「ファゴソーム」と呼ぶ。本研究により、ファゴサイトーシスの分子機構およびファゴソーム内での分解に必要な環境を調節する機構の一部が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：生体膜

1. 研究開始当初の背景

生体において樹状細胞やマクロファージなどの食細胞は、外来の病原体や死細胞などをファゴサイトーシスし分解除去する。さらに分解によって生じた異物由来のペプチド断片を主要組織適合抗原複合体（MHC）クラス II あるいはクラス I に結合させ細胞膜へ輸送し、T 細胞へ抗原提示する機能も有する。

ファゴサイトーシスは 0.5 μ m 以上の比較的大きな分子の取り込みであり、細胞にとっては自身の細胞膜だけでは不可能な反応で、内部のオルガネラから膜成分が供給されると考えられる。提唱されているモデルとしては、①エンドソーム・リソソームからの膜成分の供給と②小胞体（ER）からの供給がある。

前者については、細胞膜との融合の詳細な分子機構は不明だが、モデルとしてはコンセンサスを得ている。一方後者は、電子顕微鏡解析やファゴソームのプロテオミクス解析、さらに私たちの SNARE [soluble NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) attachment protein receptor] タンパク質（膜融合装置）の機能的解析により明らかになりつつあるが、「ファゴサイトーシスへの ER の関与は観察できない」という ER 関与に否定的な報告もあり、現在も論争中の課題である。

ER 関与の生理的意義は、ファゴサイトーシスにおける膜成分の供給ばかりでなく、外来抗原を MHC クラス I で抗原提示するクロスプ

レゼンテーションの効率化にも関与する。つまり、形成されたファゴソーム上に存在するER由来の種々の分子装置（MHCクラスI分子群、Sec61やTAPなど）により抗原のプロセッシングをサポートし、実際にMHCクラスIに結合させ細胞膜への輸送を可能にしている。

ファゴサイトーシスに関与するSNAREタンパク質として、エンドソーム局在のVAMP3、リソソーム局在のVAMP7、ER局在のsyntaxin18（以下syx18）がこれまでに明らかになっている。しかし、融合に必要な細胞膜に存在する相手となるSNARE分子やそれぞれの分子の制御機構は不明である。また、ファゴソームからMHCクラスIIあるいはクラスI複合体のファゴソームから細胞膜への輸送に機能するSNAREタンパク質やその分子機構については全くわかっていない。

2. 研究の目的

研究背景に記したファゴサイトーシスと抗原提示反応における課題について、SNAREタンパク質に焦点を当てそれらの膜融合機構を解明することを目的とする。具体的には以下の4つの点について明らかにする。（1）syx18の調節機構を解析し、論争になっているファゴサイトーシスにおけるERの関与を決定付ける。特にER局在SNAREタンパク質の一つSec22bのファゴサイトーシスにおける機能を明らかにし、さらにsyx18との相互作用やリン酸化等のシグナル調節についても解析する。（2）エンドソームやリソソームに局在するVAMP3やVAMP7のマクロファージでの過剰発現株を作製し、ファゴサイトーシスへの影響を明らかにする。（3）SNAREタンパク質の過剰発現細胞を利用し、syx18の細胞膜における融合のパートナー分子を同定する。また、エンドソーム・リソソーム系とER系のSNAREタンパク質が、ファゴサイトーシスにおいてパラレルにあるいはステップワイズに機能するのかを明らかにする。（4）プロセッシングされた抗原はファゴソーム内でMHCクラスIIやクラスIと複合体を形成して細胞膜へ運ばれる。この細胞膜への輸送にはファゴソーム上に局在するSNAREタンパク質が機能することが予想されるので、その分子の同定と調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

