

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16519

研究課題名(和文) マクロファージにおける生体防御の分子機構：標的物の違いによる膜輸送制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of biological defense in macrophages: Membrane transport control mechanisms dependent on foreign particles

研究代表者

櫻井 千恵 (SAKURAI, Chiye)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：10589724

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)：生体内に侵入した病原微生物などの異物は、マクロファージなどの食細胞により処理される。この一連の反応をファゴサイトーシスという。この過程はSNAREタンパクによる膜融合が繰り返し起こることで進行する。

SNAREタンパクであるSNAP23はファゴサイトーシスに機能することが知られている。生体内に侵入した異物は食細胞表面に発現している異物特異的な受容体により認識されるが、受容体とSNAP23との関係性はわかっていない。本研究では、SNAP23 Ser95のリン酸化状態が各種の異物に応じて異なる機能(促進もしくは抑制)を発揮することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、ファゴサイトーシスにおける異物処理の優位性に関する新たな膜融合経路を示唆するものである。ファゴサイトーシスの異常は感染症や自己免疫疾患につながることから治療薬開発の標的として注目されているにもかかわらず、その分子機構はよくわかっていない。本研究はファゴサイトーシス機能を制御する分子標的薬開発のための新たなアプローチを提示する。

研究成果の概要(英文)：Foreign particles that invade the body are processed by phagocytic cells such as macrophages. This reaction is called phagocytosis. This process is carried out by repeated membrane fusion by SNARE proteins.

SNAP23, a SNARE protein, is known to function in phagocytosis. Foreign particles that enter the body are recognized by foreign-specific receptors expressed on the surface of phagocytes, however, the relationship between the receptors and SNAP23 is not known. In this study, we found that the phosphorylation of SNAP23 Ser95 exhibits different functions (promotion or inhibition) depending on various foreign particles.

研究分野：細胞生物学

キーワード：メンブレントラフィック SNAREタンパク ファゴサイトーシス ファゴソーム リン酸化 受容体

1. 研究開始当初の背景

人体は、自身の細胞や組織以外の異物を排除し、生体に危害を加えるものから防御する免疫機能を有している。この生体防御においては、マクロファージなどの食細胞が活躍する。食細胞は体内に侵入した異物を貪食し、殺菌・分解によって代謝、また一部のペプチドを T 細胞へ抗原提示する。この一連の反応をファゴサイトーシスという。異物の貪食により形成される小胞はファゴソームと呼ばれ、ファゴサイトーシスは、ファゴソーム形成(異物の貪食)とファゴソーム成熟(異物の殺菌・分解)の二段階から成る。これらの反応はエンドソームやライソソームなどの細胞小器官との融合を繰り返すことで進行するため、反応の遂行には膜融合が必須である。

この膜融合を担うのが SNARE タンパクである。SNARE タンパクは融合する二つの膜上それぞれに存在し、各々が適切な組合せで複合体を形成することで膜融合を完遂する。これまでに私たちは、細胞膜局在 SNARE タンパク SNAP23 がファゴソームの形成と成熟に機能することを報告した。さらに SNAP23 の機能は 95 番目の Ser 残基(Ser95)のリン酸化により制御されることを明らかにした。

食細胞表面には、種々の異物を認識する特異的受容体が発現している。各受容体からのシグナル系はそれぞれに特徴的なファゴソーム形成と成熟に機能する。しかしながら、受容体下流でそれらの特徴を発現するために SNARE タンパクがどんな調節を受けるか、またその調節分子などはわかっていない。本研究は異物応答の新たな機序として、SNAP23 のリン酸化が受容体依存的なファゴサイトーシスの切替えスイッチであるかを明らかにするものである。

2. 研究の目的

SNAP23 は、リン酸化の有無によって融合する細胞小器官(複合体を形成するパートナー SNARE タンパク)を選別し、これにより異物に対する反応の特異性を生み出していると考えられた。そこで本研究では SNAP23 について、ファゴサイトーシス時の膜融合反応における受容体に依存した機能と、リン酸化修飾によるその制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ファゴソーム形成過程の解析

蛍光タンパク mVenus を付加した野生型 SNAP23(mV-S23 WT)に対し、Ser95 をアラニン残基(mV-S23 S95A:非リン酸化型)やアスパラギン酸残基(mV-S23 S95D:疑似リン酸化型)に置換した変異体を安定的に発現するマウスマクロファージ様細胞株 J774 を樹立した(J774/mV-S23 S95A、J774/mV-S23 S95D)。これらの細胞に酵母や大腸菌を与え、ファゴソーム形成効率を測定した。

