

博士論文

マクロファージの食胞成熟における
イノシトールリン脂質脱リン酸化酵素の役割

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

博士課程 薬学専攻

生理化学研究室

D162458 瀬川 智裕

目次

序論.....	1
本論.....	3
第1章 イノシトールリン脂質 5 位脱リン酸化酵素 Inpp5e の役割.....	3
1-1 実験方法	5
1-1-1 細胞.....	5
1-1-2 IgG 感作赤血球の調整とファゴサイトーシスの測定	7
1-1-3 zymosan の貪食	8
1-1-4 プラスミド	8
1-1-5 トランスフェクト	8
1-1-6 貪食過程におけるイノシトールリン脂質の動態観察	9
1-1-7 食胞の酸性化解析	10
1-2 結果.....	11
1-2-1 Inpp5e 欠損による貪食と食胞成熟への影響	11
1-2-2 Inpp5e 欠損によるホスフォイノシチドの動態への影響	11
1-2-3 Inpp5e 欠損による Rab5 動態への影響.....	20
1-2-4 Inpp5e と Rab20 の食胞での会合.....	23
1-3 考察.....	27
第2章 マクロファージの FcγRIIb は抗体感作異物の貪食時に食胞酸性化と食胞膜リン脂質の連続的脱リン酸化を調節する	29
2-1 実験方法	29
2-1-1 細胞.....	29
2-1-2 zymosan のオプソニン化.....	31
2-1-3 貪食過程における PIs の動態観察.....	31
2-1-4 食胞酸性化の解析	31
2-2 結果.....	32
2-2-1 粒子の IgG オプソニン化による PIs 動態への影響	32
2-2-2 脱リン酸化酵素ノックダウンによる PIs 動態への影響.....	35
2-2-3 SHIPs や Inpp4a 欠損による Akt リン酸化への影響	37
2-2-4 FcγRIIb ノックダウンによる IgG 誘発性 PIs 消失促進への影響	40
2-2-5 FcγRIIb ノックダウンによる食胞酸性化への影響.....	42
2-3 考察.....	44
第3章 総括	45
原著論文	49

参考文献 50

謝辞.....エラー! ブックマークが定義されていません。

序論

イノシトールリン脂質群 (PIPs) は他のリン脂質に比較して量的に少なく、代謝回転が速い。そのため、細胞膜の構築材料として以外の機能をもつことが古くから指摘されていた。PIPs の親水基は大きく複雑で負電荷を有するイノシトール (図 1) である。このイノシトールの 3 位、4 位、5 位の水酸基が可逆的にリン酸化修飾されることで、PIPs には 8 種類が存在し、リン酸化酵素 (kinase) と脱リン酸化酵素 (phosphatase) によって相互に変換される。PIPs はそれぞれに特異的な標的タンパク質と結合し、その活性や細胞内局在を制御することで様々な細胞機能を制御している。

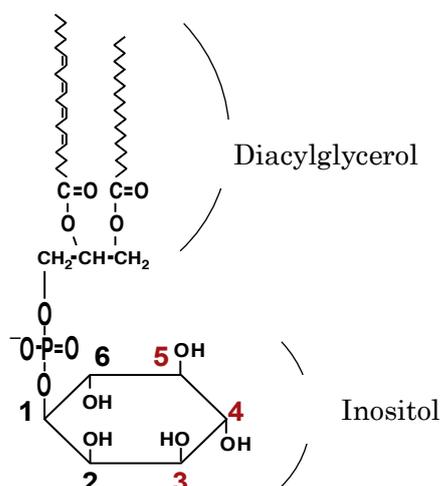


Fig. 1 イノシトールリン脂質の構造

マクロファージは菌、異物、自己の死細胞や変性物質を貪食し消化することで生命の恒常性の維持に貢献する[1]–[3]。また、取り込まれた異物の一部を抗原提示することで獲得免疫に繋げる。異物は細胞膜の伸展によって捕えられ、続いて膜の閉鎖によって食胞に封入される。食胞内はエンドソームとの融合によって次第に酸性化され、最終的に食胞とリソソームが融合するとリソソーム酵素によって異物の消化が完了する。このプロセスは食胞成熟と呼ばれ、標的を取り囲む膜上のイノシトールリン脂質 (PIs) の交代によって進行すると考えられる[4]–[6]。しかし、こうした反応に寄与するリン酸化、脱リン酸化酵素の詳細は不明である。その理由の一つとして、貪食の進行に伴う時間的変化を導く酵素反応は試験管内酵素活性の測定だけでは説明できないことが挙げられる。また、一般的に血球細胞は遺伝子導入効率が低いことが知られており、分子生物学的手法の適用が困難である。

私の研究室では貪食活性が高いマクロファージ系培養細胞株 **Raw264.7** 細胞に対して、エレクトロポレーション法を基にした極めて効率的な遺伝子導入方法を開発した。この手法を用いて、各 **PIPs** に特異的な結合タンパク質を利用した蛍光プローブを **Raw264.7** 細胞に遺伝子導入することで、貪食時の食胞上の **PIPs** 変動を可視化することに成功した。さらに、**PIPs** 代謝酵素を欠損した細胞を網羅的に作製し、独自のセルバンクを構築することで、マクロファージの機能調節における **PIPs** 代謝酵素の役割を解明してきた。その中で私が担当したのは、主として **5** 位脱リン酸化酵素の機能である。第 1 章では **Inpp5e** というあまり報告のなかった酵素についての新たな知見を公表した。第 2 章では、抑制性の **FcγR (FcγRIIb)** の下流で機能する **SHIP** という **5** 位脱リン酸化酵素が、**4** 位脱リン酸化酵素 **Inpp4a** との連続的脱リン酸によって食胞の **PtdIns(3,4,5)P₃** を **PtdIns(3)P** へと代謝し、結果として食胞成熟を促進することを明らかにした。

本論

第1章

イノシトールリン脂質 5 位脱リン酸化酵素 Inpp5e の役割

特定のイノシトールリン脂質の相対的な存在量は Fc 受容体介在性の貪食過程で変遷する[4]–[6]。例えば、phagocytic cup の形成途中では PtdIns(3,4,5)P₃ が膜に一過性に蓄積する[7]。比較的大きな粒子を取り囲むとき、この現象は phagocytic cup の閉鎖に不可欠である[8], [9]。phagocytic cup の閉鎖直後に、新生ファゴソームに PtdIns(3)P が現れ[10]–[13]、これは食胞の成熟に不可欠な役割をもつ[12],[13]。その後の成熟、酸性化の過程で、食胞の PtdIns(3)P は PtdIns へと代謝されるか、PtdIns(3,5)P₂ へとリン酸化される[14] (Fig. 2)。

複数の PI 代謝酵素が貪食過程に関与している[15]–[17] (Fig. 3)。PtdIns(3,4,5)P₃ を産生する唯一の経路はクラス I 型 PI3 キナーゼによる PtdIns(4,5)P₂ のリン酸化である。PtdIns(3,4,5)P₃ は PI 脱リン酸化酵素によって PtdIns(4,5)P₂ または PtdIns(3,4)P₂ へと速やかに分解される。3 位脱リン酸化酵素である PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted chromosome 10) や、SHIP1 (Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase 1)、Inpp5e のような 5 位脱リン酸化酵素を欠損した細胞では貪食能が亢進する[18]–[21]。従って、phagocytic cup における PtdIns(3,4,5)P₃ の分解低下が貪食を活性化していると考えられる。興味深いことに、5 位脱リン酸化酵素のいずれか 1 つの欠損でも貪食は亢進し[18]–[21]、それぞれの役割が特異的であり、重複しないことを示唆している。しかしながら、貪食過程におけるそれら酵素の機能についてはほとんど分かっていない。

私は中でも特に機能解析の進んでいない Inpp5e に着目し、本酵素の貪食での特異的な役割の究明を試みた。

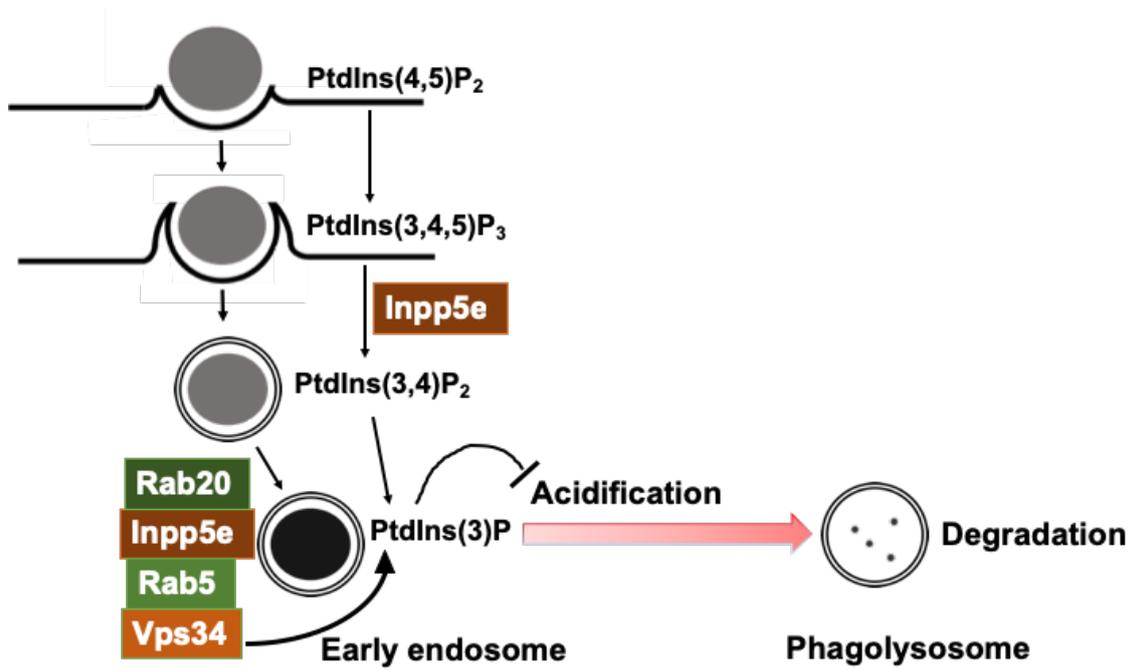


Fig. 2 食食過程でのイノシトールリン脂質の変遷

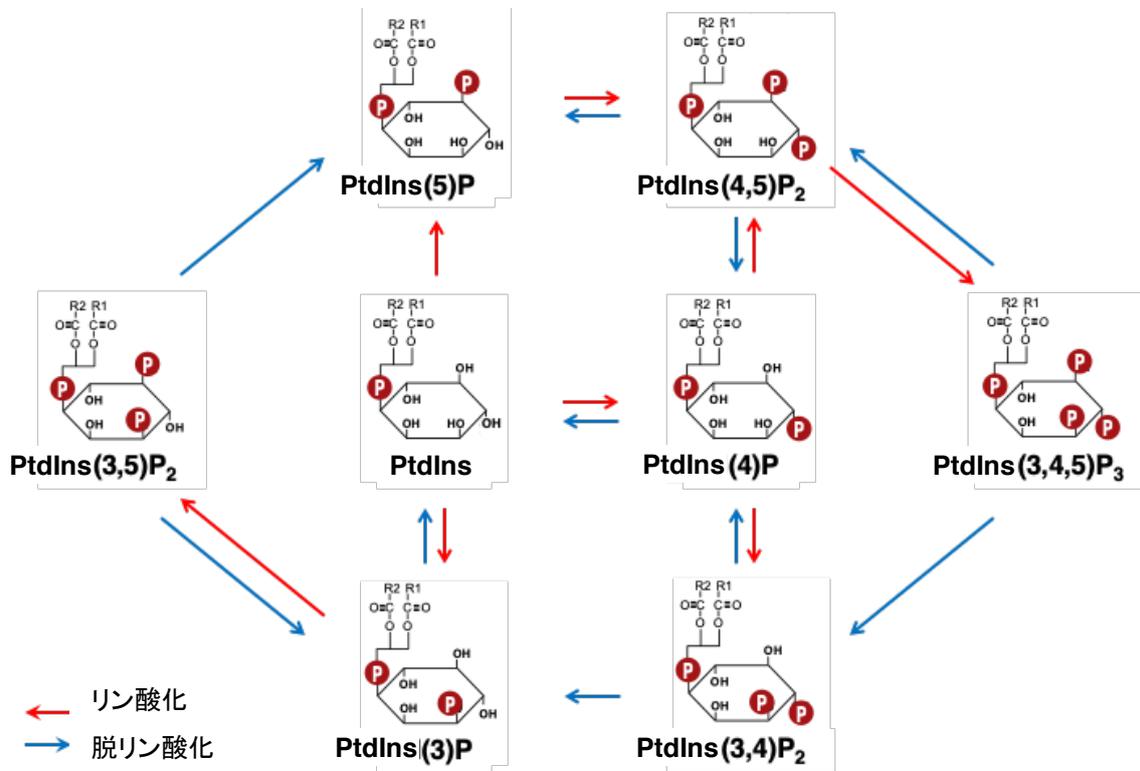


Fig. 3 PIs とその代謝経路

1-1 実験方法

1-1-1 細胞

Inpp5e を欠損した Raw264.7 細胞 (shInpp5e) は以下の通り作製した。

Inpp5e を標的とするオリゴヌクレオチドを pH1 ベクターに導入し、siRNA ヘアピンを発現させた。標的配列のそれぞれについて、以下の配列を用いて一対のオリゴヌクレオチドを合成した。5'-CCC(X)₁₉TTCAAGAGA(Y)₁₉TTTTTGGAAA-3'、および 5'-CTAGTTTCCAAAAA(Y)₁₉TCTCTTGAA(X)₁₉GGGTGCA-3'、(X)₁₉はコード配列、(Y)₁₉は相補配列である。オリゴヌクレオチド対をアニーリングし、pH1 ベクターの PstI、XbaI サイトで H1 RNA プロモーターの下流に結合させた。250 V/950 μF で Raw264.7 細胞 (5×10⁶ 個から 10×10⁶ 個) にベクターを遺伝子導入した (Gene Pulser II; Bio-Rad)。遺伝子導入 24 時間後、細胞に 3 μg/ml の puromycin を添加し、細胞の選択を行った。遺伝子の発現抑制効率を調べるため、Sepasol で total RNA を抽出し、以下のプライマーを用いて逆転写 PCR で mRNA を定量した (3'-GGACGAGACAACATCCCATT-5'、3'-CCATCCTTTGCAGTGACCTT-5')。本研究では mRNA 発現を 90%以上抑制されたクローンを選択した。コントロール細胞は標的配列の代わりに 400 bp のスタッパー配列を含んだ pH1 ベクターを用いて作製した。SHIP1 を欠損した細胞は、既に当研究室にあるものを使用した[22]。

ファゴサイトーシスアッセイや顕微鏡解析では、細胞を 24-well plate や tissue culture-coated glass bottom dish に播種し、4.5 g/l グルコース、10% FBS を含む RPMI1640 培地中で加湿下 5% CO₂、37 °C で培養した。実験開始直前に培地を除去し、NaHCO₃ を含まず、20 mM HEPES/NaOH を添加した RPMI1640 培地に交換した。37 °C の水浴上、通常の大気中で種々の活性測定を行った。

