

博士論文

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

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

博士課程 医歯薬学専攻

創薬標的分子科学研究室

D170096 森岡 真

## 目次

序論.....	1
1 実験方法.....	6
1-1 TMEM55A/TMEM55B 発現抑制細胞の作製.....	6
1-2 細胞培養.....	6
1-3 IgG 感作赤血球の調製と <sup>51</sup> Cr を用いた貪食活性の測定.....	8
1-4 蛍光顕微鏡による IgG 感作赤血球貪食活性の測定.....	8
1-5 zymosan 貪食活性の測定.....	8
1-6 大腸菌貪食活性の測定.....	9
1-7 RAW264.7 細胞への PtdIns(5)P 導入.....	9
1-8 プラスミド.....	10
1-9 トランスフェクト.....	10
1-10 貪食過程におけるイノシトールリン脂質、F-actin の動態観察.....	10
1-11 3xHis-3xPHD を用いた PtdIns(5)P 定量.....	12
1-12 ウェスタンブロッティング.....	13
1-13 LC-MS/MS システムによる PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> の定量.....	13
1-14 統計解析.....	13
2 結果.....	11
2-1 TMEM55A/TMEM55B 発現抑制細胞の作製.....	14
2-2 shTMEM55A 細胞では大きい粒子の貪食活性が亢進する.....	17
2-3 TMEM55A/TMEM55B は食胞に局在する.....	23
2-4 PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> の蓄積によって貪食が亢進する.....	29
2-5 shTMEM55A 細胞では IgG 刺激時に PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> が増加する.....	33
2-6 TMEM55A は食胞膜上の PIPs 動態に関与する.....	36
2-7 shTMEM55A 細胞では F-actin の重合-脱重合サイクルが促進される.....	43
3 考察.....	45
総括.....	46
原著論文.....	48
参考文献.....	49
謝辞.....	53

## 序論

イノシトールリン脂質 (PIPs) は親水基としてイノシトール環を有するグリセロリン脂質である。このイノシトールの 3 位、4 位、5 位が可逆的にリン酸化修飾されることで、PIPs には 8 種類が存在する (Fig. 1)。このリン酸化状態は 19 種類のリン酸化酵素 (kinase) と 29 種類の脱リン酸化酵素 (phosphatase) によって相互に変換される。PIPs は存在量的にはリン脂質全体の 10% に満たず、その代謝回転は速い。そのため、細胞膜の構築材料として以外の機能を持つことが古くから指摘されていた。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シグナル伝達をはじめ、様々な細胞機能を制御している。私はこれまで PIPs と PIPs 代謝酵素の生理機能や疾患とのかかわりについて研究を進めてきた。

マクロファージは病原菌や自己の死細胞、変性物質などを貪食し、消化することで生命の恒常性維持に貢献する [1]-[3]。マクロファージが異物を認識すると、異物は細胞膜の伸展によって捕らえられ、続いて膜の閉鎖によって食胞に封入される。貪食の詳細なメカニズムは関与する受容体や標的とする粒子のサイズに依存して変化する。ただし PIPs を通じた制御を受けるという点については共通している。例えば、F-actin の蓄積は PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> によって促進され、仮足の伸展を促す。この過程は貪食する標的の種類に関わらず標的を最初に捕まえるために必須である [4]-[6]。しかしながら、続く phagocytic cup が閉鎖する段階では標的が大きい場合 (>4 μm) と小さい場合は別のメカニズムで進行する。クラス I の PI3K が PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> をリン酸化することで一過性に食胞に蓄積する PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> は、大きな粒子を取り込む際に必須となる (Fig. 2)。しかしこの過程は小さな粒子を取り込む場合には不要である [7]-[9]。PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> は phagocytic cup に RhoGAP をリクルートする。そうすることで Rho ファミリー GTPase の不活性化とアクチン重合の終結を引き起こすと報告されている [9]。このような F-actin の協調的な脱重合が巨大な phagocytic cup の閉鎖には必要である [10]。