(2) ファゴソーム成熟過程の解析

ファゴソームはその成熟過程において、ライソソームと融合する。上述の細胞に対して各種の異物を与え形成させたファゴソームについて、ライソソームとの融合効率を測定することでファゴソームの成熟化効率を調べた。

(3) SNAP23 と複合体を形成する SNARE タンパクの同定

膜融合反応は、二つの膜上の SNARE タンパクが適切なタイミング・組合せで複合体を形成することで達成される。SNAP23 は複数の膜融合に関与することから、各融合過程においてパートナー SNARE 分子を変えると予想され、この変化は受容体依存的なリン酸化の有無によってより顕著になると考えられる。パートナー分子同定のため、上述の細胞に対して各受容体特異的な異物を与え、その細胞抽出液を調製し免疫沈降実験を行うことで相互作用する分子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) ファゴソーム形成過程の解析

樹立した J774/mV-S23 S95A、J774/mV-S23 S95D に対し、免疫グロブリン IgG でオプソニン化した酵母 zymosan(IgG-zymosan)を与えた。このとき、IgG-zymosan は Texas Red(赤色蛍光)で標識して用いた。貪食 60 分後の蛍光強度を測定することで Fc 受容体依存的なファゴソーム形成効率を定量した。その結果、mVenus を発現させたコントロール細胞(J774/mV)に比べ、J774/mV-S23 WT と J774/mV-S23 S95A ではその効率が同程度亢進していた(図 1A)。

次に、オプソニン化せずに zymosan を与えた場合について調べた。このとき、zymosan は Toll 様受容体 2/Dectin-1 により認識される。非オプソニン化 zymosan では、J774/mV-S23 WT と J774/mV-S23 S95D においてファゴソーム形成効率の亢進が見られた(図 1B)。

大腸菌は、Toll 様受容体 4 により認識される。赤色蛍光タンパク mCherry を発現する大腸菌を標的物として用いることで Toll 様受容体 4 を介したファゴソーム形成について調べた。その結果、J774/mV-S23 S95D は J774/mV-S23 WT 同様に効率が促進した一方で、J774/mV-S23 S95A はコントロール細胞と差がなかった(図 1C)。

以上まとめると、ファゴソーム形成過程において Ser95 がリン酸化修飾を受けた SNAP23 は IgG-zymosan に対しては抑制的に、反対に非オプソニン化 zymosan や大腸菌に対しては促進的に機能することがわかった。