（1）ファゴサイトーシスにおける小胞体（ER）局在SNAREタンパク質の機能解明：

予備的実験から蛍光タンパク質（mVenus）付加型Sec22bを過剰発現するマクロファ-

ジ様J774細胞では、syx18の場合とは反対にファゴサイトーシス（ルミノール結合ビーズ）が阻害されていた。この結果を元に、①J774/mVenus-Sec22b細胞を用いて蛍光標識したザイモサン（酵母）の取り込み実験を行い、ファゴソーム形成あるいはファゴソームの成熟過程のどちらに関与するのか明らかにする。②RNA干渉実験で内在性Sec22bの発現を抑制した場合、過剰発現とは逆にファゴサイトーシスが亢進されるのかを調べる。③syx18との関係を明らかにするために、ファゴサイトーシスが亢進しているJ774/mVenus-syx18細胞に赤色蛍光（mCherry）タンパク質を付加したSec22bを発現させた場合の影響を解析する。また同時にSec22bの種々の変異体を作製し、ファゴサイトーシス関与する領域を明らかにする。

（2）エンドソーム・リソソーム局在のSNAREタンパク質のファゴサイトーシスへの関与の検証とパートナー分子の探索：

①ファゴサイトーシスへの関与が報告されているエンドソーム・リソソーム局在SNAREタンパク質、VAMP3とVAMP7について安定発現マクロファージを作製し機能を検証する。また、それぞれについてRNA干渉により発現抑制をした場合のファゴサイトーシスへ与える影響も検証する。②①で作製したそれぞれの安定発現マクロファージからファゴソームを単離し、免疫沈降実験により結合しうる細胞膜局在のSNAREタンパク質の同定を試みる。うまくいった場合は、相互作用の確認とファゴサイトーシスへの影響を検証し機能を明らかにする。

（3）ER局在SNAREタンパク質とエンドソーム・リソソーム局在SNAREタンパク質によるファゴサイトーシス調節機構の総合的な解明：

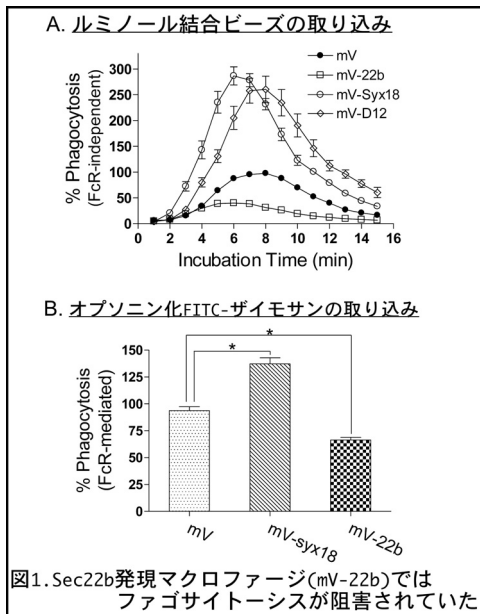
①ファゴソーム形成にER経路とエンドソーム・リソソーム経路がパラレルあるいはステップワイズのどちらで機能しているかを明らかにする。それぞれで機能するSNAREタンパク質を組合せて発現させることによってファゴサイトーシス効率に相乗的な効果が見られるかを検証する。②SNAREタンパク質にはリン酸化・脱リン酸化によってその機能が制御されている場合が知られている。そこで、³²Pによる標識実験によりSec22bのリン酸化状態を調べさらにその部位を同定する。リン酸化部位の変異体を作製しファゴサイトーシスへの影響、syx18やVAMP3、VAMP7との相互作用を明らかにする。