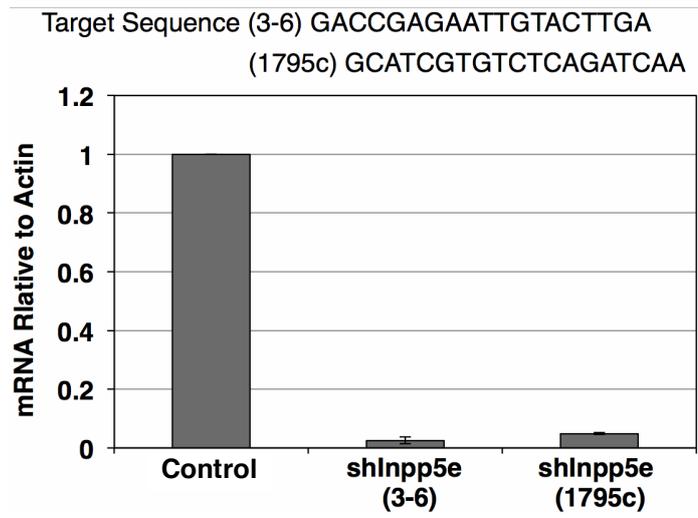


Fig. 4 shRNA による Raw264.7 細胞の Inpp5e のノックダウン

1-1-2 IgG 感作赤血球の調整とファゴサイトーシスの測定

赤血球 (RBC) は ^{51}Cr で標識した[23]。標識赤血球を抗羊赤血球抗体とともに、0.1% gelatin、75 mM NaCl、0.15 mM CaCl_2 、0.5 mM MgCl_2 、10 mM EDTA を含んだ 5 mM veronal buffer (pH 7.5) (GVB) 中で 37 °C、10 分間インキュベートした。

IgG 感作赤血球の結合量と貪食量は先の文献に従って測定した[23]。単層の Raw264.7 細胞 (24-well plate で 2×10^7 個/well) を ^{51}Cr 標識 IgG 感作赤血球とともに図に示した時間 37 °C でインキュベートした。その後 PBS で 3 回洗浄し、未結合の IgG 感作赤血球を除去した後、0.1 ml の低張 PBS に短時間暴露した。得られた上清の放射活性を食細胞の表面に結合した IgG 感作赤血球の結合量として測定した。細胞を再度 3 回 PBS で洗浄し、0.5% Triton X-100 で可溶化した。溶液中の放射活性を取り込まれた IgG 感作赤血球の量として測定した。

1-1-3 zymosan の貪食

計数を簡便化するため FITC 標識 zymosan を同量の非標識 zymosan と混合し、約 1 分間超音波処理した。zymosan は非オプソニン化、マウス血清処理、抗 Zymosan IgG で 37 °C、60 分間処理した。バッファーは血清処理では GVB を、IgG オプソニン化では EDTA-GVB を用いた。オプソニン化 zymosan は GVB で 3 回洗い、バッファーに懸濁した。調整した zymosan は使用前に約 10 秒間超音波で処理した。Raw264.7 (glass bottom dish で 10^5 個/well) に対し zymosan を 5×10^6 個添加し、37 °C で培養した。貪食過程は氷冷した PBS を添加することで停止させた。その後細胞を PBS で 3 回洗い、4% paraformaldehyde を用いて室温下で 15 分間固定を行い、PBS で洗浄した。無作為に選んだ 3 視野から 100 個以上の細胞の蛍光画像（励起波長 488 nm、蛍光波長 525 nm）と位相差像を共焦点顕微鏡で撮影した。細胞 100 個あたりに取り込まれた zymosan の平均値をグラフに示した。

1-1-4 プラスミド

myosin X のタンデムドメイン PH1(N)-PH2-PH3(C) (以降 PH (MyoX)) をマウスマクロファージより以下のプライマーを用いて単離した (5'-AGATCTCCCTATTTCCACAGTTTTTC-3'、5'-GAATTCCTACTTGGATCTCTGCAGCA-3')。次いでこのドメインを pEGFP-C1 の BglII と EcoRI サイトにサブクローニングした。Inpp5e はマウスの胚から以下のプライマーを用いて単離した (5'-GCATCCTTGACAACAAGATTGC-3'、3'-AAGCCCATCCTTTGCAGTGACC-5')。これを pmCherry-C1 にサブクローニングした。EGFP-[3 xFYVE (EEA1)]、EGFP-[2 xPH (Tapp1)]、dsRed-Rab5 b、dsRed-Rab5 b(Q79 L)は佐々木教授（秋田大学）より提供していただいた。mCherry-[3 xFYVE (EEA1)]、EGFP-Rab5 は[3 xFYVE (EEA1)]と Rab5 のフラグメントをそれぞれ pmCherry-C1、pEGFP-C1 にサブクローニングして作製した。EGFP-Rab20 は福田教授（東北大学）より提供していただいた。

1-1-5 トランスフェクト

Neon™ transfection system (Invitrogen)を用いてトランスフェクトした。ただし、Raw264.7 用に当研究室で開発された buffer (25 mM HEPES, 62.5 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4 , 2 mM $MgCl_2$, 125 mM Trehalose, 0.5 % Ficoll)を用いた。条件も最適化を行い、1850 x 20ms x 1、2 回/well とした。24 時間後、細胞を顕微鏡解析に使用した。

1-1-6 食食過程におけるイノシトールリン脂質の動態観察

種々の蛍光プローブを transfect した細胞をガラスボトム dish に撒き、IgG 感作赤血球添加後、37 °C の顕微鏡台に移した。CFI Plan Apo VC60 xH 油浸レンズを装着した BIORREVO BZ9000 顕微鏡 (Keyence) で食食過程を撮影した。特に明記しない限り、蛍光画像を 1 分間隔で撮影し、食胞の蛍光を BZ-II analysis system (Keyence) で解析した。用いた各プローブでモニターできる PIPs を Table. 1 に示した。

Table.1 本論文で使用した PIPs を検出するためのプローブ

PIPs	Protein
PtdIns(3,4,5)P ₃	Akt/PKB MyoX
PtdIns(3,4)P ₂	Tapp1
PtdIns(3)P	EEA1

1-1-7 食胞の酸性化解析

LysoTracker Red は、酸性化したエンドソームに蓄積する。細胞に 50 nM の LysoTracker Red を添加 30 分後、IgG 感作赤血球を加えて 1500 g で 1 分間遠心し、10 または 30 分インキュベートした。IgG 感作赤血球とともに 2 時間インキュベートした実験では、最後の 30 分間に LysoTracker を添加した。細胞を PBS で 3 回洗い、室温で 15 分間 4% paraformaldehyde を含んだ PBS で固定し、0.3% Triton X-100 と 0.5% BSA を含んだ PBS で 60 分間透過処理を行い、Alexa488-anti-rabbit IgG とともにインキュベートした。Z スタックは 1 μm の間隔で撮影した。スタックを重ね合わせて再構築し、BZ-H2 C (Keyence) で解析した。取り込まれた赤血球数は Alexa488 の蛍光画像から計数した。酸性化した食胞はマージ画像で計数した。5 つの画像を解析し、それぞれ 100 から 120 個の細胞を数えた。結果は平均値 \pm 標準誤差を示している。

1-2 結果

1-2-1 Inpp5e 欠損による食食と食胞成熟への影響

Raw264.7 細胞に shRNA を遺伝子導入して作製した 2 種類の Inpp5e の欠損株 (shInpp5e-3、shInpp5e-1795) を用いて食食量を比較したところ、IgG 感作赤血球、IgG オプソニン化 zymosan の食食量は shInpp5e 細胞で増加した (Fig.5)。shInpp5e 3-6 においてマクロファージ表面に結合した IgG 感作赤血球数はほとんど変化がなかったが、1795 c 細胞では若干増加していた (Fig. 5C、5D)。また、shInpp5e 細胞では非オプソニン化 zymosan の食食量の増加もみられた (Fig. 5E、5F)。SHIP1 は Fc γ 受容体、CR3 (補体受容体) を介した食食をどちらも負に制御することが報告されている一方で、Inpp5e はもっぱら Fc γ 受容体介在性の経路を制御すると報告されている[21]。しかし、本研究では shInpp5e 細胞はわずかではあるが血清処理 zymosan の取り込み、つまり CR3 を介した食食も有意に亢進していた (Fig. 5E)。Inpp5e は PtdIns(3,4,5)P₃ を代謝することで、オプソニン化に関係なく、大きな標的の食食を負に制御することが示唆された。

取り込まれた食食標的は、新生食胞 (nascent phagosome) と呼ばれる分画を形成し、その内部は次第に酸性化されていく。そこで次に食胞の酸性化に Inpp5e が関与する可能性を解析した。shInpp5e 細胞では赤血球を含む食胞のほとんどが LysoTracker で染まった (Fig. 6A)。対照的にコントロール細胞ではいくつかの標的しか酸性区画に見られなかった。長時間のインキュベーションでコントロール細胞でも酸性化食胞は増加したが、30 分経過後でさえも shInpp5e 細胞よりその割合は低かった (Fig. 6B)。どちらの細胞でも 2 時間のインキュベーションでほぼ 100 % の食胞が酸性化した (Fig. 6C、6D)。これまで 5 位脱リン酸化酵素が食胞成熟に関与することは知られていないが、この結果は Inpp5e が食胞酸性化を遅らせていることを示唆している。

1-2-2 Inpp5e 欠損によるホスフォイノシチドの動態への影響

shInpp5e 細胞における食胞での PI 誘導体の蓄積を確認した。ホスフォイノシチドを可視化するために EGFP 融合させた PH (MyoX)、2 xPH (Tapp1)、3 xFYVE (EEA1) をそれぞれ PtdIns(3,4,5)P₃、PtdIns(3,4)P₂、PtdIns(3)P のプローブとして使用した。

コントロール細胞では PtdIns(3,4,5)P₃ は形成されつつある phagocytic cup で急速に蓄積するが、食食開始後 5 分以内で消失する。shInpp5e では PtdIns(3,4,5)P₃ の量はコントロール細胞よりもわずかに多かった (Fig. 7A、7B)。細胞間での差がわずかであったため、次に PtdIns(3,4,5)P₃ の代謝物である PtdIns(3,4)P₂ 量に違いがあるか検討した。食胞

上の PtdIns(3,4)P₂ は shInpp5e 細胞で明らかに減少していた (Fig. 5C,5D)。従って、Inpp5e は食胞の PtdIns(3,4,5)P₃ の 5 位を脱リン酸化して PtdIns(3,4)P₂ にしていることが明らかになった。

PtdIns(3,4)P₂ はさらに 4 位を脱リン酸化されて PtdIns(3)P となる。そこで次に PtdIns(3)P の蓄積量のタイムラプスを観察した。その結果 shInpp5e 細胞で PtdIns(3)P の極端な減少が認められた (Fig. 7E、7F)。ここで観察された PtdInsPs の動態における Inpp5e 欠損の影響の一部は予測された通りである。即ち、PtdIns(3,4,5)P₃ が蓄積し、PtdIns(3,4)P₂ が減少することは、その酵素活性から予測されることと矛盾しない。その結果、食胞上の PtdIns(3)P が減ったことも説明できる。しかし、定量的解釈では明らかな齟齬がある。PtdIns(3,4,5)P₃ の蓄積量、PtdIns(3,4)P₂ の減少量、PtdIns(3)P の減少量について野生型細胞と Inpp5e 欠損細胞を比較すると、PtdIns(3)P の減少が極端である (Fig. 7)。食胞上の PtdIns(3)P の産生については、PtdIns(3,4,5)P₃ の連続的脱リン酸化の他にクラス III PI3K (Vps34) による de novo の新生系が知られている。この系は Rab5 に依存することが報告されている (Fig. 8)。そこで次に、Rab5 の食胞上へのリクルートを検討した。

Fig. 5

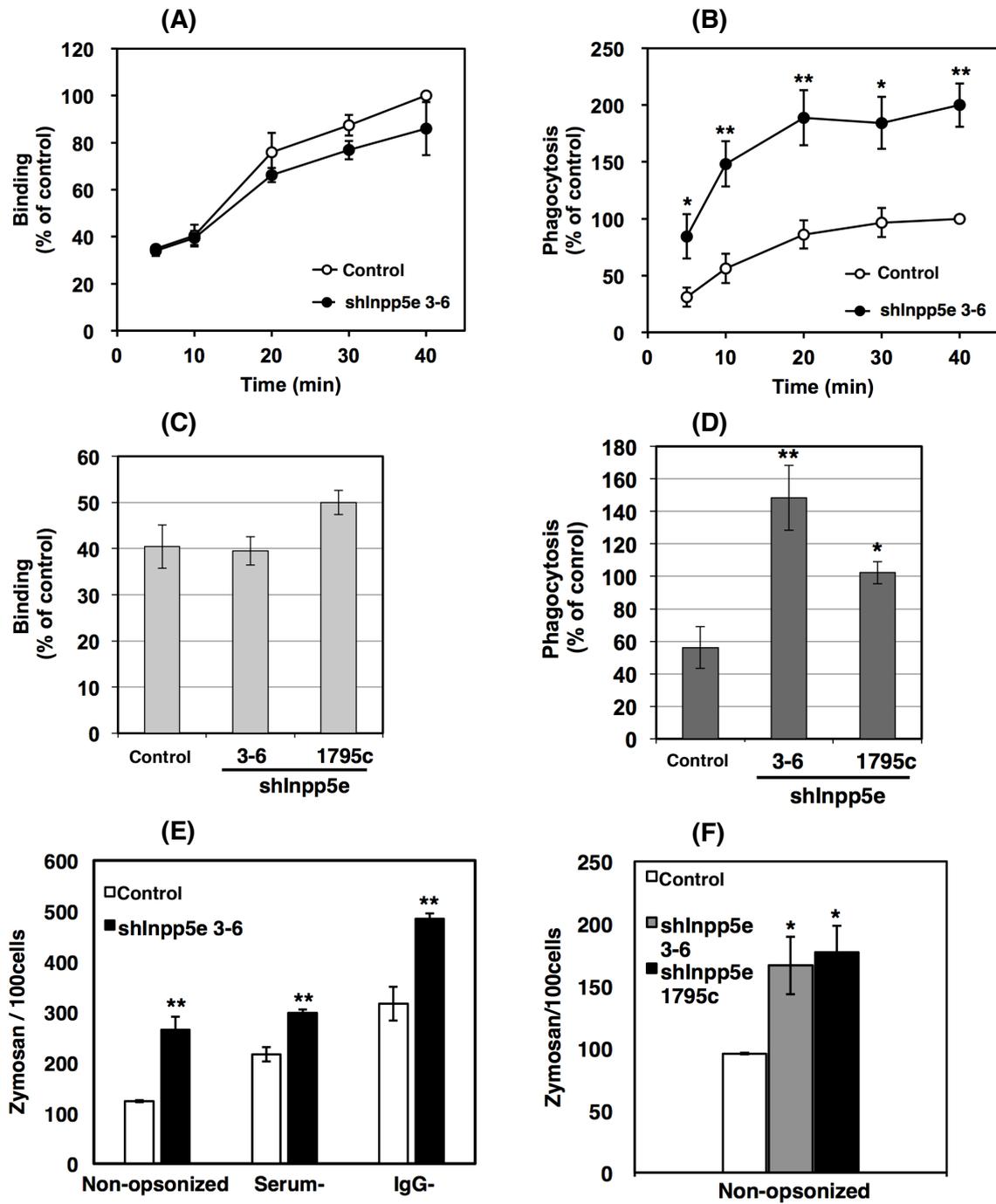
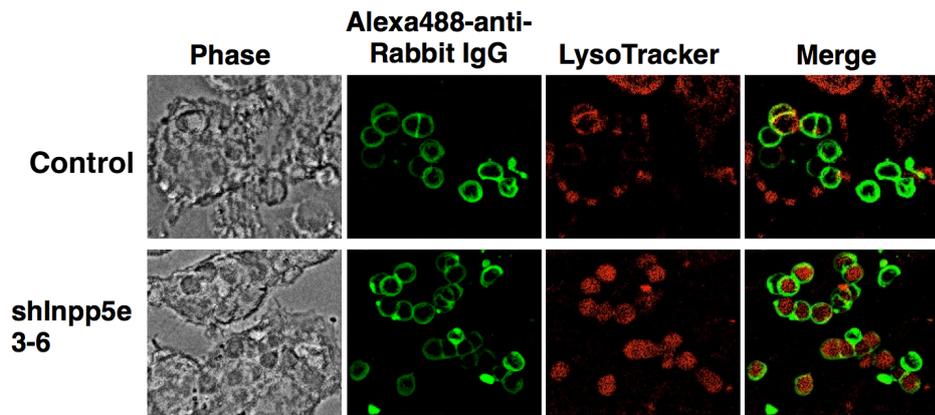