TMEM55a 及び TMEM55b (Transmembrane protein 55A/B) は哺乳類で最初に同定された PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の 4 位脱リン酸化酵素である [11]。これら二つの酵素は脱リン酸化酵素のコンセンサス配列 (CX<sub>5</sub>R motif) と推定上の 2 回膜貫通領域を有している (Fig. 3)。これらの酵素活性と基質特異性は *in vitro* で判定されたものであり、*in vivo* における脱リン酸化酵素による PIPs の PtdIns(5)P への変換は未だ検討が進んでいない。TMEM55a と TMEM55b を培養細胞に過剰発現させた場合、これらはともに後期エンドソーム/リソソーム膜に局在し、リガンド結合後の EGF 受容体の分解を促進すると報告されている [11]。しかしながら、TMEM55a/TMEM55b と同じ酵素活性を有する細菌由来病原性因子の IpgD

を培養細胞に発現させた場合、EGF 受容体の分解は抑制される[12]-[14]。このように、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>の4位脱リン酸化酵素の生理機能については大部分が過剰発現実験による推測である。TMEM55Bは細胞核のPtdIns(5)Pを産生することで、p53の活性化を通じたアポトーシスの促進に関与するといった報告が存在するものの[15]、TMEM55Aについては細胞内での役割について解析した研究が存在せず、その生理的機能は不明瞭な部分が多いのが現状である。

マクロファージは前述のように貪食過程においてPIP<sub>s</sub>の制御を受けているほか[7]-[9]、貪食後の消化過程[16]-[19]やサイトカイン産生[20]-[21]の制御においてもPIP<sub>s</sub>が重要な役割を果たしている。免疫機能だけでなく、マクロファージの主要な役割のひとつである変性コレステロールの処理においてもPIP<sub>s</sub>が関与していることを私たちは報告している[22]。このようにマクロファージ機能においてPIP<sub>s</sub>の果たす役割が大きいことから、PIP<sub>s</sub>代謝酵素の機能を検討する上でマクロファージは非常に有用である。そこで私はPIP<sub>s</sub>代謝酵素の中でも特に機能解析が進んでいないTMEM55Aに着目し、マクロファージ系培養細胞株RAW264.7細胞を利用してTMEM55Aの生理的機能を明らかにする端緒を開こうと試みた。私たちの研究室で開発した効率的なエレクトロポレーション法によってRAW264.7細胞にshRNAを導入してTMEM55A発現抑制細胞（以下、shTMEM55A細胞）を作製した。この細胞を用いてマクロファージの機能調節におけるTMEM55Aの役割の解明に取り組んだ。本研究では、これまで細胞内での働きが分かっていなかったTMEM55Aがマクロファージの貪食過程を制御していることを明らかにした（Fig. 2）。

