

木下大生 学位論文審査要旨

主査 二宮 治 明
副主査 竹 内 隆
同 初 沢 清 隆

主論文

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4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

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. Phosphorylation of SNAP-23 at Ser95 causes a structural alteration and negatively regulates Fc receptor-mediated phagosome formation and maturation in macrophages

(SNAP-23 Ser95のリン酸化は構造の変化を引き起こしマクロファージにおけるFc受容体介在性のファゴソーム形成および成熟化を負に制御する)

(著者：櫻井千恵、板倉誠、木下大生、荒井齊祐、橋本仁志、和田郁夫、初沢清隆)

平成30年 Molecular Biology of the Cell 29巻 1753頁～1762頁

学位論文要旨

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4の刺激依存的な細胞膜への輸送を制御する)

Syntaxin11 (stx11) は免疫細胞に広く発現するSNAREタンパク質であり、interferon (IFN) - γ の刺激によって発現量およびファゴソーム局在量が増加することが知られているが、ファゴサイトーシスにおける機能は未解明な点が多い。

著者らはファゴサイトーシスにおけるstx11の機能を解析する過程で、活性化マクロファージにおいて、stx11が細胞膜局在SNAREタンパク質であるSNAP-23と協調してToll様受容体4 (TLR4) の細胞膜への輸送に機能することを示した。

TLR4は大腸菌などグラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) を認識するパターン認識受容体の1つで、自然免疫反応において重要な役割を果たす。また、その下流で活性化されるシグナルはTLR4の細胞内局在によって異なるため、TLR4の細胞内輸送機構の解明は、自然免疫反応の発現調節を理解するうえで非常に重要である。これらの結果は、IFN- γ や病原微生物によるTLR4の細胞内局在化機構の一端を明らかにし、TLR4の活性化異常による疾患の予防や病態の理解に貢献するものと考えられる。

方法

stx11を発現抑制したマウスマクロファージ様J774細胞について、IFN- γ 刺激時の大腸菌のファゴサイトーシス効率の測定、IFN- γ およびLPS刺激時の細胞表面のTLR4局在量を免疫蛍光法により検討した。

蛍光タンパク質であるmVenusを融合したTLR4 (TLR4-mV) を安定発現するJ774細胞株を樹立し、LPS刺激時のTLR4の細胞内局在について検証した。

mVenusを融合したstx11 (mV-stx11) を過剰発現するJ774細胞株を樹立し、共免疫沈降法によるstx11と相互作用するSNAREタンパク質の探索を行った。

stx11とSNAP-23のTLR4輸送における関連を明らかにするため、細胞膜上のSNAP-23の構造変化について、分子内Förster resonance energy transfer (FRET) プローブを用い、stx11発現抑制による影響について解析した。

結 果

stx11を発現抑制した細胞では、IFN- γ 刺激による大腸菌のファゴサイトーシス効率およびTLR4の細胞膜局在化の増加阻害が見られた。また、TLR4はLPSと結合すると急速にエンドサイトーシスされ、LPSを除去しさらに培養することでTLR4の細胞表面局在は回復する。一方、stx11を発現抑制した細胞では、LPS除去後のTLR4の回復は著しく阻害された。この阻害は、mV-stx11を一過的に発現することで回復したことから、stx11発現抑制の特異性が裏付けられた。

stx11を発現抑制したTLR4-mV安定発現細胞では、液胞型ATPase阻害剤であるBafilomycin A1 (BafA1) 存在下にLPS刺激した場合、endocytic recycling compartment (ERC) のマーカーであるRab11が局在する区画にTLR4-mVが蓄積する様子が見られた。

mV-stx11の過剰発現細胞では、共免疫沈降法によって、stx11と細胞膜局在SNAREタンパク質であるSNAP-23との相互作用が見られた。

細胞膜上のSNAP-23のFRET解析を行った結果、LPS刺激に依存したFRETシグナルの増加が見られたが、この増加はstx11の発現依存的であった。

考 察

本研究では、stx11はIFN- γ やLPSなどの刺激依存的なTLR4の細胞膜輸送に機能することを見出した。さらに、stx11の発現抑制によりLPS刺激時に細胞膜へ輸送されないTLR4は、BafA1によってERCに蓄積することから、TLR4はERCを介して細胞膜へ輸送されることが推測された。したがって、stx11は、LPS刺激時にTLR4がERCから細胞膜へ輸送される際の膜融合に機能すると考えられる。

stx11と相互作用し得るSNAP-23の分子内FRET解析をLPS刺激時の細胞膜上にて行った結果から、stx11とSNAP-23はLPS刺激時には細胞膜上で膜融合反応を起こすことができる状態、あるいは膜融合反応を終えた直後の状態にあることが示唆された。したがって、stx11はSNAP-23と協調してTLR4の刺激依存的な細胞内部から細胞膜への輸送に機能すると考えられる。

結 論

本研究では、細胞膜局在のSNAREタンパク質stx11が、別のSNAREタンパク質SNAP-23と協働することで、マクロファージにおいて観察される刺激依存的なTLR4の細胞膜への輸送に機能することを明らかにした。TLR4の細胞内局在化調節の一端が明らかになったことは、病原微生物等に対するTLR4を介した炎症応答制御を理解するうえで重要であり、敗血症などの関連疾患の予防や治療につながる可能性がある。