

令和 2年 9月

森田真矢 学位論文審査要旨

主 査 常世田 好 司

副主査 二 宮 治 明

同 初 沢 清 隆

主論文

Characterization of MORN2 stability and regulatory function in LC3-associated phagocytosis in macrophages

(マクロファージにおけるMORN2の安定性とLC3-associated phagocytosisの調節機能の解析)

(著者：森田真矢、梶江真由、櫻井千恵、久保修一、高橋美紀、木下大生、堀直裕、初沢清隆)

令和 2年 Biology Open 9巻 bio051029頁 DOI:10.1242/bio.051029

参考論文

1. Quantitative analysis of phagosome formation and maturation using an *Escherichia coli* probe expressing a tandem fluorescent protein

(直列型の蛍光タンパク質を発現する大腸菌プローブを用いたファゴソーム形成および成熟化の定量分析)

(著者：森田真矢、澤木和将、木下大生、櫻井千恵、堀直裕、初沢清隆)

平成29年 The Journal of Biochemistry 162巻 309頁～316頁

2. Syntaxin 11 regulates the stimulus-dependent transport of Toll-like receptor 4 to the plasma membrane by cooperating with SNAP-23 in macrophages

(Syntaxin 11はマクロファージにおいてSNAP-23と協同することによりToll様受容体の刺激依存的な細胞膜への輸送を制御する)

(著者：木下大生、櫻井千恵、森田真矢、常松眞史、堀直裕、初沢清隆)
平成31年 Molecular Biology of the Cell 30巻 1085頁～1097頁

学位論文要旨

Characterization of MORN2 stability and regulatory function in LC3-associated phagocytosis in macrophages

(マクロファージにおけるMORN2の安定性とLC3-associated phagocytosisの調節機能の解析)

LC3-associated phagocytosis (LAP) は、異物の取り込みにより形成されたファゴソーム膜上にオートファジー関連因子LC3が局在化する現象である。LAPでは異物に応じてファゴソーム内部の成熟度が厳密に制御されるが、詳細な分子機構は不明である。最近、LAP関連因子としてMORN2 (Membrane Occupation and Recognition Nexus repeat-containing 2) が報告されたが、どのようにLAPに関与するかなど不明な点が多い。

著者らはLAPにおけるMORN2の機能を解析する過程で、過剰発現させたMORN2の一部はユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されること、また、MORN2過剰発現マクロファージではファゴソーム内部の活性酸素種 (ROS) 産生依存的にLAPが亢進することを見出した。

LAP反応の一連の過程は、エンドソームなどのオルガネラとの膜輸送を介して複雑かつ厳密に制御されている可能性が考えられた。そこで、MORN2依存的なLAPにおける分子機構を膜輸送の観点から明らかにするため、ファゴソームの成熟化やROS産生に機能する細胞膜局在SNAREタンパク質SNAP-23に着目し、様々な検討を行った。

方法

ヒト胎児腎由来Phoenix-Ampho細胞に、Flagタグや蛍光タンパク質mVenusを融合したMORN2を一過的に発現させ、MORN2の発現とその制御について検討を行った。

マウスマクロファージ様J774細胞に、mVenusを融合したMORN2を安定発現する細胞株

(J774/mV-MORN2) を樹立し、MORN2過剰発現による大腸菌や酵母のファゴサイトーシス効率と、LAP効率 (膜結合型LC3の産生量あるいはLC3局在ファゴソーム数、それぞれの増加率) について検証した。またLAPに必須とされるファゴソーム内部のROS産生を阻害したときのMORN2依存的なLAP効率への影響について、同様に検証を行った。

次に、SNAP-23のLAPへの関与を明らかにするため、J774/mV-MORN2細胞を用いてSNAP-23の発現抑制および、Mycタグを融合したSNAP-23を過剰発現 (J774/mV-MORN2/Myc-SNAP-23) した時のLAP効率への影響について検討した。また、J774/mV-MORN2/Myc-SNAP-23細胞において、mV-MORN2によるファゴソーム膜上のMyc-SNAP-23局在量とファゴソーム内部のROS産生量の変化を調べ、LAP効率との相関について検証した。

結果

MORN2を一過的に発現させた細胞では、定常状態でMORN2の分解が見られ、プロテアソーム阻害剤であるMG132存在下で分解は抑制された。また、J774/mV-MORN2細胞では、MG132存在下に中心体マーカーである γ -tubulinが局在する区画にmV-MORN2の蓄積が観察された。

J774/mV-MORN2細胞を用いて大腸菌あるいは酵母を与えた場合のLAP効率を調べた結果、ともに亢進した。一方、ファゴソームの成熟化は、大腸菌の場合は亢進し、酵母では抑制された。また、ROS産生阻害剤であるDPI存在下では、mV-MORN2発現により亢進したLAPは抑制された。

mV-MORN2依存的なLAPは、J774/mV-MORN2細胞においてSNAP-23を発現抑制した場合は抑制され、一方、Myc-SNAP-23を共発現させたJ774/mV-MORN2/Myc-SNAP-23細胞ではJ774/mV-MORN2細胞に比べ有意に亢進した。このとき、MORN2の発現に依存してファゴソーム膜上のMyc-SNAP-23局在量は増加し、それに伴いファゴソーム内部のROS産生量に有意な増加が見られた。

考察

MORN2はMG132存在下で分解が抑制され、中心体に蓄積する様子が観察された。中心体はユビキチン-プロテアソーム系による分解の場の一つであることから、MORN2はユビキチン-プロテアソーム系により分解制御されていると考えられるが、その生理的意義は不明である。

本研究では、MORN2が亢進するLAPもROS産生依存的であること、MORN2がSNAP-23のファゴソーム膜局在化を促進させること、そしてこのファゴソームではROS産生量が増加することを明らかにした。これらの結果から、MORN2によってファゴソームに局在化したSNAP-23がROS産生を亢進し、LAPすなわちLC3のファゴソーム局在化が引き起こされたと考えられる。また大腸菌、酵母いずれの場合もLAPは亢進したが、ファゴソームの成熟化の制御が異なったことから、この制御は異物やその受容体に依存する可能性が考えられる。SNAP-23はリン酸化状態に応じてファゴソームの成熟化を制御するという以前の著者らの知見から、MORN2がファゴソーム膜上にSNAP-23を多く局在化させることにより、LAPファゴソームの成熟化の促進および抑制を調節していると考えられる。

結論

LAP関連因子MORN2は、その安定性がユビキチン-プロテアソーム系で制御されていること、ROS産生依存的なLAPを亢進することを明らかにした。さらに、この亢進は、MORN2依存的にSNAREタンパク質SNAP-23のファゴソーム局在化が促進しROS産生量が増加することにより起こる可能性を示した。MORN2によるLAPの調節機能の一端を明らかにした本研究は、自然免疫反応における「外来異物の分解や抗原提示を効率化する機構」を理解することに繋がり重要性が高いと考えられる。