（4）抗原提示に機能するファゴソームの細胞膜への輸送とSNAREタンパク質の関

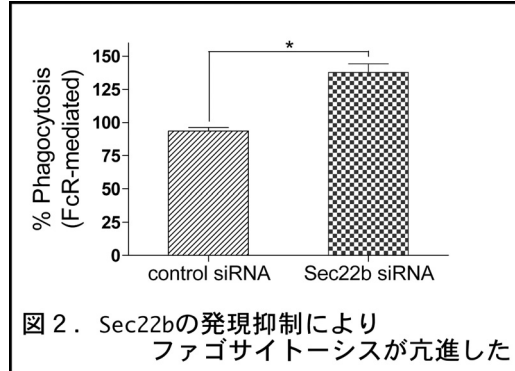
係説明：

① ファゴソーム内で起こるクロスプレゼンテーション反応に注目し、オボアルブミン (OVA: アレルゲン的一种) ペプチドフラグメントの MHC クラス I への結合を指標に抗原提示に機能するファゴソームの解析を試みる。OVA を結合させたビーズを J774 細胞あるいはマウス骨髄細胞から薬剤 (顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) など) 誘導で生じる樹状細胞にファゴサイトーシスさせ、経時的に反応を止めファゴソームを回収し OVA-ペプチドと MHC クラス I との複合体形成を生化学的に調べ最大になる時間を決定する。その時間に免疫染色法 (MHC クラス I に対する抗体など) や蛍光タンパク質付加の MHC クラス I 分子の発現により検出される (抗原提示に機能すると考えられる) ファゴソームあるいは小胞を同定する。ファゴソームに局在する SNARE タンパク質は複数知られているので、それらの抗体あるいは発現系を用いて MHC クラス I 複合体が最大となる時点で局在するものを同定する。ここで残っている SNARE タンパク質が、細胞表面に抗原提示する際に機能する候補と考えられる。② MHC クラス I 抗原提示の場合は、ファゴソームのまま細胞膜と融合するのかファゴソームからできた小胞が融合するのかわかっていない。そこで安定発現系を用いて、MHC クラス I 複合体と同定された SNARE タンパク質の挙動を詳細に観察することにより細胞膜への輸送経路の存在を検証する。さらに、クロスプレゼンテーション反応の解析系を確立し、抗原提示反応における SNARE タンパク質の機能を明らかにする。

4. 研究成果

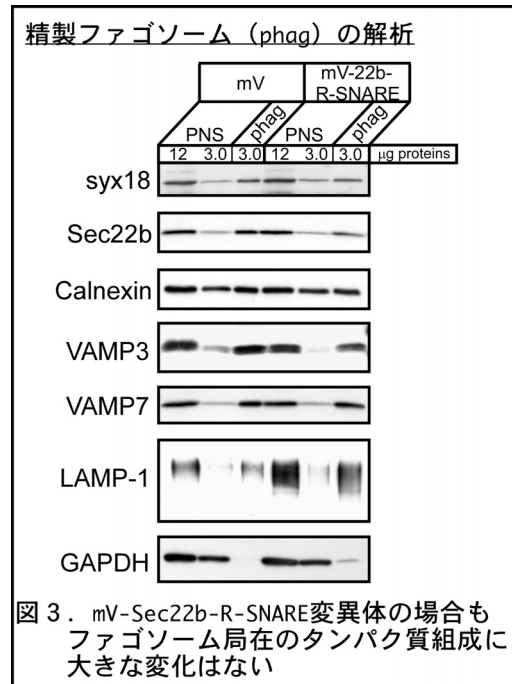


(1) ファゴサイトーシスにおける小胞体 (ER) 局在 SNARE タンパク質の機能解明: Sec22b 過剰発現マクロファージ (J774/mV-Sec22b)では、ルミノール結合ビーズとオプソニン化 FITC 標識ザイモサンの取り込みが阻害されていた (図1)。また、RNA 干渉により内在性の Sec22b 発現を抑制するとファゴサイトーシスは亢進した (図2)。



また免疫沈降実験から Sec22b は syx18 の機能を抑制的に制御している可能性が考えられた。これらの結果は、論争になっているファゴサイトーシスへの ER 関与を強く支持するとともに、Sec22b がファゴサイトーシスを抑制的に制御していることを証明するものである。

