

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～ 2009
 課題番号：20770158
 研究課題名（和文） 自己炎症性疾患の原因タンパク質である PSTPIP2 の細胞運動における役割
 研究課題名（英文） Role of PSTPIP2, an autoinflammatory disorder-associated protein, in cell migration
 研究代表者
 辻田 和也 (Tsujita Kazuya)
 神戸大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：10457054

研究成果の概要（和文）：

PSTPIP2 がファゴサイトーシスを負に制御するタンパク質であることを明らかにした。PSTPIP2 はファゴサイトーシスの際、未熟なアクチンカップに局在し、その部位でアクチン重合を抑えることによりファゴサイトーシスを制御していることが示唆された。また PSTPIP2 の未熟なカップへの局在は PSTPIP2 の脂質結合能に依存的であった。また PSTPIP2 はファゴサイトーシスの際にチロシンリン酸化されそのリン酸化によりカップからはずれることが分かった。この結果、PSTPIP2 はファゴサイトーシスのネガティブレギュレーターであり、その活性はチロシンのリン酸化により制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

It was shown that PSTPIP2 is a negative regulator of phagocytosis. It is suggested that PSTPIP2 is localized to the nascent cup, where it suppress the robust actin polymerization. The localization of PSTPIP2 to the nascent cup is dependent on its lipid binding ability. In addition, PSTPIP2 is tyrosine phosphorylated following phagocytosis and its phosphorylation dissociates it from the nascent cup. Thus, PSTPIP2 is the novel negative regulator of phagocytosis though inhibiting phagocytic cup formation that is controlled by its tyrosine phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	950,000	4,160,000

研究分野：生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：細胞骨格、細胞内シグナル伝達ファゴサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、自己免疫性疾患とは異なる炎症性疾患が報告され自己炎症性疾患と命名された。自己免疫性疾患は自己抗原や自己反応性 T リンパ球に起因する炎症性疾患であるが、自己炎症性疾患はこれらに起因しない炎症性疾患であり生来 (innate) の免疫システムの異常が原因であると考えられている。本疾患においては、炎症患部へのマクロファージや好中球の異常な浸潤が認められるが、その発症メカニズムは全く不明である。ここで近年 PSTPIP2 が本疾患に関わる遺伝子として同定された。PSTPIP2 は PCH タンパク質と呼ばれるファミリーに属し機能不明なタンパク質である。PCH タンパク質は細胞運動、細胞分裂、エンドサイトーシスなどのアクチン細胞骨格が関与する細胞の基本的な機能に関与すると考えられている。よって PSTPIP2 がマクロファージにおける細胞運動やファゴサイトーシス等のアクチン細胞骨格を介する機能を制御していることが示唆され、その不明である制御機構が破綻することにより自己炎症性疾患を引き起こすのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

自己炎症性疾患の発症メカニズムは不明である。第一の目的は自己炎症疾患の発症メカニズムの一つを明らかにすることである。本疾患の原因タンパク質である PSTPIP2 の変異によりマクロファージの患部への過剰な浸潤や炎症がみられることから、PSTPIP2 がどのようにして細胞の運動やファゴサイトーシスを制御するのかを明らかにし、その炎症との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) まず今後の実験のために PSTPIP2 に特異的な抗体を作成する。そして運動、浸潤しているマクロファージや好中球における内在性の PSTPIP2 の細胞内局在を調べる。そして GFP などの蛍光タンパク質のタグを付けた PSTPIP2 を作製し、運動やファゴサイトーシスしているマクロファージの細胞内局在をライブで観察し、解析する。また自己炎症性疾患の患者で報告されている点変異体を作成し、細胞内局在を調べ、野生型と比較検討する。

(2) PSTPIP2 の EFC ドメインは人工リポソームに直接結合しリポソームをチューブ状に変形することが分かっている。そこで患者で報告されている変異体のリコンビナントタンパク質を作製、精製し、変異体タンパク質が人工リポソームに直接結合するか、またリポソームを変形することができるか、を調べる。

(3) PSTPIP2 はチロシンリン酸化されるタンパク質であると示唆されている。よって細胞運動やファゴサイトーシスの際にリン酸化されるか調べる。またそのリン酸化が PSTPIP2 の機能にどう影響するか調べる