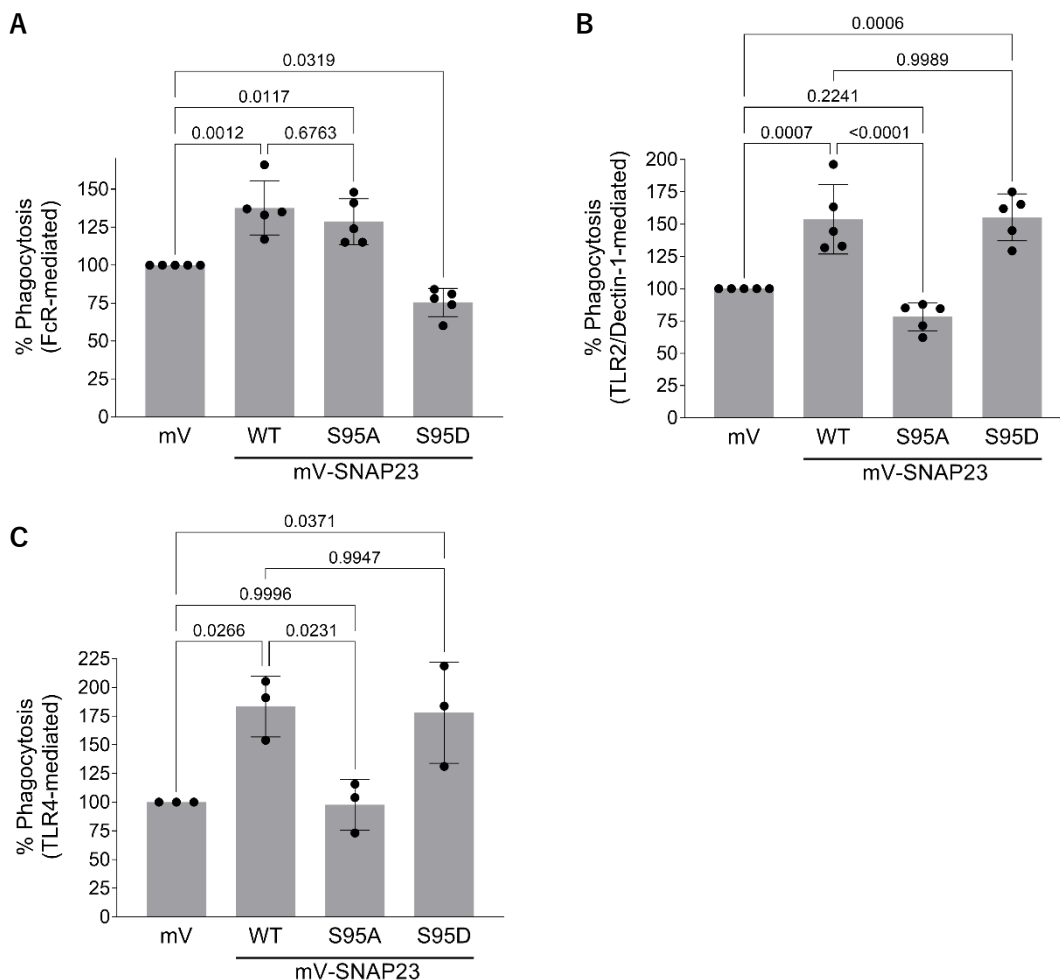


図 1 ファゴソーム形成効率

(A) IgG-zymosan (Fc 受容体). (B) zymosan (Toll 様受容体 2/Dectin-1). (C) 大腸菌 (Toll 様受容体 4).

(2) ファゴソーム成熟過程の解析

(1)の解析で用いた各分子を発現する J774 に対して、Rhodamine B(赤色蛍光)結合デキストランを用いることでライゾソームを標識した。これに IgG でオプソニン化したラテックスビーズ(IgG-ビーズ)を与え Fc 受容体依存的にファゴソームを形成させた。ファゴソームは成熟の過程でライゾソームと融合するため、成熟化が進んだファゴソームは赤色蛍光で示される。貪食 15 分後のファゴソームについて赤色蛍光で標識されたファゴソームの割合を調べ、これを成熟化効率とした。その結果、J774/mV-S23 WT や J774/mV-S23 S95A ではコントロール細胞よりも成熟化が進んでいた(図 2A)。同様の実験をオプソニン化していない zymosan で行ったところ、J774/mV-S23 S95D は J774/mV-S23 WT と同程度に亢進しており、一方で J774/mV-S23 S95A では IgG-ビーズで見られたような亢進はなかった(図 2B)。以上から、ファゴソーム成熟化における受容体と SNAP23 Ser95 の相関関係が示唆された。

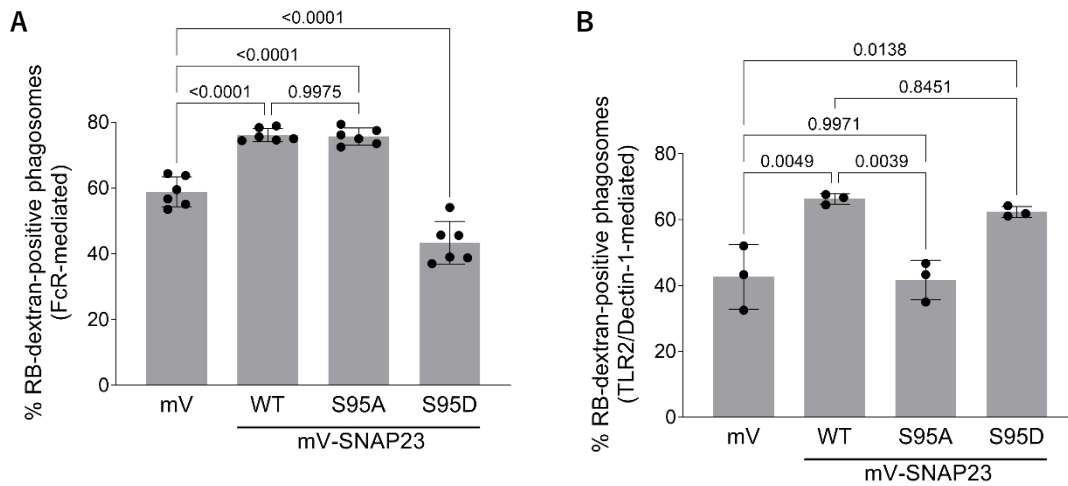


図2 ファゴソーム成熟化効率
(A) IgG-ビーズ (Fc 受容体). (B) zymosan (Toll 様受容体 2/Dectin-1).

