

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860218

研究課題名(和文) SNAP-23のリン酸化によるファゴソーム成熟の制御機構解明

研究課題名(英文) Analyses of the regulatory mechanism in phagosome maturation by phosphorylation of SNAP-23

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)：ファゴサイトーシスとは食細胞に特徴的な生体防御反応の一つであり、病原微生物などをファゴソームとして取り囲むことで隔離し、殺菌・分解する。この反応はファゴソームの形成(異物の取り込み)と成熟から成り、複雑な膜融合反応を伴って進行する。

膜融合装置であるSNAREタンパクの一つSNAP-23はファゴソームの形成や成熟に機能するが、その制御機構は不明である。本研究では、SNAP-23 Ser95のリン酸化によりファゴソームの形成・成熟が抑制されることを明らかにした。また、IKK2がファゴソーム膜上SNAP-23リン酸化酵素の一つとして機能することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Phagocytosis is the one of biological defense mechanisms that are characteristic of phagocytes such as dendritic cells and macrophages, and a reaction to isolate pathogens by surrounding them as phagosomes to sterilize and digest them. Phagocytic processing is composed of phagosome formation (uptake activity) and maturation, and known to go along by a series of complicated membrane fusion of intracellular organelles.

SNAP-23, a plasma membrane-localized SNARE protein which operates membrane fusion events, is involved in phagosome formation and maturation, however, the regulatory mechanism remains totally obscure. In this study, we showed that phagocytosis efficiency is decreased by phosphorylation of SNAP-23 at Ser95 in macrophages. Further, we found that IKK2 is the one of phosphorylation kinases of SNAP-23 at Ser95 on phagosome membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：SNAREタンパク 膜融合 ファゴサイトーシス ファゴソーム マクロファージ リン酸化

1. 研究開始当初の背景

白血球の一種であるマクロファージや樹状細胞といった食細胞は、生体防御の最前線で活躍する。これらの細胞に特徴的なファゴサイトーシスとは、生体内に侵入した病原微生物などをファゴソームとして細胞内に取り込み（ファゴソーム形成）殺菌・分解によって代謝する（ファゴソーム成熟）反応である。この反応は細胞内オルガネラとの融合を繰り返すことで進行するが、その膜融合機構についてはほとんどわかっていない。

私たちはこれまで、膜融合に直接的に機能する SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) タンパクである SNAP-23 (細胞膜局在) が、ファゴソーム形成・成熟の両過程に機能することを報告した。しかしながら、その制御機構は未解明である。その一方で、プロテオーム解析により、ファゴソーム上にはリン酸化された SNAP-23 が存在することが報告されている。これらのことから、SNAP-23 のリン酸化修飾とファゴソーム成熟とは何らかの関係性があると考えられた。

2. 研究の目的

ファゴサイトーシスは細胞内オルガネラとの融合が連続的に順序よく起こることで進行する。これまでの研究から、SNAP-23 は一連のファゴサイトーシス過程において複数のステップで機能することが明らかとなったが、どのように制御されているかはわかっていない。しかし、ファゴソーム上にリン酸化修飾された SNAP-23 が存在することが示されたことから、SNAP-23 の機能はリン酸化により制御されていると予想された。

そこで本研究では、SNAP-23 のリン酸化によるファゴソーム成熟の制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ファゴソーム形成・成熟過程の解析

SNAP-23 はファゴサイトーシスにおいて多段階で機能する。この調節機構を解明するため、私たちは種間で保存される Ser95 のリン酸化に着目した。mVenus を付加した野生型 SNAP-23 (mV-S23) 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発現するマウスマクロファージ様細胞株 J774 (J774/mV-S23 S95A、J774/mV-S23 S95D) を樹立した。これらの細胞に IgG でオプソニン化した異物を与え、ファゴソーム形成効率および成熟化効率を解析した。

(2) SNARE タンパクとの相互作用の解析

SNARE タンパクが膜融合装置として機能するためには、複数の SNARE タンパクが適切な組合せで複合体を形成する必要がある。mV-S23 S95A や mV-S23 S95D と特異的に相

互作用する SNARE タンパクを調べるため、(1) で樹立した細胞株から調製した細胞抽出液を用いて免疫沈降実験を行った。

(3) SNAP-23 の構造変化に関する解析

私たちはこれまで、SNAP-23 の分子内 FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) プローブを作製し、SNAP-23 の構造変化についてモニターしてきた。このプローブは closed form を形成すると FRET シグナルの上昇が見られる。そこで、このプローブにリン酸化変異を導入し細胞膜上の FRET シグナルを解析した。