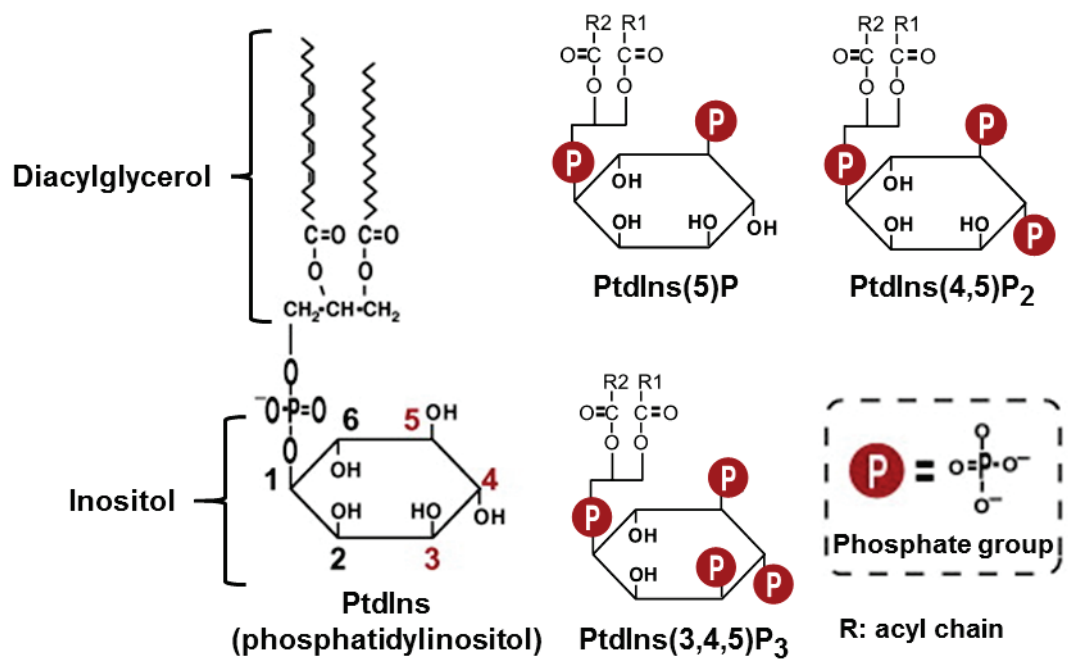


Fig. 1 イノシトールリン脂質の構造

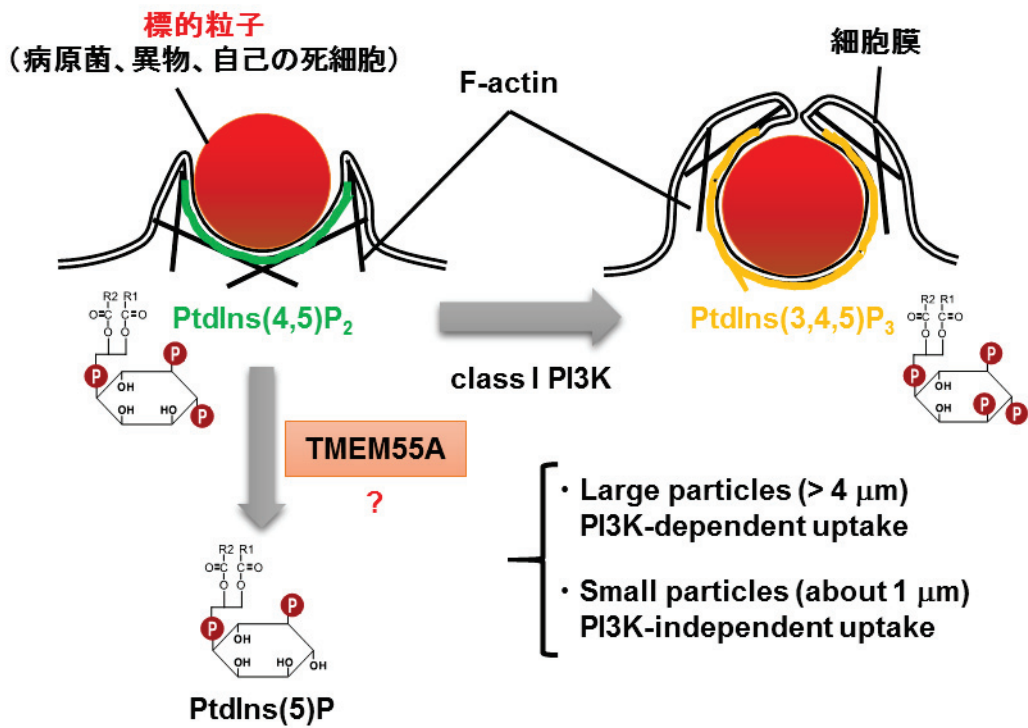


Fig. 2 貪食過程のイノシトールリン脂質

```

      *           20           *           40
TMEM55A : MAADGVDERSPLLSASHSG-----NVT : 22
TMEM55B : MAAD--GERSPLLEPIDCGAGGNGLVGPGGSGAGPGGGLT : 39
      MAAD     ERSPLLS     G                               6T

      *           60           *           80
TMEM55A : PTAPPYLQESSP-----RAELPPPYTAIASPDASGIP : 54
TMEM55B : PSAPPYGAAFPFPFEGHPAVLPGEDPPPYSPILTSPD SG SAP : 80
      P3APPY     P                               E P PPY3 6 SPD     P

      *           100          *           120
TMEM55A : VINCRVCQSLINLDGKHLHQHVVKCTVCNEATPIKNPPTGKK : 95
TMEM55B : MITCRVCQSLINVEGKMHQHVVKCGVCNEATPIKNAPPGKK : 121
      6I CRVCQSLIN6 GK6HQHVVKC VCNEATPIKN P GKK

      *           140          *           160
TMEM55A : YVRCPCNCLLICKDTSRRIGCPRPNCRIINLGPVMLISEE : 136
TMEM55B : YVRCPCNCLLICKVTSQRIACPRPYCKRIINLGPVHPG--- : 159
      YVRCPCNCLLICK TS RI CPRP C4RIINLGPV

      *           180          *           200
TMEM55A : QPAQFALPIQPEGTRVVCGHCGNTFLWMEELRFN TLAKCPHC : 177
TMEM55B : -PLSP-EP-QPMGVRVICGHCKNTFLWTEFTDR TLARCPHC : 197
      P P P QP G RV6CGHC NTFW E TLA4CPHC

      *           220          *           240
TMEM55A : KKISSVGSALPRRRCAYITIGMICIFIGVGLTVGTPDFAR : 218
TMEM55B : RKVSSIGRRYPRKRCICCFLLGLLLAVTATGLAFGTWKHAR : 238
      4K6SS6G PR4RC 6G66 GL GT AR