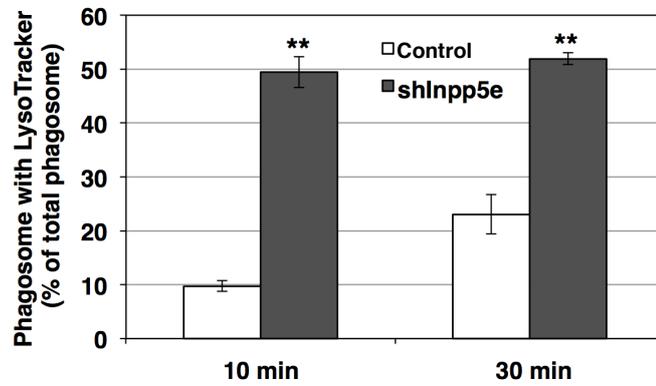
Fig. 5 shInpp5e 細胞における食食の促進 (A, B) コントロール (○)、shInpp5e (●) 細胞に IgG 感作赤血球を添加し、所定の時間インキュベートした。細胞表面の赤血球数 (A)、細胞内の赤血球数 (B) をそれぞれ示しており、40 分時点でのコントロール細胞の値を 100% として算出した。(C, D) コントロール、shInpp5e 細胞に IgG 感作赤血球を添加 15 分後、結合数 (C)、と食食量 (D) を測定した。(E, F) コントロール、shInpp5e 細胞に非オプソニン化、IgG オプソニン化、血清オプソニン化 zymosan を添加し、10 分間インキュベートした。zymosan 粒子は FITC 標識、非標識 zymosan の 1:1 混合物を使用した。マージ画像から蛍光標識 zymosan を計数し、細胞内の zymosan 数を算出した。3 回の実験を行った結果を、平均値±標準誤差で示している。(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)

Fig. 6

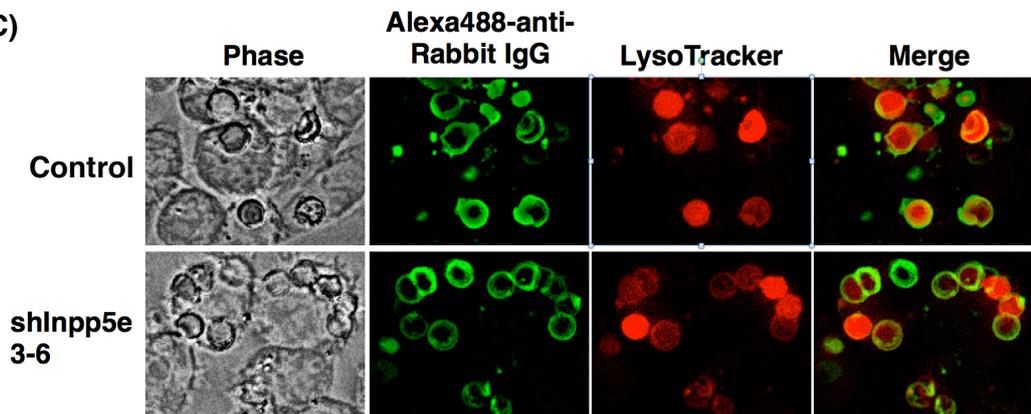
(A)



(B)



(C)



(D)

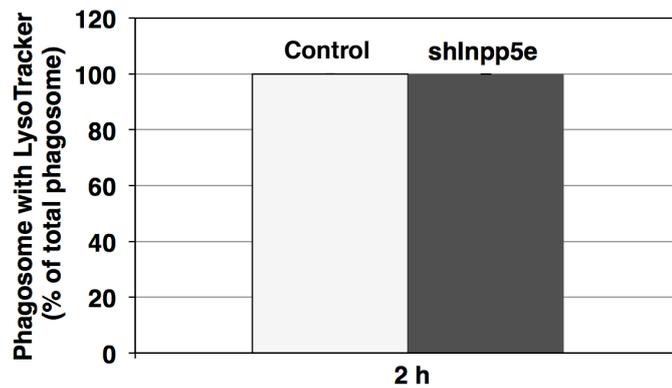
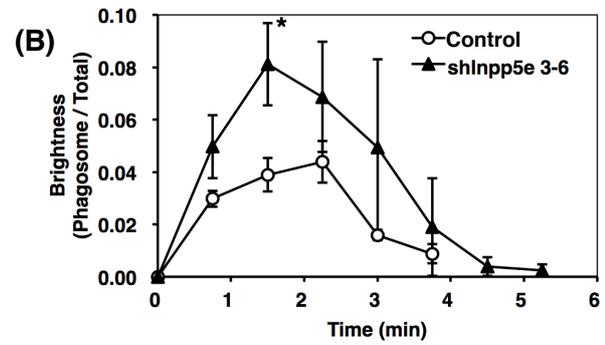
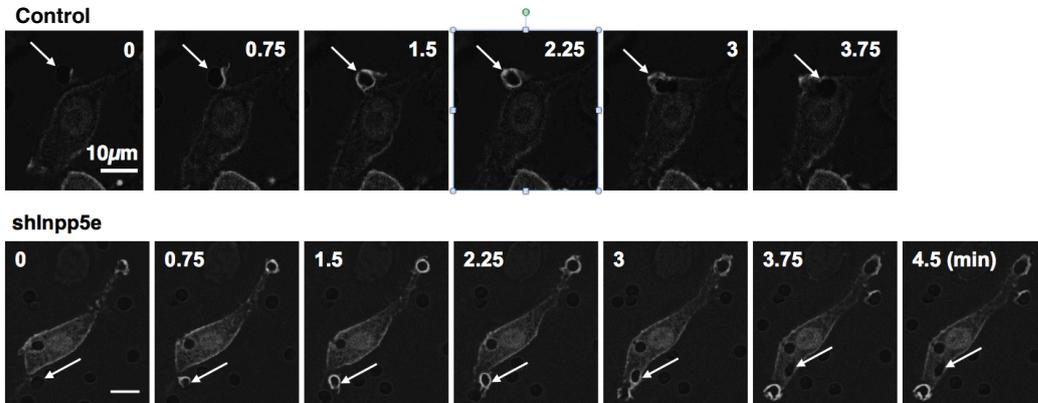


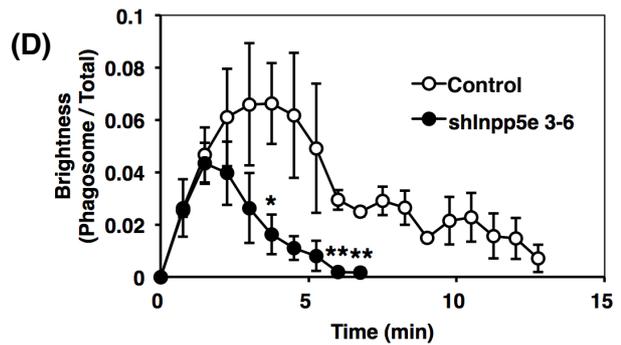
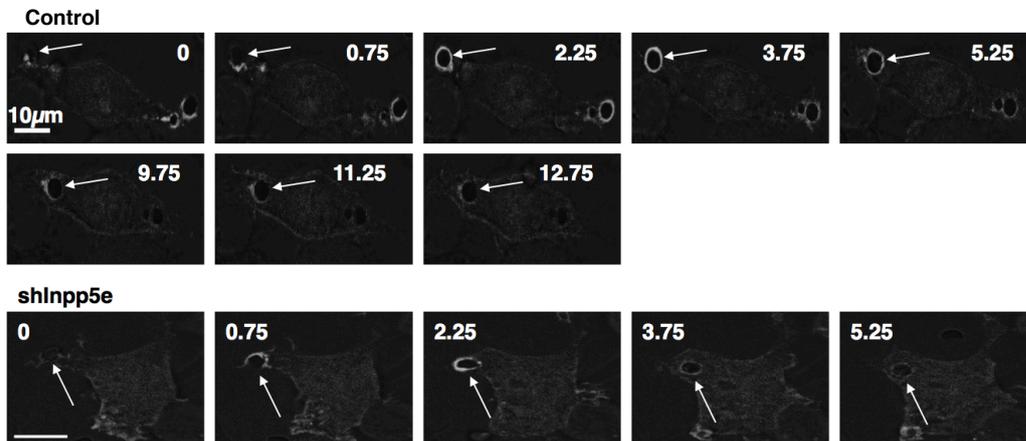
Fig. 6 shInpp5e 細胞における食胞酸性化の促進 (A、B) コントロール、shInpp5e 細胞を 50 nM LysoTracker とともに 30 分間インキュベートし、その後 IgG 感作赤血球を添加、さらに 10 分間または 30 分間インキュベートした。(C、D) コントロール、shInpp5e 細胞を IgG 感作赤血球添加後 90 分間インキュベートし、50 nM LysoTracker を加えさらに 30 分間インキュベートした。(A-D) 細胞を洗って paraformaldehyde で固定し、Alexa488-anti-rabbit IgG で染色した。(A、C) 顕微鏡画像である。(B、D) コントロール (open bar)、shInpp5e 細胞 (solid bar) での LysoTracker 陽性ファゴソーム数を定量した。3 回の実験を行った結果を、平均値±標準誤差で示している。(**P < 0.01)

Fig. 7

(A) PH (MyoX)



(C) 2 x PH (Tapp1)



(E) 3 x FYVE (EEA1)

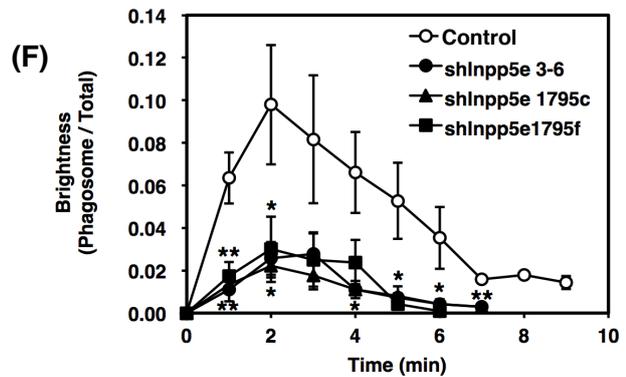
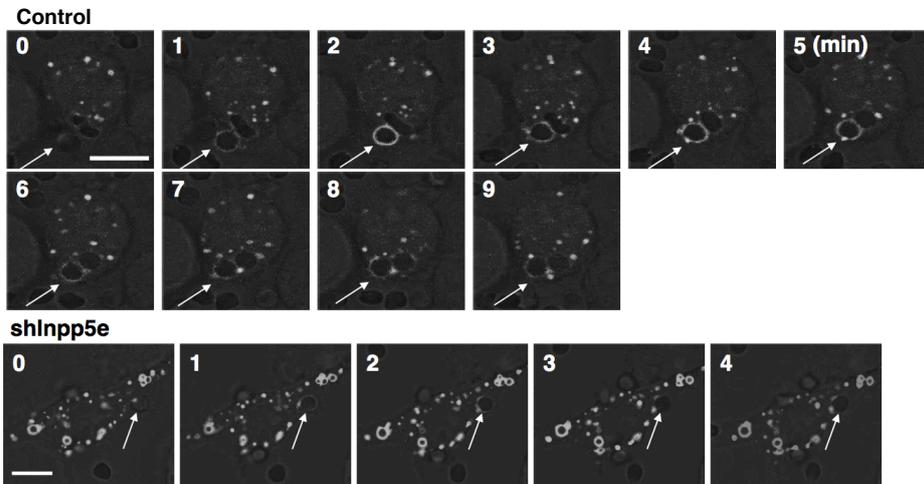


Fig. 7 shInpp5e 細胞における食胞の PtdIns(3,4,5)P₃、PtdIns(3,4)P₂、PtdIns(3)P の動態。コントロール、shInpp5e 細胞に EGFP-[PH (MyoX)] (A、B)、EGFP-[2 x PH (Tapp1)] (C、D)、EGFP-[3 x FYVE(EEA1)] (E、F) を遺伝子導入し、IgG 感作赤血球を貪食させた。細胞全体の蛍光強度に対する食胞の蛍光強度を算出した。3 つの細胞を測定した結果を、平均値±標準誤差で示している。shInpp5e-1795c と shInpp5e-1795f は同じ配列の shRNA を導入した別の細胞株である。(*P < 0.05、**P < 0.01)

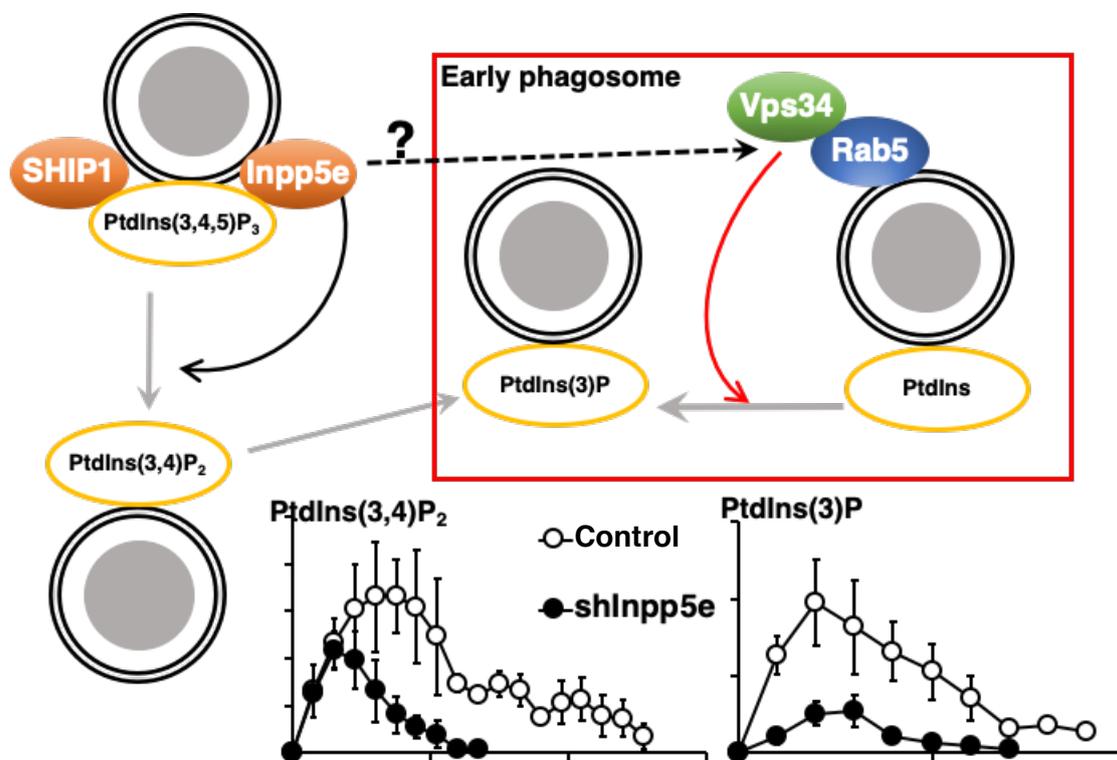


Fig. 8 PtdIns(3)P の産生について、Inpp5e の関与が考えられる経路
 PtdIns(3,4)₂ から Ptd(3)P への脱リン酸化と Vps34 による de novo 合成のいずれも
 Inpp5e が関与する可能性がある。

