

論文内容要旨

イノシトールリン脂質 4 位脱リン酸化酵素
TMEM55A は食胞に局在することで
マクロファージの貪食を抑制的に制御する

主指導教員：野村 渉教授
(医系科学研究科 創薬標的分子科学)

副指導教員：小澤 孝一郎教授
(医系科学研究科 治療薬効学)

副指導教員：細井 徹准教授
(医系科学研究科 治療薬効学)

森岡 真

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【序論】

生体内での免疫応答は病原性微生物等の侵入に対して恒常性を維持する重要な機構である。この免疫応答において中心的な役割を果たしているのがマクロファージである。マクロファージは異物を貪食して処理し、サイトカインを放出することで炎症応答を拡大する。さらに抗原提示によって獲得免疫応答を活性化する。これらの機能の制御において重要となるのがイノシトールリン脂質 (Phosphoinositides, PIPs) である。

PIPs は親水性頭部としてイノシトール環を持つグリセロリン脂質であり、イノシトールの 3 位、4 位、5 位の水酸基がそれぞれ可逆的にリン酸化されることで計 8 種類が存在する。例えば、貪食過程のダイナミックな細胞膜の動きは PIPs の連続的な相互変換によって制御されている。貪食過程で細胞膜が伸展する際には、phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) が F-actin の重合を促進することで膜が押し出され、仮足が広がっていく。粒子径が大きな (>4 μm) 標的の貪食時に食胞を閉環させるには、クラス I の PI3K (PI(4,5)P₂ の 3 位リン酸化酵素) が PI(4,5)P₂ をリン酸化して、食胞に PI(3,4,5)P₃ が蓄積することが必須となる。一方でこの過程は小さな標的の場合には不要である。

TMEM55A と TMEM55B は PI(4,5)P₂ の 4 位脱リン酸化酵素として同定されたものの、内在酵素の生理的な機能については長く報告が存在しなかった。私は TMEM55A の生理機能を明らかにする端緒を開くため、RAW264.7 マクロファージにおいて TMEM55A の発現抑制細胞を構築し、マクロファージ機能における TMEM55A の関与について検討を行った。

【結果・考察】

1. TMEM55A の発現抑制によって大きな標的の貪食が活性化する

shTMEM55A 細胞では Control 細胞と比較して IgG 感作赤血球や Zymosan のような径の大きな標的の貪食量が増加した。一方で、この変化は shTMEM55B 細胞では見られなかった。また、小さい標的である IgG-*E. coli* の貪食に有意な変化はなかったことから、貪食活性の上昇は標的のサイズに依存すると推測された。shRNA 抵抗性 TMEM55A の発現により貪食活性が Control レベルにまで回復した。酵素活性欠損変異体の発現ではこの効果が見られなかったため、貪食の活性化には TMEM55A の酵素活性が関与していると考えられる。以上の結果から TMEM55A の発現抑制により食胞膜の PI(4,5)P₂ が増加し、PI(3,4,5)P₃ の増加に繋がり貪食が活性化したものと予想された。

2. PI(4,5)P₂ レベルの増加によって貪食が活性化する

私は、shTMEM55A 細胞の貪食活性の亢進は PI(4,5)P₂ レベルの増加が原因であると考え、PI(4,5)P₂ の変動が貪食に及ぼす影響について検討した。*Sigella flexineri* 由来の PI(4,5)P₂ の 4 位脱リン酸化酵素 IpgD と PI(5)P の 4 位リン酸化酵素 PIPK II α を RAW264.7 細胞に発現させて IgG 感作赤血球の貪食量を測定した。その結果、IpgD によって貪食量は減少し、PIPK II α によって貪食量が増加した。さらに、shTMEM55A 細胞で減少していると考えられる PI(5)P を

細胞に添加したが、Control 細胞と shTMEM55A 細胞の双方で食食活性には変化がなかった。これらの結果から shTMEM55A 細胞での食食活性の亢進には PI(4,5)P2 の蓄積が重要な要因であることが示唆された。

3. TMEM55A の発現抑制によって IgG 刺激時の PI(3,4,5)P3 が増加する

径の大きい標的の食食に必須となる PI(3,4,5)P3 の産生を評価するために、LC-MS/MS システムによる PI(3,4,5)P3 の定量化を試みた。その結果、shTMEM55A 細胞では IgG 刺激時に Control 細胞と比較して PI(3,4,5)P3 が増加していた。この結果は IgG 感作標的の食食時に食胞膜で TMEM55A が PI(4,5)P2 を脱リン酸化していることを強く示唆している。

4. TMEM55A の発現抑制によって食胞上の PIPs 認識プローブの蓄積が増加する

食胞膜の PIPs 動態を "live-cell time-lapse imaging" により検出した。その結果、shTMEM55A 細胞では Control 細胞と比して PI(4,5)P2 と PI(3,4,5)P3 認識プローブの食胞膜への蓄積が増加した。この結果から、shTMEM55A 細胞で食胞膜における PI(4,5)P2 レベルと PI(3,4,5)P3 レベルが上昇していると推測される。つまり、TMEM55A は食食時に食胞膜上で PI(4,5)P2 を脱リン酸化しており、発現抑制により PI(4,5)P2 とそのリン酸化産物である PI(3,4,5)P3 が増加し、大きな標的の食食が増加しているものと考えられる。

5. TMEM55A の発現抑制によって F-actin の集積が増加する

shTMEM55A 細胞では Control 細胞と比べて食胞近傍の F-actin の重合が一過的に増加した。興味深いことに蓄積した F-actin は速やかに分解された。PI(4,5)P2 は F-actin の重合を促進するが、PI(3,4,5)P3 は F-actin の重合に必要な Rho-GTPase の GAP を動員することで F-actin の脱重合を導くと報告されている。前述の通り、shTMEM55A 細胞では食胞上での PI(4,5)P2 レベル、PI(3,4,5)P3 レベルがともに上昇していると推測される。その結果、F-actin の重合・脱重合サイクルを促進することで食食活性を亢進させているものと考えられる。