(2) ファゴソーム形成における ER とエンドソームの関係について：



Sec22b の変異体の中でファゴサイトーシスの阻害効果が大きいことが確認された J774/mV-Sec22b-R-SNARE 細胞では、その阻害

が ER 経路のみなのかエンドソーム・リソソーム経路へも影響しているのかを精製ファゴソームについて調べた。その結果、後者のマーカータンパク質 (VAMP3 や VAMP7 など) の局在に大きな変化は見られなかった (図 3)。つまり、ファゴソーム形成では ER 経路が上位で機能している可能性が考えられた。実際にはエンドソーム・リソソーム経路での機能が予想される VAMP3 や VAMP7 の安定発現株や Sec22b あるいは syx18 との組み合わせで発現させたマクロファージでの解析が重要だが、研究期間内ではこれらの細胞株は作製できなかった。

(3) ファゴサイトーシスに關与する細胞膜局在の SNARE タンパク質の解析:

ファゴサイトーシスにおいて ER 経路やエンドソーム・リソソーム経路からの膜成分が使われるには細胞膜でその反応を担う SNARE 分子が存在するはずである。いくつかの安定発現株を作製したところ、SNAP-23 の発現細胞 (J774/mV-S23) はルミノール結合ビーズの取り込みが亢進することを見出した (図 4)。

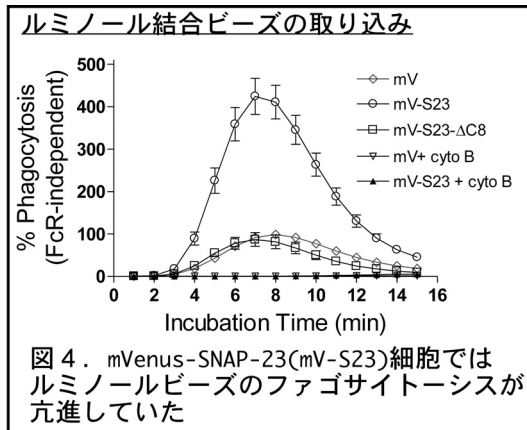


図 4. mVenus-SNAP-23(mV-S23)細胞ではルミノールビーズのファゴサイトーシスが亢進していた

①SNAP-23 のファゴサイトーシスにおける機能解析: 上記細胞株について FITC-ザイモサンを用いて直接の取り込みを調べたところコントロール細胞と大きな違いは見られなかった。しかし、RNA 干渉実験で SNAP-23 の発現を抑制すると FITC-ザイモサンの取り込みは 60%程度まで阻害された (図 5)。これらの結果から、SNAP-23 はファゴサイトーシスに必須だが反応の律速因子ではないことが明らかになった。おそらく定常状態では SNAP-23 はファゴサイトーシス反応に十分量が存在することが予想される。

②SNAP-23 のファゴソーム成熟過程における機能解析: (②-1) J774/mV-S23 細胞では上述のように FITC-ザイモサンの取り込みには影響がなくルミノール結合ビーズの取り込みは亢進している。後者の場合、ファゴソーム内部の活性酸素 (ROS) との反応を検出していることから、SNAP-23 はファゴソーム内の ROS 産生を亢進していると考えられた。