1-2-3 Inpp5e 欠損による Rab5 動態への影響

Raw264.7 細胞に EGFP-Rab5 を発現させ IgG 感作赤血球を貪食させると、コントロール細胞では EGFP-Rab5 は取り込まれた食胞膜上に約 10 分間存在した (Fig. 9A、9B)。一方、shInpp5e 細胞ではこの時間は極端に短くなった。しかし、食胞膜上で PtdIns(3,4,5)P₃ の 5 位を脱リン酸化することが既に明らかになっている SHIP1 の欠損細胞では、Rab5 の動員は変化しなかった (Fig. 9A、9B)。従って、Inpp5e による食胞への Rab5 の動員抑制は PtdIns(3,4,5)P₃ の脱リン酸化とは無関係である。興味深いことに、Inpp5e 欠損細胞に恒常的活性型 Rab5 (Q79L) を細胞に発現させ、PtdIns(3)P の動態を観察すると、コントロール細胞と同程度に PtdIns(3)P 蓄積の長期持続が確認された (Fig. 9C)。従って、Inpp5e 欠損細胞における食胞の PtdIns(3)P の減少 (Fig. 7E, F) は、Rab5 が食胞に来ないことで説明される。

Fig. 9

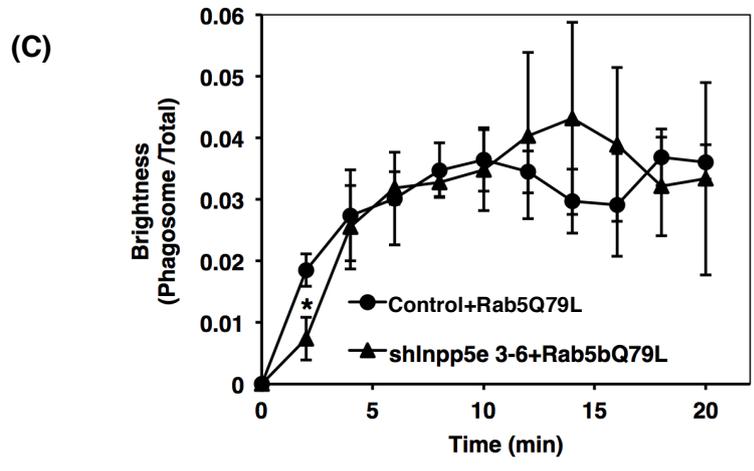
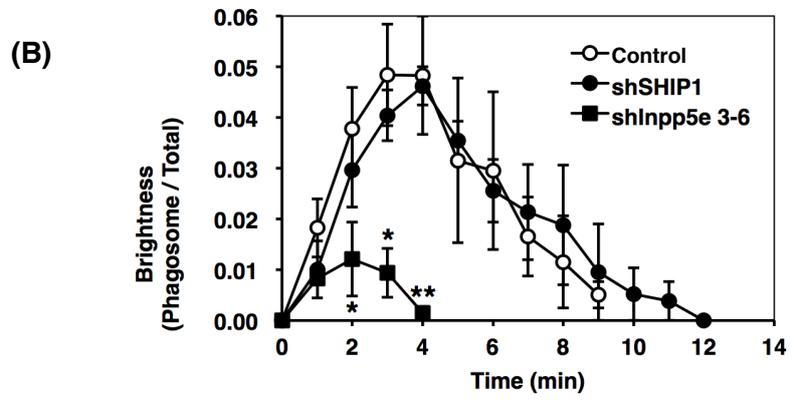
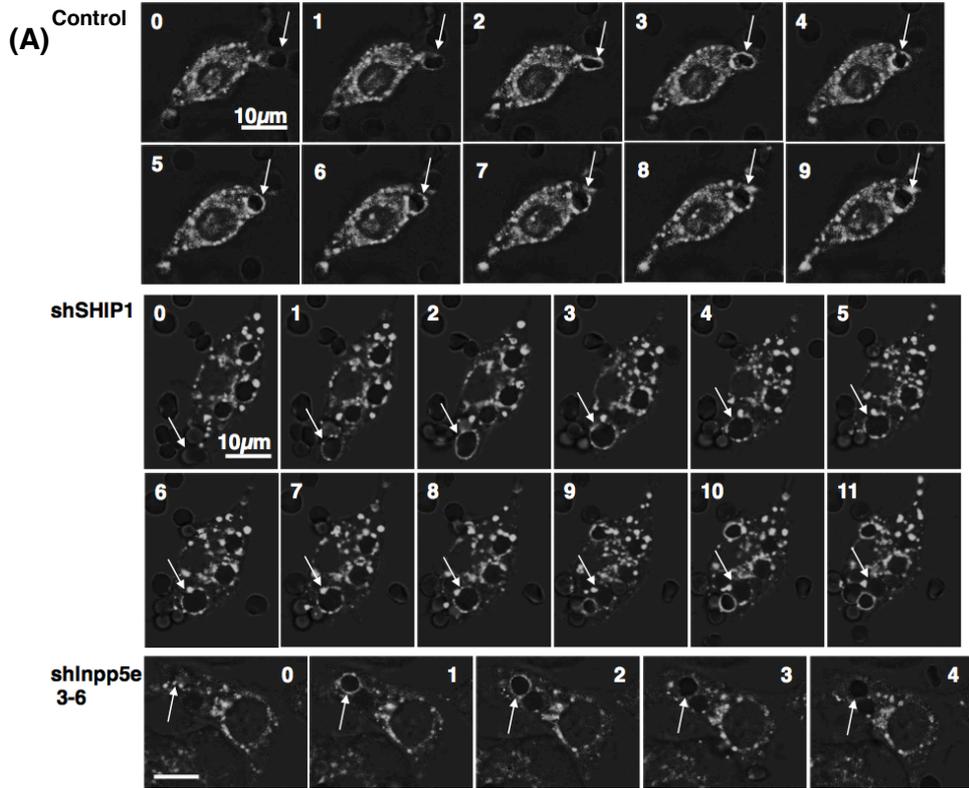


Fig. 9 食胞への Rab5 の動員は shInpp5e 細胞で減少する (A、B) コントロール shSHIP1、shInpp5e 細胞に EGFP-Rab5 を発現させ、IgG 感作赤血球を貪食させた。(A) 生細胞イメージング。(B) 細胞全体の蛍光強度に対する食胞の蛍光強度を定量した (コントロール (○)、shSHIP1 (●)、shInpp5e (■))。(C) コントロール (●)、shInpp5e (▲) 細胞に mCherry-[3 x FYVE(EEA1)]と EGFP-Rab5 (Q79L) を共発現させ、IgG 感作赤血球を貪食させた。EGFP-Rab5 (Q79L) を発現した細胞での食胞の mCherry の蛍光強度を定量した。(B、C) 3 つの細胞を測定した結果を、平均値±標準誤差で示している。(*P < 0.05、**P < 0.01)

1-2-4 Inpp5e と Rab20 の食胞での会合

Rab ファミリーGTPase は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTPase に分類される。GTP 結合型と GDP 結合型を交替することで下流の効果器として機能するタンパク質の活性を調節する。その結果、細胞内小胞輸送において必須の役割を担う。ヒトでは 60 種類が報告されており、その下流の効果器分子について、イーストツーハイブリッドで網羅的な解析が行われた[26]。この報告において Fukuda らは、Inpp5b と OCRL と呼ばれる二種類の PtdIns 5 位脱リン酸化酵素は Rab5 と直接会合すること、一方 Inpp5e は Rab20 と会合する可能性があることを示している。しかし、こうした網羅的な実験の常として、実際に細胞内でこの会合が起こるか、またその生理的な役割は何かという結論には至っていない。そこで次に、私は Rab20 と Inpp5e の会合が食胞で観察されるかを検討した。

野生型 Raw264.7 細胞に mCherry-Inpp5e と EGFP-Rab20 を発現させた。mCherry-Inpp5e は既に報告があるように、食胞での局在が確認された[21]。EGFP-Rab20 は核周囲や食胞に局在し、マージ画像から Inpp5e と Rab20 が食胞膜で共局在することが分かった (Fig. 10A)。

次にコントロール細胞または shInpp5e 細胞に EGFP-Rab20 を発現させ、食胞膜での動態を観察した。EGFP-Rab20 はコントロール細胞では食胞上に少なくとも 20 分は存在した。一方で shInpp5e 細胞においては EGFP-Rab20 はコントロールと同様のタイミングで食胞に現れるが、10 分ともたず消失した (Fig.10B、10C)。従って、Rab20 は Inpp5e によって食胞に繫留される可能性がある。Rab20 はしかし、Vps34 を効果器としない。従って、PtdIns(3)P の増加に寄与することも考えにくい。ところが、この論文の執筆中に、Rab20 と Rab5 がいずれも Rabex5 という RabGEF によって活性化されることが報告された。そこで、Rab20-Rabex5-Rab5→PtdIns(3)P という流れを仮定して、Rab20 過剰発現による PtdIns(3)P の動態への影響を検討した。野生型 Raw264.7 にコントロールとして GFP を発現させた細胞では、PtdIns(3)P は食胞膜に約 10 分間蓄積した一方で、GFP-Rab20 の過剰発現によってその蓄積は明らかに増加した (Fig. 11A、11B)。従って、Inpp5e が食胞に Rab20 をリクルートし、その結果さらに Rab5 が来て PtdIns(3)P の産生を促進させていることが明らかになった。

Fig. 10

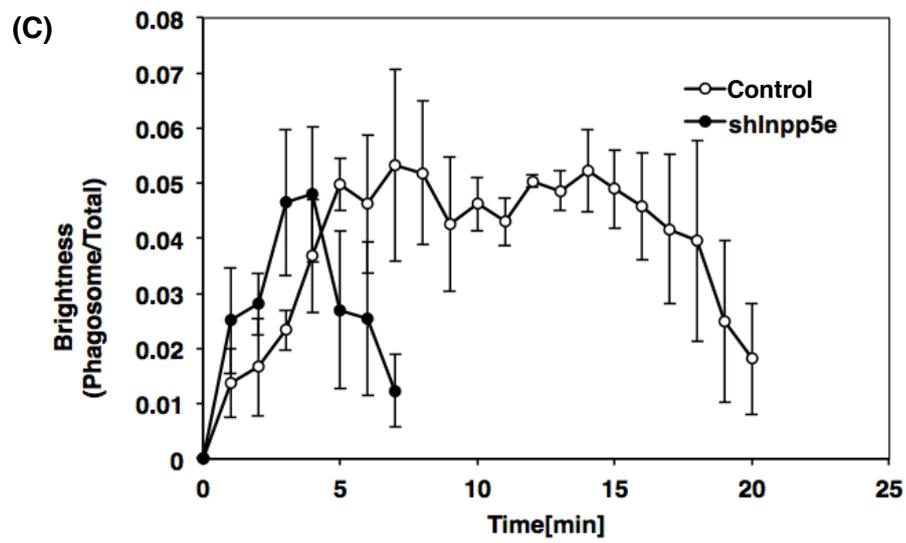
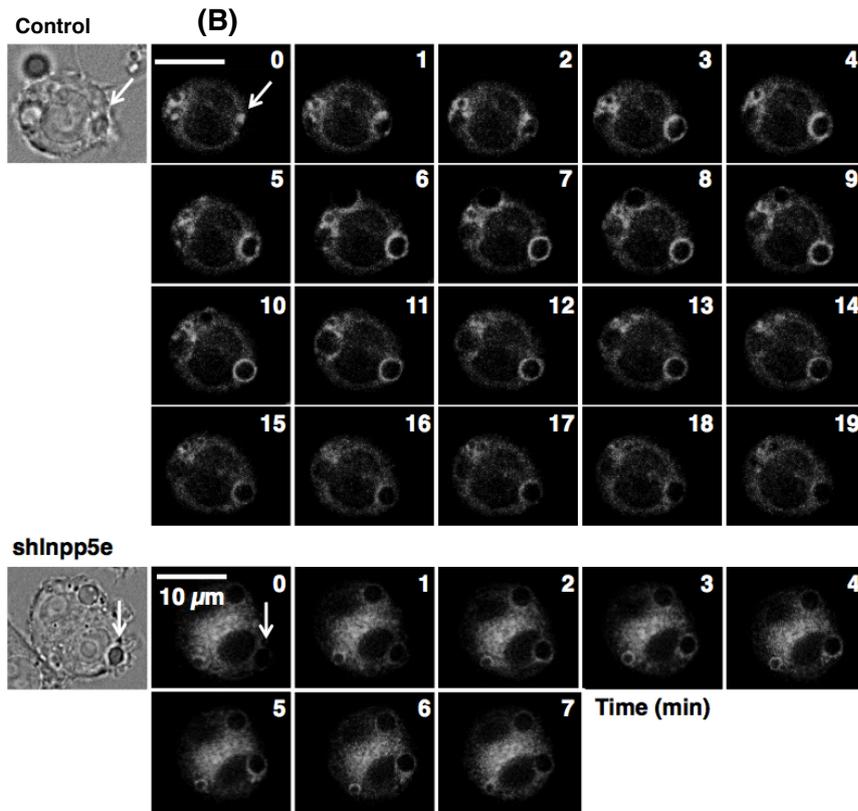
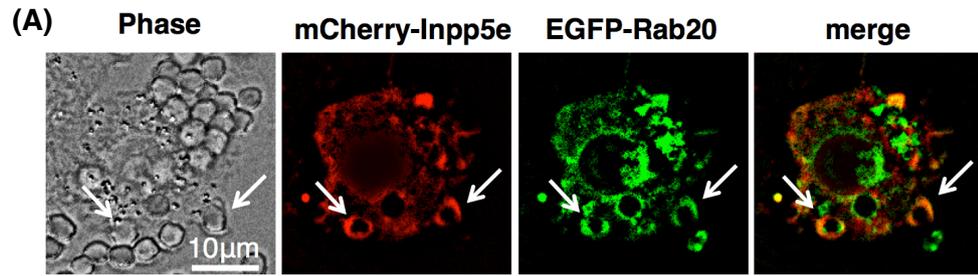


Fig. 10 Inpp5e と Rab20 は食胞で共局在する (A)野生型 Raw264.7 細胞に mCherry-Inpp5e と EGFP-Rab20 を遺伝子導入し、IgG 感作赤血球を添加後 15 分間インキュベートした後洗浄した。細胞を paraformaldehyde で固定し、顕微鏡解析を行った。イメージングに際して、Z スタックは 8 μm の z 軸距離にわたって 1 μm 間隔で撮影した。(B、C) コントロール、shInpp5e 細胞に EGFP-Rab20 を遺伝子導入し、IgG 感作赤血球を添加した。(B) 生細胞イメージング。矢印は食胞を示す。(C) 食胞および細胞全体の蛍光強度を定量した。コントロール (○)、shInpp5e (●) で示している。細胞全体に対する食胞の蛍光強度を算出しグラフ化した。3 つの細胞を測定した結果を、平均値 \pm 標準誤差で示している。