(4) ファゴソーム上 SNAP-23 のリン酸化酵素に関する解析

次に、SNAP-23 のリン酸化酵素同定を試みた。私たちは、SNAP-23 のリン酸化酵素として報告のある IKK2 (I κ B kinase 2) に着目した。SNAP-23 の FRET プローブと IKK2 を共発現した場合のファゴソーム上の FRET シグナルを解析し、SNAP-23 の構造変化について調べた。

(5) SNAP-23 のリン酸化と IFN- γ 刺激におけるファゴソーム成熟化の抑制との関係性についての解析

インターフェロン γ (IFN- γ) 刺激したマクロファージでは、ファゴソームの成熟化が抑制されることが知られている。この抑制が SNAP-23 Ser95 のリン酸化依存的に起きているかを検討した。そのため、IFN- γ 刺激時のファゴソーム膜上の FRET シグナルを解析し、Ser95 依存的なシグナル上昇が見られるかを調べた。また、IKK2 阻害剤の存在下での FRET シグナルを解析した。

4. 研究成果

(1) ファゴソーム形成・成熟過程の解析 ファゴソーム形成過程の解析

J774/mV-S23 S95A、J774/mV-S23 S95D について IgG-オプソニン化ゼイモサンの取り込み量を調べた。mVenus を発現させたコントロール細胞 (J774/mV) に比べ、J774/mV-S23 と J774/mV-S23 S95A ではその効率は同程度亢進していたが、J774/mV-S23 S95D では有意に低下していた (図 1)。

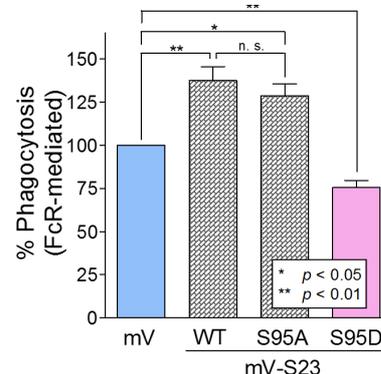


図 1 ファゴソーム形成効率

ファゴソーム成熟過程の解析

Rhodamine B (赤色蛍光) 結合デキストランでライソゾームを標識したマクロファージについて、IgG でオプソニン化したラテックスビーズを細胞に与え、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ソゾ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。取り込みから 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た。その結果、J774/mV-S23 S95D では赤色蛍光で標識されたファゴソームの割合が低下していた(図 2)。このことは、J774/mV-S23 S95D ではファゴソームとライソゾームの融合、つまりファゴソームの成熟化が低下したことを意味する。

これらの結果から、SNAP-23 Ser95 のリン酸化によって、ファゴソームの形成・成熟化効率は低下すると考えられる。

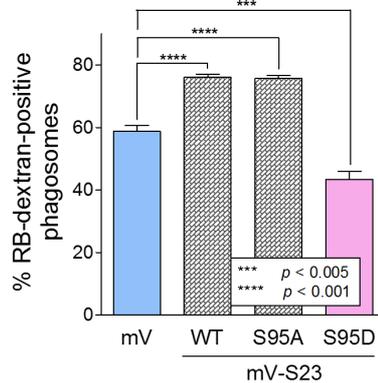


図 2 ファゴソーム成熟化効率

(2) SNARE タンパクとの相互作用の解析

SNAP-23 S95A もしくは SNAP-23 S95D と特異的に相互作用する SNARE タンパクを調べるため、樹立した細胞株から細胞抽出液を調製し免疫沈降実験を行った。その結果、変異体間で相互作用の変化は見られなかった。これは、何らかの刺激(ファゴソームを形成させるなど)を与えない状態では、他の SNARE タンパクとの相互作用に変化が現れない可能性が考えられる。

(3) SNAP-23 の構造変化に関する解析

私たちが作製した SNAP-23 の FRET プロローブは、分子内の 2 か所の SNARE モチーフそれぞれの N 末端側に TagGFP と TagRFP を挿入したものである。これをマクロファージに発現させ、458 nm 励起による 505 nm (TagGFP) と 580 nm (TagRFP) の蛍光強度比を FRET 効率とした。