(4) マクロファージの細胞運動、浸潤における PSTPIP2 の役割を明らかにする。方法は PSTPIP2 をマクロファージに強発現させ、細胞の運動能、ファゴサイトーシス能に影響があるか調べる。さらに RNAi 法により内在性の PSTPIP2 タンパク質をノックダウンしてやることで、マクロファージの細胞運動、ファゴサイトーシスに及ぼす影響を調べる。

(5) RNAi 法で得られた知見を元に、細胞運動やファゴサイトーシスにおける PSTPIP2 の機

能をより詳細に解析する。例えば、PSTPIP2をノックダウンした細胞に野生型のPSTPIP2を発現させて機能が回復するか調べる。またリン脂質に結合できない変異体や、リン酸化がおこらない変異体を作製し、PSTPIP2をノックダウンした細胞に発現させて野生型と比較し検討することで、細胞運動やファゴサイトーシスをどのように制御しているか詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) ウェスタンブロット法により、PSTPIP2に特異的な抗体が得られたことを確認した。またこれらの抗体はタイターが高く、内在性のタンパク質を検出できた。

(2) PSTPIP2を細胞に発現させると、細胞膜でアクチンと共局在することが分かった。これらのタンパク質の機能は細胞膜上のアクチン細胞骨格に関与することが示唆された。

(3) PSTPIP1, 2のリコンビナントタンパク質を精製し、リポソーム共沈法により膜結合能を検討したところ、これらのタンパク質は直接膜に結合することが分かった。さらに膜変形作用があることを確認した。

(4) 内在性のPSTPIP2をノックダウンし、マクロファージの細胞運動、浸潤能に影響があるかどうか調べたが、顕著な差は確認できなかった。そこでマクロファージのファゴサイトーシスにおける影響を調べた。その結果PSTPIP2をノックダウンしたとき、ファゴサイトーシスが非常に亢進していることが分かった。

(5) PSTPIP2をノックダウンするとファゴサイトーシスが亢進することが明らかとなったので、その分子メカニズムを解析した。PSTPIP2はファゴサイトーシスの際、未熟なphagocytic cupのみに局在することから、cup形成におけるアクチン重合を負に制御していることが示唆された。

(6) マクロファージにファゴサイトーシスを誘導するとPSTPIP2のチロシン残基がリン酸化されることが分かった。またそのリン酸化はSrcファミリーに依存することが明らかと

なった。またそのリン酸化はPSTPIP2の脂質結合能を負に制御し、細胞内において細胞膜から解離させることが明らかとなった。さらにcup形成時においてPSTPIP2はリン酸化されることにより、未熟なcupから解離することが分かった。

(7) PSTPIP2のリン酸化を阻害する変異体を作製し、細胞内局在を野生型と比較したところ、変異体のcupへの局在が増えていることが分かり、PSTPIP2はリン酸化によって細胞膜から解離することが示唆された。

(8) PSTPIP2をノックダウンしたマクロファージに野生型、各種変異体（脂質に結合できない変異体、リン酸化されない変異体、リン酸化状態をミミックした変異体）を発現させレスキュー実験を行った。その結果PSTPIP2がファゴサイトーシスを負に制御するためには脂質に結合してcupに局在すること、またそのリン酸化はPSTPIP2を細胞膜から解離させ、ファゴサイトーシスを誘導するために必要であることが示唆された。

(9) PSTPIP2はチロシンホスファターゼであるPTP-PESTファミリーに結合することが分かっているがその役割は不明である。そこでPTP-PESTに結合できない変異体は作製し、レスキュー実験を行ったところ、PSTPIP2とPTP-PESTの結合はファゴサイトーシスを負に制御するために重要であることが分かった。

以上の結果よりPSTPIP2がファゴサイトーシスを負に制御するメカニズムの一端を解明することができた。上記に示したとおり、PSTPIP2は自己炎症性疾患に関与するタンパク質である。ファゴサイトーシスは炎症反応に密接に関与していることが知られており、過剰なファゴサイトーシスの活性化は異常な免疫応答を誘導することも知られている。本疾患の発症メカニズムは不明であったが、本研究によりPSTPIP2はファゴサイトーシスを負に制御する分子機構の一端が明らかとなり、自己炎症性疾患の原因の一つはファゴサイトーシスの亢進であ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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻田 和也 (Tsujiita Kazuya)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10457054