Fig. 11

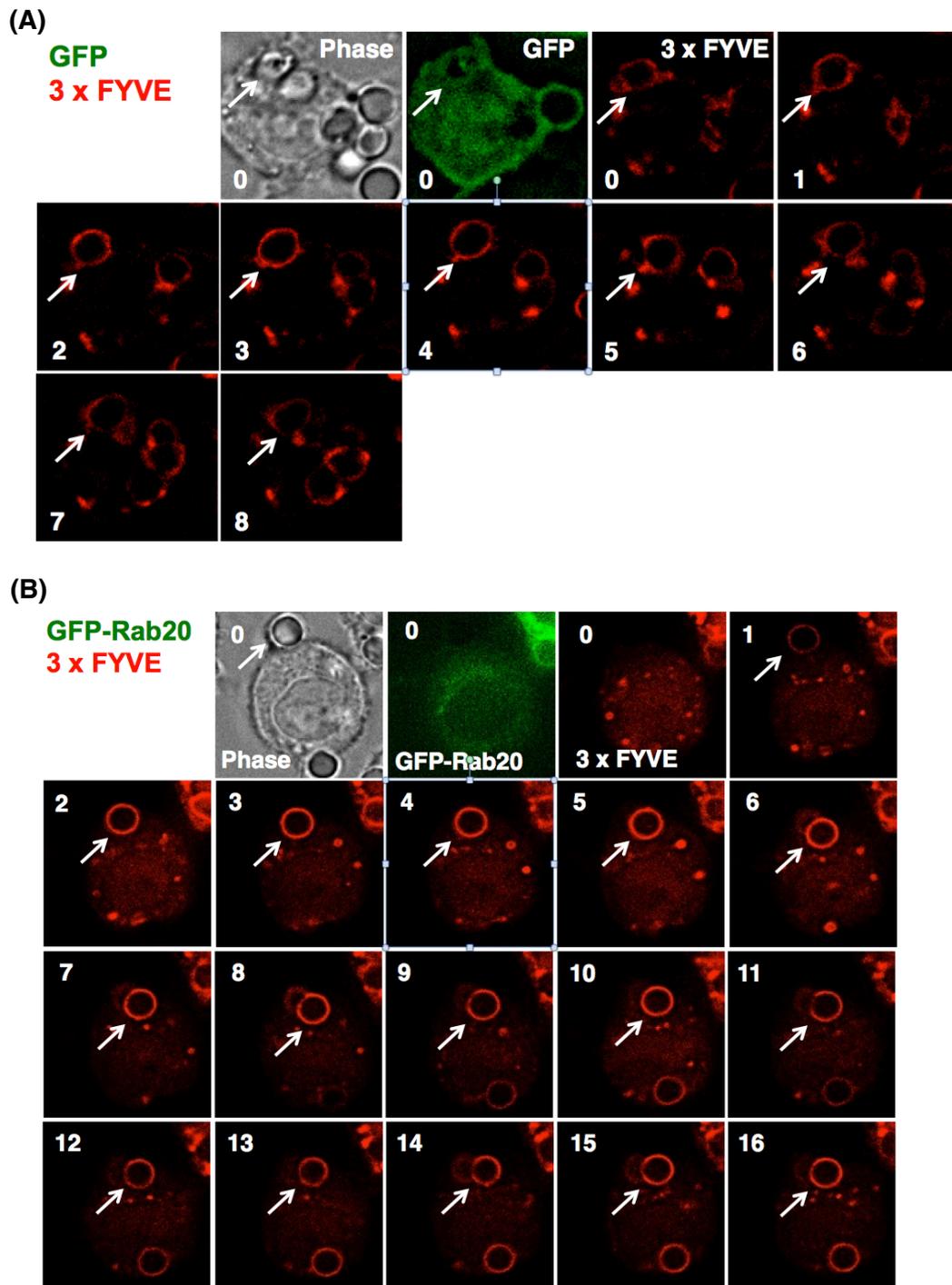


Fig. 11 Rab20 発現細胞で食胞の PtdIns(3)P は持続する (A、B) 野生型 Raw264.7 細胞に mCherry-[3 x FYVE(EEA1)]および (A) GFP、(B) GFP-Rab20 を共発現させ、IgG 感作赤血球を貪食させた。矢印は食胞を示している。

1-3 考察

Inpp5e 欠損細胞では非感作 zymosan、補体結合 zymosan または抗体感作赤血球の貪食の亢進が見られた。貪食初期に形成される phagocytic cup の閉鎖には PtdIns(3,4,5)P₃が必要と考えられている[8], [9]。shInpp5e 細胞ではこのリン脂質の蓄積量が増加していた。つまり Inpp5e は PtdIns(3,4,5)P₃ を分解することで異物の取り込みを負に制御していると考えられる。

大きな異物の取り込みの際、食胞に蓄積した PtdIns(3,4,5)P₃ は 5 位、4 位を連続的に脱リン酸化され、PtdIns(3,4)P₂ を経て PtdIns(3)P へと変換される。予想通り shInpp5e 細胞では、PtdIns(3,4,5)P₃ が増加した一方、PtdIns(3,4)P₂ と PtdIns(3)P は減少した。食胞の PtdIns(3)P の 30% は PtdIns(3,4,5)P₃ から PtdIns(3,4)P₂ を経て産生され、残りは PtdIns から産生されるとの報告がある[24], [25]。shInpp5e 細胞で見られた PtdIns(3)P の減少は、PtdIns(3,4)P₂ の減少度合いだけでは説明するにはあまりに極端であった。PtdIns(3)P 産生の大部分は Vps34 による PtdIns の 3 位リン酸化によるものであり、これは Rab5 によって制御される。shInpp5e 細胞で Rab5 の食胞での局在は明らかに短縮した一方で、shSHIP1 細胞では変化がなかったことから、Rab5 を食胞に動員することは 5 位脱リン酸化酵素に共通の機能ではなく Inpp5e に特異的であると考えられる。

イーストツーハイブリッド法で Inpp5e と Rab20 の会合が示されている[26]。さらに最近の報告では Rab20 が食胞に存在し、成熟を制御することが示されている[27]。そこで私は Inpp5e が Rab20 を食胞にリクルートすることでホスフォイノシチドの代謝や食胞成熟を制御しているのではないかと考えた。Inpp5e と Rab20 は食胞で共局在し、また、shInpp5e 細胞では Rab20 の食胞への動員が抑制された。さらに、Rab20 の過剰発現によって PtdIns(3)P 蓄積が増加したことから、Inpp5e は Rab20 を食胞に局在させ、その結果として PtdIns(3)P 産生を増大させていると言える。本研究は貪食と食胞成熟における Inpp5e のユニークな機能を初めて明らかにした (Fig. 12)。

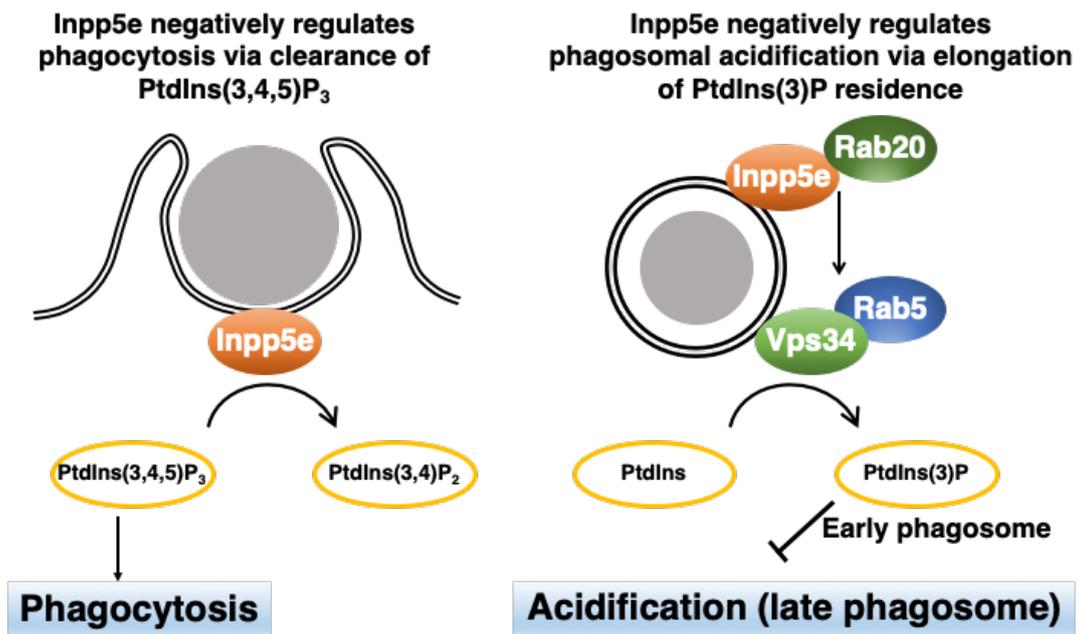


Fig. 12 Inpp5e は貪食過程で2つの役割をもつ

第2章

マクロファージの FcγRIIb は抗体感作異物の貪食時に食胞酸性化と食胞膜リン脂質の連続的脱リン酸化を調節する

貪食は自然免疫および獲得免疫における重要なプロセスであり、特殊な食細胞による微生物やアポトーシス細胞などの大きな粒子を取り込む過程を指す。貪食の過程には特異的な細胞表面受容体が関与する。マンノース-フコース受容体、dectin 1、TLR のような受容体は、微生物の保存されたモチーフを認識することで、病原体と直接相互作用する。他方、食細胞は異物の表面分子と相互作用するオプソニン（抗体や補体などの血清成分）を認識する受容体を持つ。食細胞のオプソニン受容体の凝集は異物に対する膜の伸展を誘発し、phagocytic cup が形成される。新たに形成された食胞は次第に「成熟」する。これはファゴリソソームの形成に至る一連の融合・分裂事象である。マクロファージにおいて、成熟は外来抗原の交差提示のために不可欠な過程である。

本章では異物粒子のオプソニン化の有無による PIs の動態の変化に着目し、これに関与する受容体、FcγRIIb とその下流でのシグナル伝達について解析を行った。

2-1 実験方法

2-1-1 細胞

1-1-1 に準じて各欠損細胞を樹立した。

Table. 2 shRNA の標的配列

PTEN		5'-gaacaatattgatgatgta-3'
SHIP1		5'-ggaatgaaatgcttgaaga-3'
SHIP2		5'-gacctgaactacattagt-3' and
		5'-gaatggattagcattgata-3'
Inpp4a	1	5'-gagatacgtccttacaaga-3'
	2	5'-gtcactcaggccacttca-3'
Inpp5e		5'-gcatcgtgtctcagatcaa-3'
Inpp5b		5'-ccgagtccttcacgattca-3'
		5'-gccttcttcttcacgata-3'
OCRL		5'-ggataaacctgcttattca-3'
FcγRIIb	247	5'-gacacggtgacactgacat-3'
	857	5'-ctgaggetgagaatacagat-3'

Table. 3 定量 PCR に用いたプライマー配列

Inpp5b	(+) CGTGCAGAAGTTTGGGCTTC (-) CAGGGCCGGAGACATTCTTT
Inpp5e	(+) GGACGAGACAACATC CCATT (-) CCATCCTTTGCAGTGACC TT
OCRL	(+) TGAAGGTACCAGTGAGCGAC (-) TCCTGCATTCCAGGGGTTTG
FcγRIIb	(+) AGCAGGTTCCAGACAATCCTC (-) TTCTTCATCCAGGGCTTCGG

2-1-2 zymosan のオプソニン化

1-1-3 に準じる。

2-1-3 食食過程における PIs の動態観察

EGFP-Akt-PH を 1-1-5 に準じて各細胞にトランスフェクトした。

撮影は 1-1-6 に準じる。

2-1-4 食胞酸性化の解析

FITC の蛍光が pH の低下につれて消失することを利用して新たな食胞酸性化アッセイ系を確率した。FITC-zymosan を IgG でオプソニン化した。これを細胞に添加し、37 °C の条件下で食食させた。5 分毎に蛍光画像を撮影し、FITC の蛍光強度を測定した。コントロールとして pH 感受性のない Texas Red-zymosan を用いて同様の定量を行った。

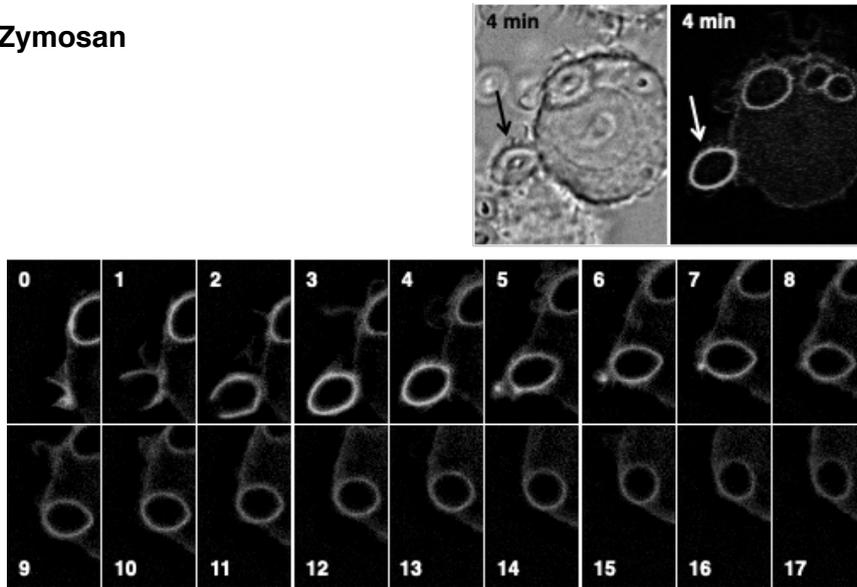
2-2 結果

2-2-1 粒子の IgG オプソニン化による PIs 動態への影響

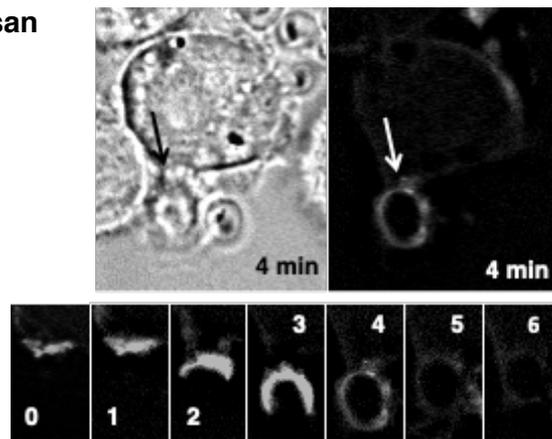
PtdIns(3,4,5)P₃ と PtdIns(3,4)P₂ に同程度の親和性で結合する EGFP-Akt-PH を Raw264.7 細胞（マクロファージ）に発現させて zymosan を添加した。EGFP-Akt-PH の蛍光は形成途中の phagocytic cup に現れ（0-2 分）、食胞閉鎖時にピークに達し（3-4 分）、その後ゆっくりと消失していった（Fig. 13A）。一方、zymosan を IgG でオプソニン化した場合（IgG-zymosan）、蛍光は同じよう出現するが、cup 閉鎖後急速に消光した（Fig. 13B）。(C) は(A)、(B) を比較したグラフである。抗体で感作された異物を取り込んだ食胞の方が PtdIns(3,4,5)P₃ 及び PtdIns(3,4)P₂ の消失が早いことは明らかである。

Fig. 13

(A) Zymosan



(B) IgG-Zymosan



(C)