今回、SNAP-23 の分子内 FRET プロローブにリン酸化変異を導入し細胞膜上の FRET シグナルを解析したところ、定常状態において S95A 変異体では見られない FRET シグナルの上昇が S95D 変異体で観察された(図 3)。おそらく、Ser95 のリン酸化によって SNAP-23 の closed form 形成が亢進している

と考えられる。また、内在性 SNAP-23 の Ser95 がリン酸化されるホルボールエステル (PMA) 処理細胞でも S95D 変異体と同様の結果が得られた。

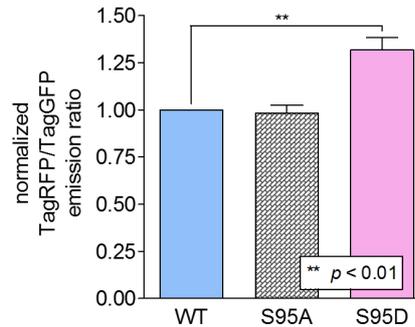


図 3 細胞膜上の FRET 解析

(4) ファゴソーム上 SNAP-23 のリン酸化酵素に関する解析

SNAP-23 の分子内 FRET 解析

IKK2 は、マスト細胞のエキソサイトーシスにおいて SNAP-23 Ser95 をリン酸化することが報告された酵素である。マクロファージにおいても IKK2 が SNAP-23 Ser95 のリン酸化酵素として機能するかを検討した。

マクロファージに FRET プロローブと IKK2 を共発現し、Fc 受容体依存的に形成させたファゴソーム上の FRET シグナルを計測したところ、野生型でシグナルの上昇が観察された。一方、S95A 変異体のプロローブではこのようなシグナル上昇が見られなかったことから、IKK2 により野生型の Ser95 がリン酸化され closed form を形成していると考えられる(図 4)。また、IKK2 の阻害剤である SC-514 の影響を調べたところ、SC-514 の濃度依存的に FRET シグナルは抑制された。これらの結果から、IKK2 がファゴソーム膜上 SNAP-23 Ser95 のリン酸化酵素の 1 つとして機能すると考えられる。

いずれのプロローブも、細胞膜上では IKK2 との共発現による FRET シグナルの上昇は観察されなかった。このことは、細胞膜上 SNAP-23 Ser95 のリン酸化には IKK2 以外の酵素が機能する可能性を示唆している。

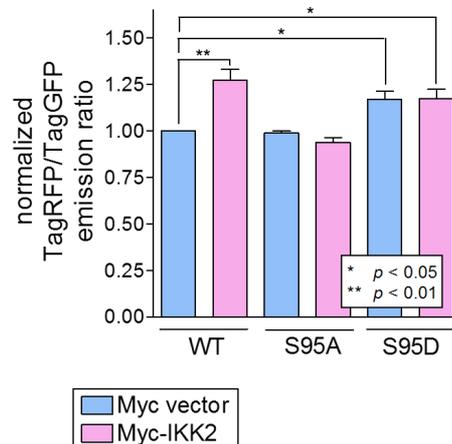


図 4 ファゴソーム上の FRET 解析

ファゴソーム成熟過程の解析

IKK2 との共発現によりファゴソーム膜上 SNAP-23 の構造変化が観察されたため、次に IKK2 がファゴソームの成熟に及ぼす影響について調べた。解析には、これまでの解析と同様に Rhodamine B 結合デキストランを用い、Fc 受容体依存的に形成させたファゴソームとライソソームとの融合効率を調べた。

その結果、IKK2 を過剰発現したマクロファージではファゴソームとライソソームとの融合効率が低下した(図5)。このことから、IKK2 依存的な SNAP-23 Ser95 のリン酸化によりファゴソーム成熟化の抑制が起こると考えられる。

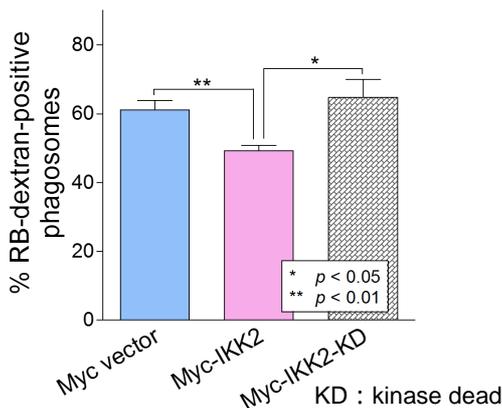


図5 ファゴソーム成熟化効率

- (5) SNAP-23 のリン酸化と IFN- γ 刺激におけるファゴソーム成熟化の抑制との関係性についての解析

続いて生理的条件下での SNAP-23 のリン酸化について検証するため、IFN- γ を用いた。IFN- γ 刺激したマクロファージでは、ファゴソームの成熟化が抑制されることが知られている。そこで、IFN- γ 刺激時のファゴソーム膜状の FRET シグナルを解析したところ、Ser95 依存的なシグナルの上昇が見られた(図6)。