(3) SNAP23 と複合体を形成する SNARE タンパクの同定

SNAP23 は、細胞膜とファゴソーム膜上に局在する。ファゴソーム形成過程においては小胞体やエンドソームに局在する SNARE タンパクと、成熟の過程ではエンドソームやライゾソームに局在する SNARE タンパクと複合体を形成することで膜融合を引き起こし、ファゴサイトーシス進行を制御している。ここまでの解析結果から、SNAP23 は機能する受容体に依存してリン酸化修飾の有無を含めた異なる経路を使い分けると予想された。つまり、標的物の種類に応じて複合体を形成するパートナーSNARE タンパクも異なると考えられた。ファゴサイトーシス時に SNAP23 と複合体を形成する分子を同定するため、野生型 SNAP23 や Ser95 点変異を発現する J774 に対して各種の標的物を与えることでファゴサイトーシスを促し、その細胞抽出液を調製して免疫沈降実験を行った。これにより、受容体依存的、また Ser95 リン酸化依存的に SNAP23 と結合する分子の同定を試みたが、有意な差は見られなかった。そのため、今回の実験からはパートナーSNARE タンパクの同定はできなかった。

以上から、SNAP23 は受容体依存的にリン酸化状態を変化させることで異なる経路で使い分けられると考えられた。このことは、SNAP23 のリン酸化状態が、ファゴサイトーシスにおいて種類の異なる異物に対する処理の優位性を生み出す機構である可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kono Yusuke, Saito Hiroaki, Miyauchi Wataru, Shimizu Shota, Murakami Yuki, Shishido Yuji, Miyatani Kozo, Matsunaga Tomoyuki, Fukumoto Yoji, Nakayama Yuji, Sakurai Chiye, Hatsuzawa Kiyotaka, Fujiwara Yoshiyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Increased PD-1-positive macrophages in the tissue of gastric cancer are closely associated with poor prognosis in gastric cancer patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-6629-6	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 Morita Maya, Kajiye Mayu, Sakurai Chiye, Kubo Shuichi, Takahashi Miki, Kinoshita Daiki, Hori Naohiro, Hatsuzawa Kiyotaka	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 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
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 Hatsuzawa Kiyotaka, Sakurai Chiye	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 Medica	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 無
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 Kinoshita Daiki, Sakurai Chiye, Morita Maya, Tsunematsu Masashi, Hori Naohiro, Hatsuzawa Kiyotaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Syntaxin 11 regulates the stimulus-dependent transport of Toll-like receptor 4 to the plasma membrane by cooperating with SNAP-23 in macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E18-10-0653	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 初沢清隆、梶江真由、高橋美紀、森田真矢、櫻井千恵
2. 発表標題 Partial cleavage of MORN2, a LAP(LC3-associated phagocytosis)-related factor, is regulated by the ubiquitinproteasome system in macrophages
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 The role of phosphorylation of SNAP-23 at Ser95 in an immunoreceptor-dependent manner during phagocytosis
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 櫻井千恵、東健人、山下菜摘、初沢清隆
2. 発表標題 VAMP5 regulates phagosome formation in an immunoreceptor-dependent manner
3. 学会等名 日本蛋白質科学会 / 日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田真矢, 櫻井千恵, 初沢清隆
2. 発表標題 SNAP-23 is involved in MORN2-dependent LC3-associated phagocytosis
3. 学会等名 日本蛋白質科学会/日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下大生, 森田真矢, 常松真史, 櫻井千恵, 初沢清隆
2. 発表標題 Syntaxin11 regulates the toll-like receptor 4 trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane in LPS-stimulated macrophages
3. 学会等名 日本蛋白質科学会/日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学医学部ホームページ https://www.med.tottori-u.ac.jp/
--

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
---------	---------