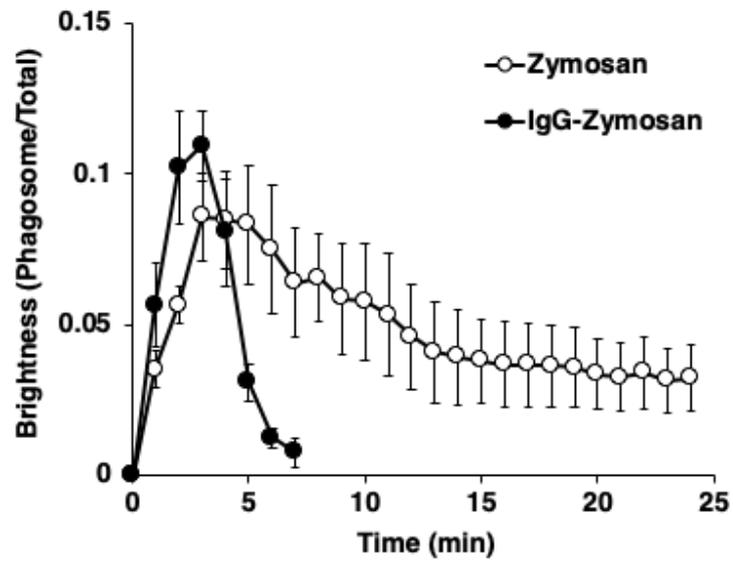


Fig. 13 PtdIns(3,4,5)P₃、PtdIns(3,4)P₂は抗体感作された異物を含む食胞膜からは、速やかに消失する Raw264.7 細胞に EGFP-PH(Akt)を遺伝子導入した。細胞に (A) zymosan、(B) IgG-zymosan を添加し、蛍光を 1 分ごとに観察した。(C) 細胞全体に対する食胞の蛍光強度を算出した。3 回の実験 (それぞれ 3 つの食胞を観察) から得られた結果を、平均値±標準誤差で示している。

2-2-2 脱リン酸化酵素ノックダウンによる PIs 動態への影響

PtdIns(3,4,5)P₃は食胞上で PtdIns(3,4)P₂、PtdIns(3)P と代謝されるか、または PtdIns(4,5)P₂へと代謝される (Fig. 3)。各種脱リン酸化酵素を欠損した Raw264.7 細胞を樹立し (Fig. 14)、IgG オプソニン化で促進される EGFP-[PH(Akt)]蛍光の消失に対する影響を検討した。3 位脱リン酸化酵素である PTEN の欠損によって蛍光消失は極端に遅延した (Fig. 10A)。type III 5 位脱リン酸化酵素である SHIP1、SHIP2 いずれかの欠損も消光の遅延がみられた (Fig. 14B、14C)。しかし、他の 5 位脱リン酸化酵素である Inpp5e や Inpp5b、OCRL の欠損はいずれも蛍光強度にほとんど影響を及ぼさなかった [21], [28]–[31] (Fig. 14E–14G)。

また、PtdIns(3,4)P₂を分解する 4 位脱リン酸化酵素、Inpp4a の欠損は食胞からの EGFP-Akt-PH の解離を抑制し、PtdIns(3,4,5)P₃と PtdIns(3,4)P₂が代謝されずに蓄積し続けていることが明らかになった[32] (Fig. 14D)。以上より抗体感作 zymosan を含む食胞の PtdIns(3,4,5)P₃は SHIP1, 2 によって 5 位が脱リン酸化され、次いで Inpp4a によって 3 位が脱リン酸化され消失するか、または PTEN によって 3 位が脱リン酸化されることが判明した。

Fig. 14

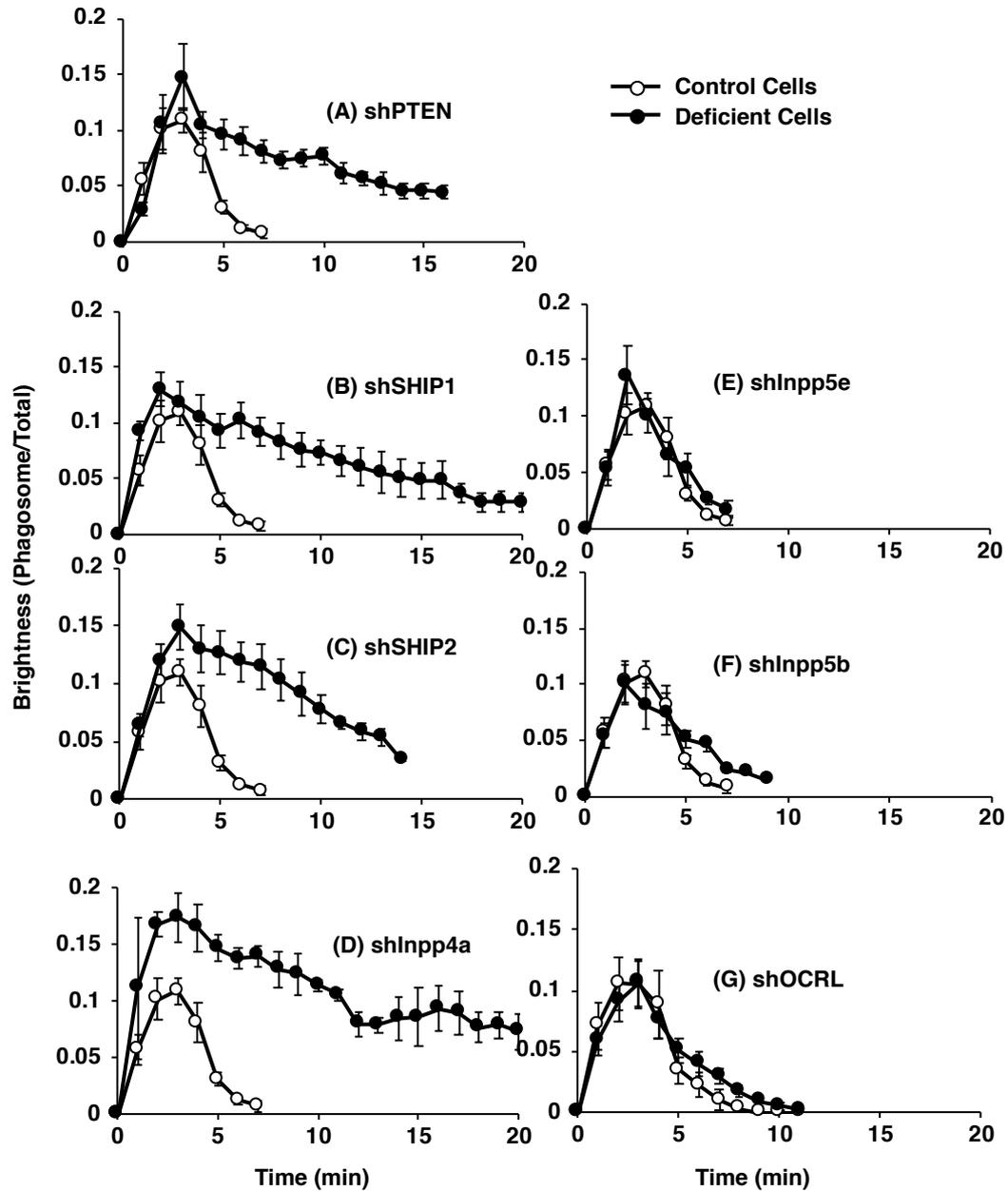


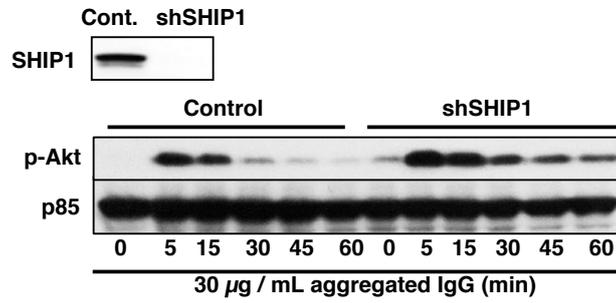
Fig. 14 PtdIns(3,4,5)P₃、PtdIns(3,4)P₂の消失における各脱リン酸化酵素の役割 (A) PTEN、(B) SHIP1、(C) SHIP2、(D) Inpp4a、(E) Inpp5e、(F) Inpp5b、(G) OCRLを欠損したRaw264.7細胞を樹立した。コントロール(○)欠損細胞(●)にEGFP融合Akt-PHを遺伝子導入した。細胞にIgG-zymosanを添加し、細胞全体に対する食胞の蛍光強度を定量した。3回の実験(それぞれ3つの食胞を観察)から得られた結果を、平均値±標準誤差で示している。

2-2-3 SHIPs や Inpp4a 欠損による Akt リン酸化への影響

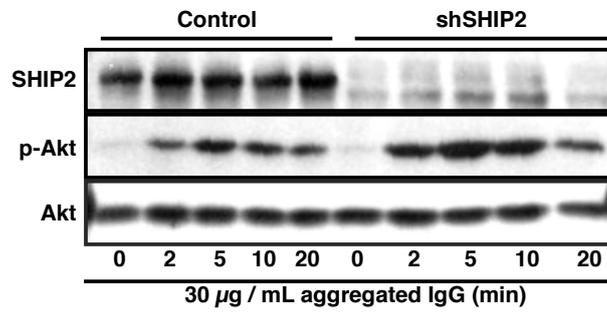
次に抗体架橋によってマクロファージの Fc γ R を刺激した時の Akt のリン酸化を検討した。SHIP1、SHIP2、Inpp4a の欠損細胞では Akt のリン酸化は明らかに増強していた (Fig. 15A-15C)。これは食胞膜に Akt-PH が蓄積すること、即ち PtdIns(3,4,5)P₂ と PtdIns(3,4)P₂ が蓄積することを反映している。対照的に shOCRL 細胞や shInpp5b 細胞では Akt リン酸化の増強はわずかであった (Fig. 15E)。また、shInpp5e 細胞では食胞の Akt-PH の蓄積はコントロール細胞と変化がなかったのに対し、リン酸化は顕著に増強していた (Fig. 15D)。食胞以外の細胞膜において Akt 活性が維持されている可能性がある。

Fig. 15

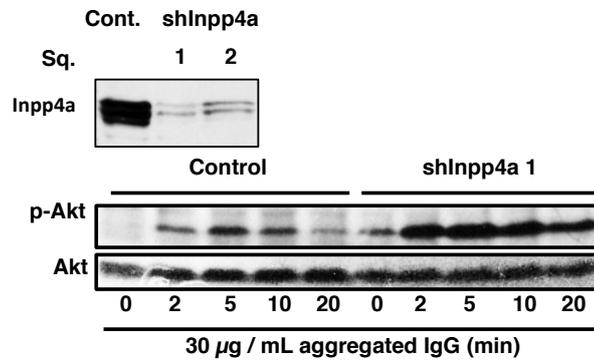
(A) SHIP1



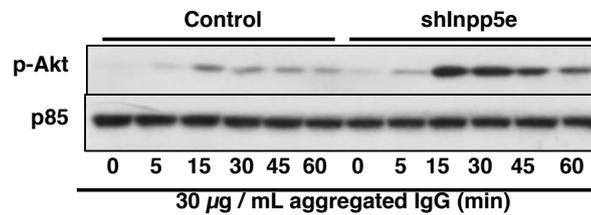
(B) SHIP2



(C) Inpp4a



(D) Inpp5e



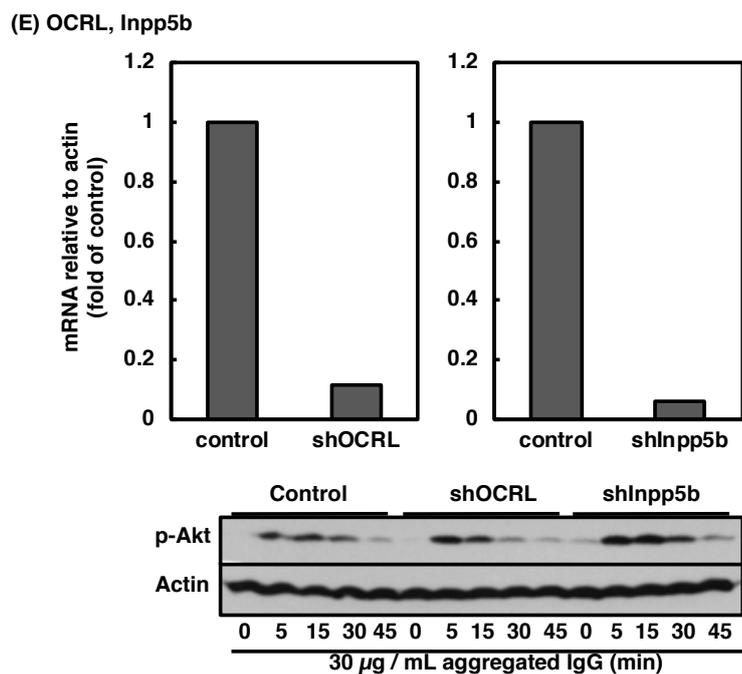


Fig 15 脱リン酸化酵素欠損による Akt リン酸化への影響 コントロール細胞または (A) SHIP1、(B) SHIP2、(C) Inpp4a、(D) Inpp5e、(E) OCRL、Inpp5b の欠損細胞に 30 μ g/mL の凝集 IgG を添加し、図に示した時間インキュベートした。SDS-PAGE でタンパク質を分離後リン酸化 Akt を検出した。アプライ量のコントロールとして total Akt、p85、Actin を検出している。

2-2-4 FcγRIIb ノックダウンによる IgG 誘発性 PI_s 消失促進への影響

FcγRIIb は細胞質側に免疫抑制性チロシンモチーフ (ITIM) を有する抑制性の IgG 受容体であり、リン酸化された ITIM には SHIP1 や SHIP2 が結合する[25]。そこで 2 系統の FcγRIIb 欠損株 (247、875) を樹立した (Fig. 16A)。IgG 誘発性の Akt のリン酸化はこの受容体のノックダウンによって顕著に増加した (Fig. 16B)。また IgG-zymosan 貪食時の食胞からの Akt-PH の速やかな消失は、FcγRIIb 欠損細胞で明らかに遅延した (Fig. 16C)。貪食される zymosan が IgG でオプソニン化されていない場合、FcγRIIb の欠損は Akt-PH の解離に影響しなかった (Fig. 16D)。従って、抗体感作によって Akt-PH の食胞からの離脱が促進する機構は、FcγRIIb に SHIP1 と SHIP2 がリクルートされて、PI(3,4,5)P₃ の 5 位を脱リン酸化し、次いで Inpp4a が 4 位を脱リン酸化する結果であることが明らかになった。