また、IFN- γ 刺激時に抑制されるファゴソームの成熟は、IKK2 阻害剤である SC-514 の存在下で回復した。

これらの結果から、IFN- γ 刺激したマクロファージにおいても、IKK2 の活性依存的に SNAP-23 Ser95 がリン酸化されファゴソーム成熟化の抑制が起こると考えられる。

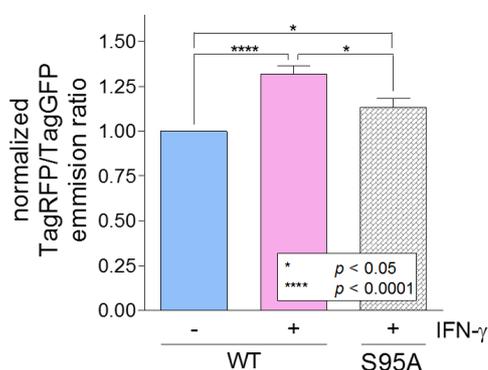


図6 ファゴソーム成熟化効率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) Maya Morita, Kazumasa Sawaki, Daiki Kinoshita, Chiye Sakurai, Naohiro Hori, Kiyotaka Hatsuzawa. Quantitative analysis of phagosome formation and maturation using an *Escherichia coli* probe expressing a tandem fluorescent protein. *J Biochem*. 2017. [査読有]
DOI: 10.1093/jb/mvx034

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 木下大生, 森田真矢, 櫻井千恵, 初沢清隆, Syntaxin 11 はマクロファージの活性化に伴う Toll 様受容体の細胞膜輸送に機能する、第 58 回 日本生化学会中国・四国支部例会、2017 年 5 月 21 日、サンポートホール高松(香川県高松市)
- (2) 森田真矢, 澤木和将, 木下大生, 櫻井千恵, 初沢清隆、大腸菌プローブを用いたファゴソーム形成と成熟化の解析、第 58 回 日本生化学会中国・四国支部例会、2017 年 5 月 21 日、サンポートホール高松(香川県高松市)
- (3) 櫻井千恵, 和田郁夫, 初沢清隆、Ser95 phosphorylation of SNAP-23 by I κ B kinase 2 causes a decrease in phagosome maturation during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophage、第 89 回 日本生化学会大会、2016 年 9 月 27 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)
- (4) 木下大生, 森田真矢, 櫻井千恵, 初沢清隆、Syntaxin11 は toll 様受容体 4 の細胞膜局在化に参与する、第 38 回 日本分子生物学会年会・第 88 回 日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- (5) 櫻井千恵, 和田郁夫, 初沢清隆、Ser95 phosphorylation of SNAP-23 by I κ B kinase 2 regulates the process of phagocytosis in macrophages、第 38 回 日本分子生物学会年会・第 88 回 日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- (6) 木下大生, 森田真矢, 櫻井千恵, 初沢清隆、Syntaxin11 のマクロファージにおける新規機能、第 67 回 日本細胞生物学会大会、2015 年 6 月 30 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
- (7) 櫻井千恵, 初沢清隆, 和田郁夫、Ser95 phosphorylation of SNAP-23 negatively regulates the process of phagocytosis、第 66 回 日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 12 日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

- (8) 國府田絹子, 神谷真子, 櫻井千恵, 浅沼大祐, 和田郁夫, 浦野泰照、生細胞における酸性小胞の pH 測定が可能な蛍光寿命イメージングプローブの開発、日本薬学会 第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本大学 (熊本県熊本市)
- (9) 櫻井千恵, 初沢清隆, 和田郁夫、Ser95 phosphorylation of SNAP-23 causes a decrease in phagocytosis、第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 初沢清隆, 櫻井千恵、ファゴソームの形成と成熟の分子機構、細胞工学 (学研メディカル秀潤社)、2015、34(2): 155-160

6 . 研究組織

(1) 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