      *           260          *           280
TMEM55A : RFRATYVSWAIAYLLGLICLIRACYWGAI RVSYP EHSFA : 257
TMEM55B : RYGGIYAAWAFVILLAVLCLGRALYWACMKVSHPVQNF S : 277
      R5 Y WA LL 66CL RA YW 64VS P F

```

**Fig. 3 TMEM55A/TMEM55B のアミノ酸配列**

NCBI Reference Sequence Database よりヒト TMEM55A と TMEM55B のアミノ酸配列を取得し、その配列を比較した (TMEM55A: NP\_061180.1、TMEM55B: NP\_653169.2)。類似性の高いアミノ酸を黒塗りで示しており、“3”は水酸基を持つアミノ酸、“4”は塩基性アミノ酸、“5”は芳香族アミノ酸、“6”は脂肪族アミノ酸をそれぞれ示している。緑色の枠は脱リン酸化酵素活性部位の CX<sub>5</sub>R motif を示している。赤色の枠は TMHMM Server v. 2.0 を使用して予測した膜貫通領域を示している。

## 1 実験方法

### 1-1 TMEM55A/TMEM55B 発現抑制細胞の作製

TMEM55A もしくは TMEM55B を発現抑制した RAW264.7 細胞は以下の通り作製した。

TMEM55A、TMEM55B 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 (Table. 1)。標的配列のそれぞれについて、次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)<sub>19</sub>TTCAAGAGA(Y)<sub>19</sub>TTTTTGGAAA-3'及び 5'-CTAGTTTCCAAAAA(Y)<sub>19</sub>TCTCTTGAA(X)<sub>19</sub>GGGTGCA-3'、(X)<sub>19</sub>はコード配列、(Y)<sub>19</sub>はその相補配列である。オリゴヌクレオチドをアニーリングし、pH1 ベクターの PstI 及び 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 5x10<sup>6</sup>~1x10<sup>7</sup> cells の RAW264.7 細胞に上記ベクターを遺伝子導入した (Gene Pulser II; Bio-Rad)。遺伝子導入の 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。遺伝子の発現効率を調べるため、Sepasol で torla RNA を抽出し、以下のプライマーを用いて定量リアルタイム PCR で mRNA を定量した (Table. 2)。本研究では mRNA 発現を 60~80%程度に抑制されたクローンを選択した。Control 細胞は標的配列の代わりに 400 bp のスタッファー配列を含んだ pH1 ベクターを用いて作製した。