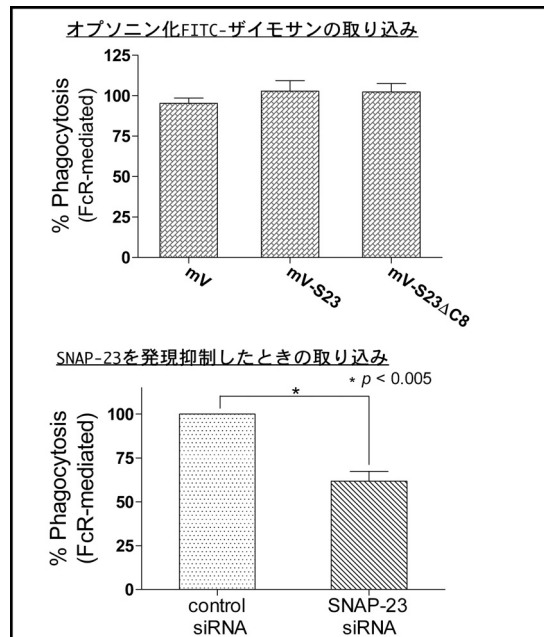


図 5. SNAP-23 の過剰発現ではファゴサイトーシスに影響は見られなかったが、発現抑制では阻害された

ROS はファゴソーム上に NADPH オキシダーゼ複合体が形成されて初めて産生される。恐らく複合体を形成する複数の細胞質因子が小胞輸送によってファゴソームに運ばれる経路が存在し、その過程で SNAP-23 が膜融合に機能している可能性が考えられる。

ファゴソーム内部の環境制御は、抗原提示反応の特異性や効率に大きな影響を与えることから、さらに SNAP-23 の機能解析を行った。

(②-2) ファゴサイトーシスによって取り込まれた異物は、ファゴソームが成熟するにしたがって産生された ROS により殺菌され、獲得した酸性加水分解酵素により分解される。これら酵素が機能するために、ファゴソーム内部の pH は成熟とともに酸性化する。そこで、pH の低下にともない赤色蛍光を発生する指示薬 (pHrodo) を結合させた細菌を用い、J774/mV-S23 細胞でのファゴソーム内部の pH 変化を観察した。コントロール (mV) に比べ

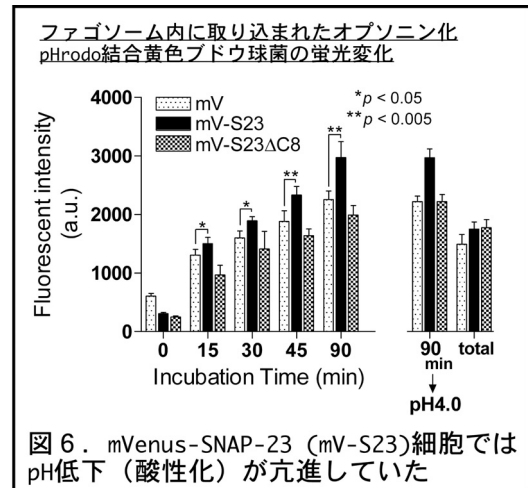


図 6. mVenus-SNAP-23 (mV-S23)細胞では pH 低下 (酸性化) が亢進していた

蛍光強度が高くなったことから、内部の酸性化が亢進していることがわかった (図6)。つまり、酸性化に機能するプロトンポンプのファゴソームへの輸送が mV-S23 によって促進していると考えられた。

以上の結果から細胞膜に局在する SNAP-23 は、ファゴサイトーシスに必須の因子であるばかりでなく、ファゴソーム上ではその成熟過程において内部の種々のオルガネラとのコミュニケーション (膜融合反応) に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。

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1件)

①初沢清隆

[ファゴサイトーシスの分子機構], 蛋白質・核酸・酵素 (共立出版), 53, 2257-2262, 2008, 査読無

[学会発表] (計2件)

①初沢清隆, 櫻井千恵, 橋本裕美, 和田郁夫 [J774 Macrophages Overexpressing LRG-47, an IFN- γ -inducible p47 GTPase, Are Incapable of Phagocytosis], 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月12日, 神戸

②初沢清隆, 橋本裕美, 和田郁夫

「Sec22b, an ER-localized SNARE protein, is a negative regulator of the ER-mediated phagocytosis」, 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月13日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

初沢 清隆 (HATSUZAWA KIYOTAKA)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20256655

(2) 研究分担者 (2007)

和田 郁夫 (WADA IKUO)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40182969

(3) 連携研究者 (2008)

和田 郁夫 (WADA IKUO)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40182969