Fig. 16

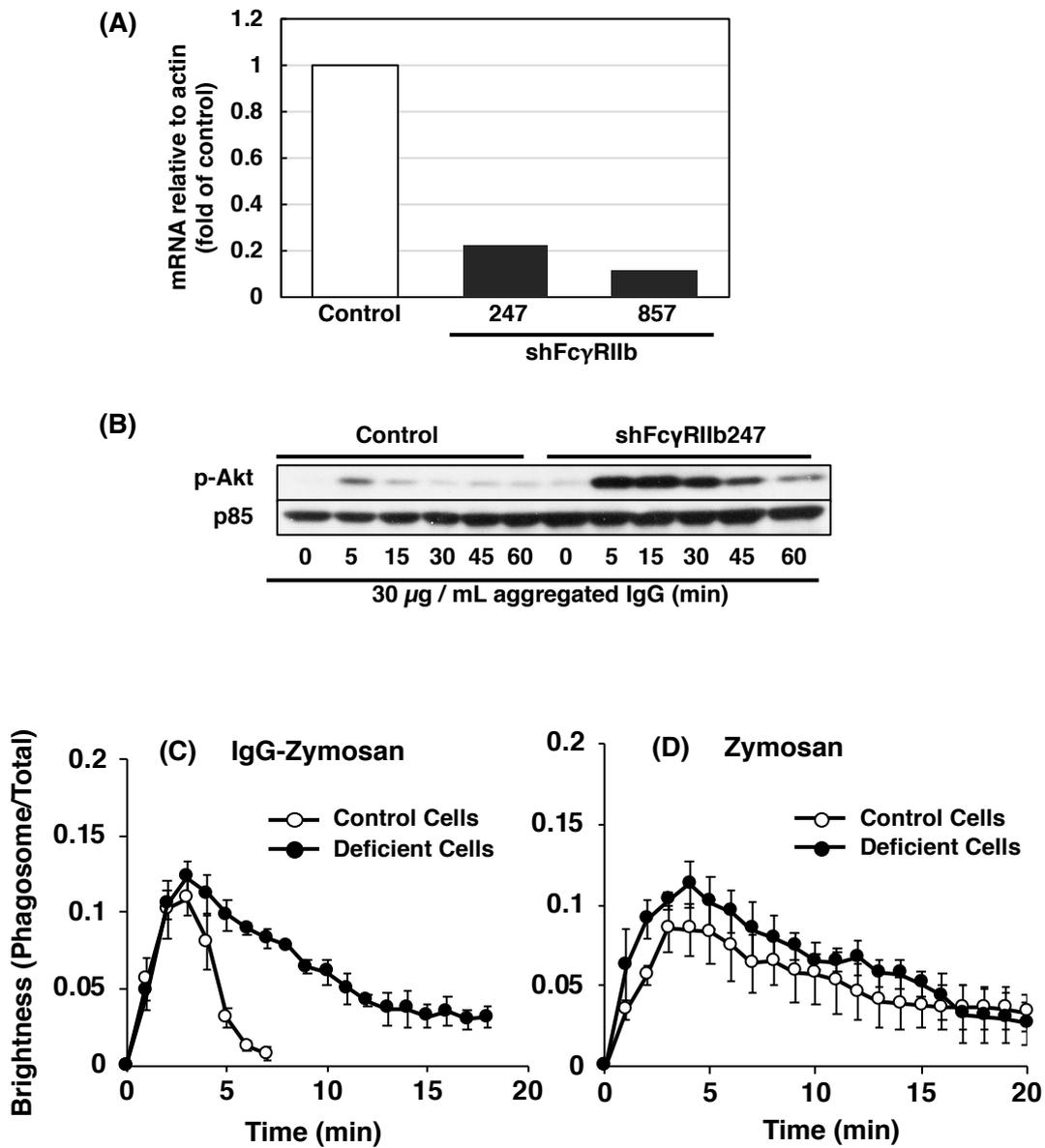


Fig. 16 PtdIns(3,4,5)P₃、PtdIns(3,4)P₂の消失における FcγRIIb の役割 (A) 2 系統の Raw264.7 細胞株 (クローン 247、857) での FcγRIIb の mRNA 発現量の比較。(B) コントロール細胞と 247 細胞を 30 μg/mL の凝集 IgG で刺激した。細胞の可溶化液を抗リン酸化 Akt (pSer473) 抗体を用いてウェスタンブロッティングで検出した。(C、D) コントロール細胞 (○)、247 細胞 (●) に EGFP 融合 Akt-PH を遺伝子導入し、(C) IgG-zymosan、(D) 非オプソニン化 zymosan を貪食させ、細胞全体に対する食胞の蛍光強度を定量した。3 回の実験 (それぞれ 3 つの食胞を観察) から得られた結果を、平均値±標準誤差で示している。

2-2-5 FcγRIIb ノックダウンによる食胞酸性化への影響

取り込まれた異物は、食胞酸性化によって分解される。そこで次に FcγRIIb が食胞酸性化に及ぼす影響を調べた。Fig. 17 では FITC 標識 zymosan (緑) または Texas Red 標識 zymosan (赤) を IgG で感作している。Raw264.7 細胞にこれらの zymosan の混合物を添加した。粒子 1 は細胞に取り込まれていない IgG-FITC-zymosan である。この蛍光強度は観察の間で変化しなかった。粒子 2 は取り込まれて食胞内部に存在する IgG-FITC-zymosan である。この蛍光は徐々に減弱した。FITC の蛍光は酸性 pH に高感度であるため[33]、この結果は食胞内部が酸性化していることを示している。対照的に食胞内の Texas Red-zymosan (粒子 3) の蛍光は pH の変化に感受性がないため、観察中の変化は見られなかった。

FITC の蛍光の消失は FcγRIIb 欠損細胞で減速した (Fig. 17B)。この結果は Inpp4a 欠損細胞でも確認された (Fig. 17C)。従って食胞に PtdIns(3,4,5)P₃ 及び PtdIns(3,4)P₂ が存続する間、酸性化は進行しないと考えられる。また、一般に食胞の酸性化が早いと、異物が適当な大きさのペプチド断片にならない (細かくなりすぎる) ため抗原提示には不利である。IgG を介さない (=抗体でオプソニン化されない) 異物がゆっくりと消化されることは抗原提示に有利であるという意味で合目的的であると考えられる。

Fig. 17

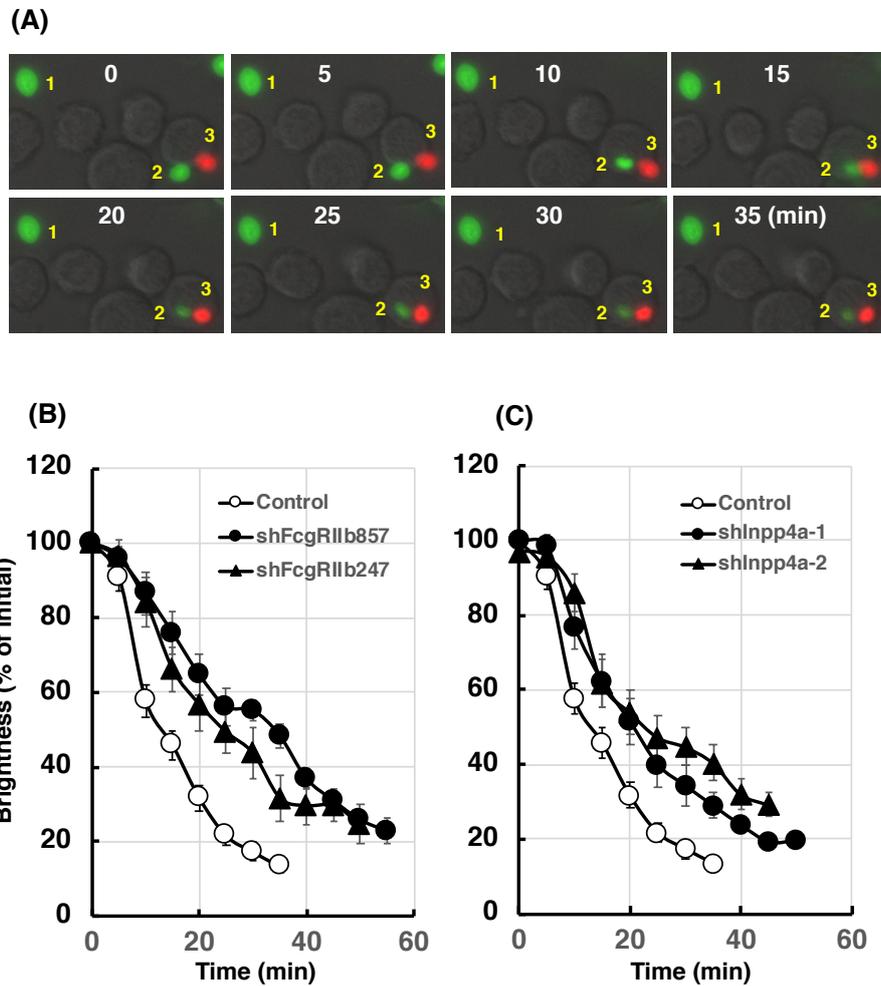


Fig. 17 FcγRIIb 欠損細胞で食胞酸性化が遅延する (A) FITC 標識 (緑)、Texas Red 標識 (赤) zymosan を IgG でオプソニン化した。Raw264.7 細胞にこれらの zymosan 粒子の混合物を添加し、それぞれの蛍光を 5 分ごとに観察した。粒子 1 : 実験中に取り込まれなかった FITC 標識 IgG-zymosan、粒子 2 : 取り込まれた FITC 標識 IgG-zymosan、粒子 3 : Texas Red 標識 IgG-zymosan。(B、C) コントロール細胞 (○) FcγRIIb 欠損細胞 (●、▲、B)、Inpp4a 欠損細胞 (●、▲、C) に FITC 標識 IgG-zymosan を添加し、取り込まれた zymosan の蛍光を 5 分ごとに観察した。3 回の実験 (それぞれ 10 個の食胞を観察) から得られた結果を、平均値±標準誤差で示している。

2-3 考察

PTEN 欠損によって Akt-PH の食胞局在が顕著に延長したことから、PtdIns(3,4,5)P₃ の大部分は PtdIns(4,5)P₂ へと分解されると考えられる。また Akt-PH は PtdIns(3,4,5)P₃ と PtdIns(3,4)P₂ に同等の親和性で結合するため[34]、このプローブの解離は食胞から両リン脂質が消失したことを意味する。SHIP は PtdIns(3,4,5)P₃ を分解して PtdIns(3,4)P₂ を産生するため、オプソニンとしての IgG が誘発する Akt-PH の解離加速は PtdIns(3,4)P₂ がさらに代謝され、効果的に除去されていることを示すと考えられる。事実、PtdIns(3,4)P₂ を分解する 4 位脱リン酸化酵素、Inpp4a の欠損は Akt-PH の解離を抑制した。本研究にとって好都合なことに、Raw264.7 細胞においては Inpp4b の mRNA を検出できなかった。このため、Inpp4a がこの細胞で唯一の PtdIns(3,4)P₂ の 4 位脱リン酸化酵素であると考えられる。

凝集 IgG による Akt のリン酸化は細胞内の PtdIns(3,4,5)P₃ と PtdIns(3,4)P₂ の量に依存する。食胞膜からの Akt-PH の解離遅延の結果から想像できるように、SHIP1、SHIP2、Inpp4a の欠損細胞で Akt のリン酸化は増強した (Fig.15)。一方で Inpp5e 欠損細胞では Akt-PH の動態は変化しなかったが、Akt のリン酸化は増強していた。この欠損細胞における Akt リン酸化の増強は食胞膜ではなくて、細胞膜に限局しているのかもしれない。

本研究では抗体で感作された異物は、抑制性の FcγRIIb 受容体に会合する 5 位脱リン酸化酵素 SHIP1, SHIP2 と 4 位脱リン酸化酵素 Inpp4a が食胞にリクルートされることによって速やかな分解を受けることを示した。逆にこのことは抗体で感作されていない異物はゆっくりと分解されて抗原提示され、獲得免疫を導くのに有利となることを示唆している。

第3章 総括

本研究ではマクロファージの食食におけるイノシトールリン脂質の動態について、以下の知見を得た。

(1) マクロファージの食食活性及び食胞成熟は *Inpp5e* によって調節される

Inpp5e はイノシトールリン脂質 5 位脱リン酸化酵素であり、 $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ を $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ に分解する。 $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ は 4 位脱リン酸化酵素によって $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ に変換されるため、*shInpp5e* 細胞における $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ の減少の原因として $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ の産生減少が考えられる。この予測どおり、*shInpp5e* 細胞では $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ の蓄積が減少していた。しかし、この蓄積減少だけでは欠損細胞における $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ の明らかな減少 (50%以上) を完全には説明できない。なぜなら、 $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ 蓄積に関するこの経路の寄与は多くて 30%であると報告されているからである。*Vps34* はクラス III PI3 キナーゼであり、 PtdIns を $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ にリン酸化する。食胞成熟におけるこの酵素の主要な役割が示されている。それ故に私は、*Inpp5e* が *Vps34* 活性を調節することによって $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ の蓄積に影響を及ぼすことを仮定してみた。*Vps34* を活性化するのは食胞へリクルートされた *Rab5* であることが明らかになっている。そこで *shInpp5e* 細胞においてこれを検討したところ、この細胞では *Rab5* はほとんど食胞へ来なかった。

Rab5 と *Inpp5e* は会合するのか。2008 年 Fukuda らは *Rab* 結合タンパク質の網羅的解析を行っている。*Rab5* は多くの PtdIns 脱リン酸化酵素と会合する。にも関わらず、*Inpp5e* との結合は記載がなかった。代わりに *Rab20* と *Inpp5e* の会合の可能性が示唆されていた。これに基づいて、私は *Inpp5e* が *Rab20* を食胞へリクルートすることを発見した。結果として、*shInpp5e* 細胞では *Rab5* とともに *Rab20* の食胞への動員が減少することを確認した。さらに、私のこうした実験と時期を同じくして、*Rab20* と *Rab5* はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である *Rabex5* を共通に利用することが報告された [27]。従って、*Inpp5e* は *Rab5*、*Rab20* および *Rabex5* を食胞に繋ぎ止めることによって *Vps34* 活性を維持し、 $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ 産生を増強することができると考えられる。

SHIP1、SHIP2、OCRL1、*Inpp5b*、そして *Inpp5e* のような多数のイノシトールリン脂質 5 位脱リン酸化酵素は食食の制御に関与している [17], [18], [20]–[22], [30]。これらの中で、SHIP1 や SHIP2 は構造的な相関がある。これらの酵素は SH2 ドメインを有し、免疫受容体の ITIM に結合する [17]。興味深いことに、これら酵素の一方の欠損は食食を亢

進させるのに十分であり、機能が完全には重複していないことを示唆している。OCRL1 や Inpp5b は触媒的に不活性な RhoGAP ドメインや ASH ドメインを有し、微小管に結合する[17]。これらの酵素は PtdIns(4,5)P₂ を除去するという点で SHIPs とは異なり、クラスリン介在性エンドサイトーシスに関与している[25]。それらは Rab5 によって食胞に動員され、食胞での Akt シグナルを減弱させることが報告されている[30]。しかし、OCRL1 または Inpp5b いずれかの欠損が異物の取り込みを増加させるかは報告されていない。本研究では、私はまた別の 5 位脱リン酸化酵素である Inpp5e の欠損が赤血球や zymosan 粒子の取り込みを増加させることを確認した。この結果は Inpp5e が他の 5 位脱リン酸化酵素にはない特異的な機能を有していることを示唆する。

Inpp5e のノックダウンは Rab20 の食胞での局在を減少させた。これは食胞の酸性化促進に関与し得る。この考えは、酸性化が野生型 Rab20 によって阻害されるが、ドミナントネガティブ変異体や Rab20 を標的とする shRNA によって増加することを示す以前の研究と一致する[27]。対照的に、Rab20 のドミナントネガティブ変異体 (T19 N) の発現は食胞成熟を抑制するという報告もある[37], [38]。この矛盾に関して、Pei らは Rab20 や Rab20 T19 N の発現は、例えば 2 時間後のような後期段階においては効果がないと述べた[27]。これと一致して、shInpp5e 細胞では標的粒子添加後 10 から 30 分では酸性化を促進させたが、2 時間後では差がなかった。

以前の論文では、Rab20 が食胞成熟初期段階の遅れに関与していることが示された[27]。この著者らはインターフェロン γ (IFN γ) が Rab20 と初期ファゴソームの会合を刺激し、食胞成熟を遅延させることを示したが、これはマクロファージにおける適切な抗原の交差提示に重要である。従って、IFN γ が誘発する食胞成熟初期段階の遅延に Inpp5e が関与する可能性を調べることは興味深いと考える。