### 1-2 細胞培養

ファゴサイトーシスアッセイや顕微鏡観察では、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% CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。実験開始前に培地を除去し、NaHCO<sub>3</sub> 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、大気中で種々の活性測定を行った。



TMEM55A 229	5' -GTGCACAGTTTGCAATGAA-3'
TMEM55A 322	5' -GGATACATCTCGGCGAATA-3'
TMEM55B	5' -GCATCAGCATGTAGTCAAA-3'

**Table. 1 shRNA の標的配列**

TMEM55A (F)	5' -CGGGAAATGTCACTCCCACA-3'
TMEM55A (R)	-CFFGTTTCCTGGACTGGCGAT-3'
TMEM55B (F)	5' -CCGCCCCAGGCATTTCC-3'
TMEM55B (R)	5' -TATCCGGGCTAGTCAAGGGT-3'

**Table. 2 定量リアルタイム PCR 用プライマー**

### 1-3 IgG 感作赤血球の調製と $^{51}\text{Cr}$ を用いた貪食活性の測定

赤血球 (RBC) は  $^{51}\text{Cr}$  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  $\text{CaCl}_2$ 、0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10 mM EDTA を含んだ 5 mM veronal buffer (pH7.5) (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  $2 \times 10^5$  cells/well) を  $^{51}\text{Cr}$  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(-)に短時間曝露した。得られた上清の放射活性をマクロファージの表面に結合した IgG 感作赤血球の結合量として測定した。細胞を再度 PBS(-)で 3 回洗浄し、0.5% Triton X-100 で溶解した。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。

### 1-4 蛍光顕微鏡による IgG 感作赤血球貪食活性の測定

FLAG タグや EGFP によって標識された各コンストラクトをトランスフェクトした RAW264.7 細胞を tissue culture-coated glass bottom dish に播種し、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C で 4~6 時間培養した。無標識の IgG 感作赤血球を加えて細胞を氷上で 15 分間インキュベートした後、さらに 37°C で 15 分間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、4% paraformaldehyde/PBS(-)を用いて室温で 15 分間細胞を固定した。0.1% saponin/3% BSA/TBS で 60 分間投下処理を行い、Alexa Fluor 647 結合型の抗ウサギ IgG 抗体を用いた免疫染色によって赤血球の取り込み量を評価した。FLAG タグについては抗 FLAG 抗体 (1:1000、Sigma、#F3165) と Alexa Fluor 488 結合型抗マウス IgG 二次抗体 (Cell Signaling) を用いて免疫染色した。取り込んだ赤血球数の定量には BZ-H2C analysis system (Keyence) を使用した。

### 1-5 zymosan 貪食活性の測定

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。RAW264.7 細胞 ( $10^5$  cells/well、glass bottom dish) に対して  $2 \times 10^6$  個の zymosan を加えて 37°C でインキュベートした。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 PBS(-)で 3 回洗浄し、4% paraformaldehyde/PBS(-)を用いて室温で 15 分間細胞を固定した。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) と位相差画像を蛍光顕微鏡で撮影した。Control 細胞が取り込んだ zymosan 量を "1" として各細胞が取り込んだ zymosan 量の平均値をグラフに示した。

