



## Studies on molecular mechanisms of SNAP-23 in phagocytosis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-07-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 櫻井, 千恵 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000103">https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000103</a>

# 論文内容要旨

しめい 氏名	さくら い ち え 櫻 井 千 恵
学位論文題名	Studies on molecular mechanisms of SNAP-23 in phagocytosis ファゴサイトーシスにおける SNAP-23 の分子機構に関する研究
<p>マクロファージなどの食細胞に見られるファゴサイトーシス(貪食)は、病原微生物などをファゴソーム(食胞)に取り込み、殺菌・分解する生体防御反応である。ファゴソームはエンドソームやライソゾームなどの細胞内小器官(オルガネラ)と融合を繰り返し成熟する。ファゴソームの形成や成熟は複雑な膜融合によって進行するが、その分子機構はよくわかっていない。本研究では、膜融合に機能する SNARE タンパク質で、マクロファージ細胞膜に局在する SNAP-23 の機能解析を行い、【1】ファゴソームの形成や成熟の分子機構、【2】その調節機構、を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【1】の解明のため、N 末端に蛍光タンパク質 mVenus を付加した SNAP-23(mV-S23)や SNAP-23 の C 末端 8 アミノ酸を欠失させた不活性型変異体(mV-S23ΔC8)を発現する J774 細胞(マウスのマクロファージ由来)株を樹立した。これら細胞株を用いて SNAP-23 がファゴサイトーシスに及ぼす影響を調べたところ、① SNAP-23 の過剰発現はファゴソームの形成と成熟を亢進した。また、②SNAP-23 の発現抑制細胞では、ファゴソームの形成と成熟の両過程が阻害された。①と②から、SNAP-23 はファゴサイトーシスにおけるファゴソームの形成および成熟に機能すると考えられた。次に、③実際にファゴソーム膜上で SNAP-23 が機能しているかを調べるため FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)解析を行ったところ、SNARE タンパク質である VAMP7 を過剰発現した場合に FRET シグナルの増加が見られた。このことから、SNAP-23 はファゴソーム膜上で膜融合に伴う構造変化を起こしていること、つまり、実際に機能していることが示唆された。</p> <p>続いて、【2】の解明のため、種間で保存される SNAP-23 の Ser95 のリン酸化に着目した。この部位をアラニン残基(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 SNAP-23 変異体を発現する J774 細胞株を樹立し、④ファゴソームの形成や成熟について検証したところ、mV-S23 S95A 細胞ではコントロール細胞と比べた場合に mV-S23 細胞と同程度の亢進が見られたが、mV-S23 S95D 細胞では有意に低下していた。また、⑤FRET 解析を行ったところ、S95D 変異体は定常状態において S95A 変異体では見られない FRET シグナルの上昇が観察された。④と⑤から、SNAP-23 は Ser95 のリン酸化により立体構造を変化することで機能が制御される可能性が考えられた。次に、SNAP-23 のファゴサイトーシスにおけるリン酸化酵素同定のため、エキソサイトーシス(開口分泌)において SNAP-23 をリン酸化することが報告された IKK2 に着目して検討を行った。⑥IKK2 を過剰発現させた場合のファゴソーム膜上での FRET 解析を行ったところ、細胞膜上では見られない FRET シグナルの上昇が観察され、これは IKK2 特異的な阻害剤で抑制された。つまり、IKK2 がファゴソーム膜上の SNAP-23 の機能を制御するリン酸化酵素の候補の一つと考えられた。</p> <p>以上より、SNAP-23 は膜融合装置としてファゴサイトーシスに機能すること、また、その機能は SNAP-23 の立体構造に影響する Ser95 のリン酸化状態により制御されていることが明らかとなった。</p>	