(2) 抑制性 Fc γ RIIb は SHIPs を介して食胞膜上の PtdIns の連続的脱リン酸化を促進させ、その結果食胞成熟を促進する。

食胞膜上の PI 種の相対的存在量は、貪食過程で変動する[39]。phagocytic cup の形成時は PtdIns(3,4,5)P₃ が急激に増加する[7]。cup 閉鎖後、PtdIns(3,4,5)P₃ は消失し、新生ファゴソームは成熟と呼ばれるプロセスによって病原体除去に必要な殺菌性および分解性の能力を獲得する[40]。SHIP1[7]、SHIP2[19]、OCRL[28], [29]、Inpp5b[30]および Inpp5e[21], [31]は試験管内で PtdIns(3,4,5)P₃ に対する 5-ホスファターゼ活性を有し、新生ファゴソームに結合することが報告されている。

本研究ではイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素欠損細胞を作製し、遺伝子導入した EGFP-Akt-PH の貪食過程における局在を調べた。私は貪食される粒子が IgG でオプソニ化されている場合、このプローブの新生ファゴソームからの解離が加速されることを観察した。SHIP1 または SHIP2 のノックダウンは IgG による解離の加速を抑制した。Akt-PH は PtdIns(3,4,5)P₃ と PtdIns(3,4)P₂ の両方に同等の親和性で結合する[34]。従って、このプローブの解離は両リン脂質が食胞から除去されたことを示す。SHIPs は PtdIns(3,4,5)P₃ を加水分解し、PtdIns(3,4)P₂ を生成するので、IgG による Akt-PH の解離加速は、PtdIns(3,4)P₂ がさらに代謝され、効果的に除去されることを示唆している。Inpp4a は PI4 ホスファターゼであり、PtdIns(3,4)P₂ を優先的に基質とし[32]、食胞膜に動員されると報告されている[42]。私は Inpp4a の特異的ノックダウンによって、IgG 加速性の Akt-PH の解離が抑制されることを確認した。Inpp4a は IgG 被覆粒子を内包する食胞からの SHIPs 産物、PtdIns(3,4)P₂ を効率的に除去し得る。従って SHIPs および Inpp4a は PtdIns(3,4,5)P₃ を PtdIns(3,4)P₂、PtdIns(3)P へと代謝する連続的な脱リン酸化系を構成すると考えられる。本研究のさらなる興味深い知見は、FcγRIIIa 介在性の貪食に対する抑制性の受容体[43]、FcγRIIb の特異的ノックダウンが、IgG による PtdIns(3,4,5)P₃、PtdIns(3,4)P₂ の消失加速を抑制したことである。この FcγRIIb の効果は、SHIP1 や SHIP2 の動員を介して生じていると考えられる。なぜなら、FcγRIIb のリン酸化された ITIM 領域はこれらの 5 位脱リン酸化酵素と結合することが知られているからである[35]。

Inpp4a^{-/-}マウスの線条体では、細胞表面の NMDA 型グルタミン酸受容体の内部移行が減少する[44]。この事実は、Inpp4a が グラスリン介在性エンドサイトーシスの正の調節因子であることを示している。これとは対照的に、大粒子の取り込みは骨髄系細胞特異的 Inpp4a コンディショナルノックアウトマウス由来のマクロファージにおいて増加する[42]。つまり、Inpp4a は貪食の負の調節因子である。Inpp4a^{-/-}マクロファージでは、IgG の誘発する Akt のリン酸化が顕著に増強され、この酵素の役割が PtdIns(3,4)P₂ の脱リン酸化であることを示している。また、*Escherichia coli* を腹腔内注射された Inpp4a^{-/-}マウスは生存期間が野生型と比べて短縮することも報告されている[45]。Inpp4a 欠損マクロファージでは食胞酸性化がダウンレギュレートされているため、*E. coli* に対する殺菌作用が减弱している可能性がある。

PtdIns(3)P は、EEA1 や Hrs などの様々なタンパク質を動員することによって食胞の成熟および酸性化を促進することが知られている[40]。PtdIns(3)P の合成におけるクラス

III PI3 キナーゼ、Vps34 の主要な役割は、新生ファゴソームおよび初期エンドソームの両方において証明されている[13], [46], [47]。しかしながら、クラス IA PI3 キナーゼや PI5 ホスファターゼ、PI4 ホスファターゼを含むリン酸化—脱リン酸化カスケードは、かなりの量の PtdIns(3)P を産生することが報告されており、これは HeLa 細胞のトランスフェリン取り込みに重要な役割を果たす[25]。本研究は、FcγRIIb の活性化が上記のような連続的脱リン酸化機構を駆動することによって、食胞の PtdIns(3)P 産生を促進させていることを示唆した。さらに、私はオプソニン化粒子上の IgG が食胞の酸性化を促進することを観察した。FcγRIIa はその細胞質ドメインを介してシグナルを伝達することによって、貪食を刺激することが知られている。対照的に、FcγRIIb は COS-1 細胞において FcγRIIa 介在性の貪食を抑制する[43]。最近の研究で、FcγRIIb は免疫寛容および自己免疫と関連付けられている[48]。本研究は、貪食過程における抑制性受容体の新たな役割を示唆した。いったん形成されると、FcγRIIb-IgG 複合体を含む食胞は速やかに処理される。成熟過程では、ER タンパク質が食胞に動員され、分解されたペプチドが MHC クラス II に渡される[49]。ペプチド抗原の緩やかな分解は、獲得免疫の展開に適したペプチド分解パターンの制御に重要であることが報告されている[49]。従って、獲得免疫のために提示する必要のない IgG オプソニン化粒子に対して、FcγRIIb が迅速な分解シグナルを伝達すると推測することは興味深い。

本研究結果は下記の通り公表した。

原著論文

Tomohiro Segawa, Kaoru Hazeki, Kiyomi Nigorikawa, Shin Morioka, Ying Guo, Shunsuke Takasuga, Ken Asanuma, Osamu Hazeki. "Inpp5e increases the Rab5 association and phosphatidylinositol 3-phosphate accumulation at the phagosome through an interaction with Rab20." *Biochemical Journal* 464 (2014): 365-375.

Tomohiro Segawa, Kaoru Hazeki, Kiyomi Nigorikawa, Akiko Nukuda, Tomoki Tanizawa, Kenshiro Miyamoto, Shin Morioka, Osamu Hazeki. "Inhibitory receptor Fc γ RIIB mediates the effects of IgG on a phagosome acidification and a sequential dephosphorylation system comprising SHIPs and Inpp4a." *Innate immunity* 23 (2017): 401-409.

参考文献

- [1] R. S. Flannagan, G. Cosío, and S. Grinstein, “Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 5, pp. 355–366, 2009.
- [2] J. M. Kinchen and K. S. Ravichandran, “Phagosome maturation: going through the acid test.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 10, pp. 781–795, 2008.
- [3] J. A. Swanson, “Shaping cups into phagosomes and macropinosomes.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 8, pp. 639–649, 2008.
- [4] K. Lindmo and H. Stenmark, “Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 4, pp. 605–614, 2006.
- [5] L. Stephens, C. Ellson, and P. Hawkins, “Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis.,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 14, no. 2, pp. 203–13, Apr. 2002.
- [6] T. Yeung and S. Grinstein, “Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis.,” *Immunol. Rev.*, vol. 219, pp. 17–36, Oct. 2007.
- [7] J. G. Marshall *et al.*, “Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis,” *J. Cell Biol.*, vol. 153, 2001.
- [8] N. Araki, M. T. Johnson, and J. A. Swanson, “A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages,” *J. Cell Biol.*, vol. 135, no. 5, pp. 1249–1260, 1996.
- [9] D. Cox, C. C. Tseng, G. Bjekic, and S. Greenberg, “A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 3, pp. 1240–7, Jan. 1999.
- [10] C. D. Ellson *et al.*, “Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes.,” *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 20, pp. 1631–1635, 2001.
- [11] R. A. Fratti, J. M. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera, and V. Deretic, “Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest,” *J. Cell Biol.*, vol. 154, no. 3, pp. 631–644, 2001.
- [12] O. V. Vieira, R. J. Botelho, and S. Grinstein, “Phagosome maturation: aging gracefully.,” *Biochem. J.*, vol. 366, no. Pt 3, pp. 689–704, 2002.
- [13] O. V. Vieira *et al.*, “Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation,” *J. Cell Biol.*, vol. 155, no. 1, pp. 19–26, 2001.
- [14] K. Hazeki *et al.*, “Essential roles of PIKfyve and PTEN on phagosomal

- phosphatidylinositol 3-phosphate dynamics.," *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 22, pp. 4010–4015, 2012.
- [15] I. Vergne, J. Chua, H.-H. Lee, M. Lucas, J. Belisle, and V. Deretic, "Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 11, pp. 4033–8, Mar. 2005.
- [16] J. A. Engelman, J. Luo, and L. C. Cantley, "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, no. 8, pp. 606–19, Aug. 2006.
- [17] L. M. Ooms *et al.*, "The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease.," *Biochem. J.*, vol. 419, no. 1, pp. 29–49, Apr. 2009.
- [18] N. Tamura *et al.*, "Specific role of phosphoinositide 3-kinase p110alpha in the regulation of phagocytosis and pinocytosis in macrophages.," *Biochem. J.*, vol. 423, no. 1, pp. 99–108, Sep. 2009.
- [19] J. Ai, A. Maturu, W. Johnson, Y. Wang, C. B. Marsh, and S. Tridandapani, "The inositol phosphatase SHIP-2 down-regulates FcγR-mediated phagocytosis in murine macrophages independently of SHIP-1.," *Blood*, vol. 107, no. 2, pp. 813–20, Jan. 2006.
- [20] X. Cao *et al.*, "The inositol 3-phosphatase PTEN negatively regulates Fc gamma receptor signaling, but supports Toll-like receptor 4 signaling in murine peritoneal macrophages.," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 8, pp. 4851–7, Apr. 2004.
- [21] K. A. Horan *et al.*, "Regulation of FcγR-stimulated phagocytosis by the 72-kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase: SHIP1, but not the 72-kDa 5-phosphatase, regulates complement receptor 3 mediated phagocytosis by differential recruitment of these 5-phosphatases to the phagocytic cup.," *Blood*, vol. 110, no. 13, pp. 4480–91, Dec. 2007.
- [22] J. Ai, A. Maturu, W. Johnson, Y. Wang, C. B. Marsh, and S. Tridandapani, "The inositol phosphatase SHIP-2 down-regulates FcγR-mediated phagocytosis in murine macrophages independently of SHIP-1.," *Blood*, vol. 107, no. 2, pp. 813–20, Jan. 2006.
- [23] N. Ninomiya *et al.*, "Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 36, pp. 22732–7, Sep. 1994.
- [24] S. Jean and A. A. Kiger, "Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 7, pp. 463–70, Jun. 2012.
- [25] H.-W. Shin *et al.*, "An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway.," *J. Cell Biol.*, vol. 170, no. 4,

- pp. 607–18, Aug. 2005.
- [26] M. Fukuda, E. Kanno, K. Ishibashi, and T. Itoh, “Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity.,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 7, no. 6, pp. 1031–42, Jun. 2008.
- [27] G. Pei, U. Repnik, G. Griffiths, and M. G. Gutierrez, “Identification of an immune-regulated phagosomal Rab cascade in macrophages.,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. Pt 9, pp. 2071–82, May 2014.
- [28] A. C. Schmid, H. M. Wise, C. A. Mitchell, R. Nussbaum, and R. Woscholski, “Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation,” *FEBS Lett.*, vol. 576, no. 1–2, pp. 9–13, Oct. 2004.
- [29] M. V. Kisseleva, M. P. Wilson, and P. W. Majerus, “The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, 2000.
- [30] M. Bohdanowicz, D. M. Balkin, P. De Camilli, and S. Grinstein, “Recruitment of OCRL and Inpp5B to phagosomes by Rab5 and APPL1 depletes phosphoinositides and attenuates Akt signaling.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 23, no. 1, pp. 176–87, Jan. 2012.
- [31] T. Segawa *et al.*, “Inpp5e increases the Rab5 association and phosphatidylinositol 3-phosphate accumulation at the phagosome through an interaction with Rab20.,” *Biochem. J.*, vol. 464, no. 3, pp. 365–75, Dec. 2014.
- [32] F. A. Norris and P. W. Majerus, “Hydrolysis of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate by inositol polyphosphate 4-phosphatase isolated by affinity elution chromatography.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 12, pp. 8716–20, Mar. 1994.
- [33] M. J. Geisow and W. H. Evans, “pH in the endosome: Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis,” *Exp. Cell Res.*, vol. 150, no. 1, pp. 36–46, Jan. 1984.
- [34] M. Frech, M. Andjelkovic, E. Ingley, K. K. Reddy, J. R. Falck, and B. A. Hemmings, “High Affinity Binding of Inositol Phosphates and Phosphoinositides to the Pleckstrin Homology Domain of RAC/Protein Kinase B and Their Influence on Kinase Activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 13, pp. 8474–8481, Mar. 1997.
- [35] P. Bruhns, F. Vely, O. Malbec, W. H. Fridman, E. Vivier, and M. Daeron, “Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 48, pp. 37357–64, Dec. 2000.
- [36] Y. Egami and N. Araki, “SPATIOTEMPORAL LOCALIZATION OF RAB20 IN LIVE RAW264 MACROPHAGES DURING MACROPINOCYTOSIS,” *Acta Histochem.*

- Cytochem.*, vol. 45, pp. 317–323, 2012.
- [37] Y. Egami and N. Araki, “Rab20 regulates phagosome maturation in RAW264 macrophages during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e35663, 2012.
- [38] S. Seto, K. Tsujimura, and Y. Koide, “Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes.,” *Traffic*, vol. 12, no. 4, pp. 407–20, Apr. 2011.
- [39] M. Bohdanowicz and S. Grinstein, “Role of Phospholipids in Endocytosis, Phagocytosis, and Macropinocytosis,” *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 1, pp. 69–106, Jan. 2013.
- [40] G. D. Fairn and S. Grinstein, “How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes.,” *Trends Immunol.*, vol. 33, no. 8, pp. 397–405, Aug. 2012.
- [41] D. Cox, B. M. Dale, M. Kashiwada, C. D. Helgason, and S. Greenberg, “A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (alpha(M)beta(2); CD11b/CD18).,” *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 1, pp. 61–71, Jan. 2001.
- [42] K. Nigorikawa *et al.*, “Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase Type I Negatively Regulates Phagocytosis via Dephosphorylation of Phagosomal PtdIns(3,4)P2,” *PLoS One*, vol. 10, no. 11, p. e0142091, Nov. 2015.
- [43] S. Hunter, Z. K. Indik, M. K. Kim, M. D. Cauley, J. G. Park, and A. D. Schreiber, “Inhibition of Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fc gamma receptor.,” *Blood*, vol. 91, no. 5, pp. 1762–8, Mar. 1998.
- [44] J. Sasaki *et al.*, “The PtdIns(3,4)P2 phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death,” *Nature*, vol. 465, no. 7297, pp. 497–501, May 2010.
- [45] S. Morioka *et al.*, “Myeloid cell-specific inositol polyphosphate-4-phosphatase type I knockout mice impair bacteria clearance in a murine peritonitis model,” *Innate Immun.*, vol. 22, no. 6, pp. 444–451, Aug. 2016.
- [46] A. Simonsen *et al.*, “EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion,” *Nature*, vol. 394, no. 6692, pp. 494–498, Jul. 1998.
- [47] S. Christoforidis *et al.*, “Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. 249–52, Aug. 1999.
- [48] T. Takai, “Roles of Fc receptors in autoimmunity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 8, pp. 580–592, Aug. 2002.
- [49] I. Jutras and M. Desjardins, “PHAGOCYTOSIS: At the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 511–527, Nov. 2005.