#### 1-6 大腸菌貪食活性の測定

オリゴヌクレオチドを用いた PCR によって pmCherry-N1 ベクター (Clontech, Mountain View) を鋳型として mCherry の配列を増幅し、さらに 5'末端と 3'末端にそれぞれ BamHI と EcoRI サイトを導入した。増幅産物を pGEX-4T-3 ベクターにクローニングして作製したベクターを BL-21 大腸菌にトランスフォームした。mCherry の誘導は以下のように行った。シングルコロニーを 10 mL の Luria-Bertani (LB) 培地中で、37°C で一晚インキュベートした。大腸菌を 100 mL の LB 培地に広げ、OD600 が 0.8 に達するまで 37°C でインキュベートした。0.5 mM の isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、30°C で 4 時間インキュベートすることでタンパク質の発現を誘導した。mCherry 発現大腸菌を PBS で洗浄し、4% paraformaldehyde/PBS(-)を用いて室温で 15 分間固定した。標識大腸菌を抗大腸菌抗体を用いて GVB 中で感作し、洗浄した後使用前に 3 分間超音波処理した。glass bottom dish に播種した RAW264.7 細胞に標識大腸菌を 1:50 の割合で添加して氷上で 20 分間インキュベートした。その後さらに 37°C で 20 分間インキュベートして貪食させた。貪食過程は氷冷した pH5.5 の RPMI1640 培地で 3 回洗浄することで停止させ、細胞表面の大腸菌をはがした。4% paraformaldehyde/PBS(-)を用いて室温で 15 分間細胞を固定した。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 587 nm、蛍光波長 610 nm) と位相差画像を蛍光顕微鏡で撮影した。Control 細胞が取り込んだ mCherry 標識大腸菌量を”1”として各細胞が取り込んだ mCherry 標識大腸菌量の平均値をグラフに示した。

#### 1-7 RAW264.7 細胞への PtdIns(5)P 導入

C16 の PtdIns(5)P を CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (1:2:0.8) の混合溶媒に溶解して、-80°C で保存した。PtdIns(5)P 溶液を窒素ガスで乾燥させ、キャリアータンパク質と 1:1 の mol 比で混合した。混合溶液を 2 分間超音波処理し、室温で 10 分間インキュベートした。調製した PIPs-キャリアータンパク質複合体を RPMI1640 培地に希釈して細胞に添加した[24]。

## 1-8 プラスミド

myosin X のタンデムドメイン PH1(N)-PH2-PH3(C) (Myo-PH) 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')。ついでこのドメインを pEGFP-C1 の BglIII と EcoRI サイトにサブクローニングした。pEGFP-C1-IpgD (野生型 (WT) 及び脱リン酸化酵素活性欠損変異体 (PD))、pEGFP-N1-PLC $\delta$ -PH 及び pcDNA3.1 にクローニングされた TMEM55A と TMEM55B、PIPK II $\alpha$  は佐々木雄彦教授 (東京医科歯科大学) よりご提供いただいた。TMEM55A と TMEM55B については pmcherry-C1 ベクターに EcoRI と BamHI サイトでサブクローニングした。shRNA に対する発現回復実験のために、TMEM55A の配列を標的としてサイレント変異を導入した (Table. 3)。PIPK II $\alpha$  については pEGFP-C1 ベクターに KpnI と XbaI サイトでサブクローニングした。また、EGFP タグ付けされた Rab5、Rab7、Rab11、Rab20 は福田教授 (東北大学) よりご提供いただいた[25]。EGFP タグの Lifeact は過去の報告に従って用意した[26]。

## 1-9 トランスフェクト

Neon<sup>TM</sup> transfection system (Invitrogen) を用いてトランスフェクトした。ただし、RAW264.7 細胞用に当研究室で開発した buffer (25 mM HEPES、62.5 mM KCl、10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、125 mM Treharose、0.5 % Ficoll) を用いた。条件も最適化を行い、10  $\mu$ L チップにて 1800 V x 20 ms x 1、2 回/well とした。トランスフェクトした細胞を glass bottom dish に播種し、20% FBS を含有した RPMI1640 中で 5~24 時間インキュベートした後 (培養時間は使用したプラスミドによって異なる)、細胞を顕微鏡解析に使用した。

## 1-10 食食過程におけるイノシトールリン脂質、F-actin の動態観察

種々の蛍光プローブ (Table. 4) をトランスフェクトした細胞を glass bottom dish に播種し、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 BIOREVO BZ9000 顕微鏡 (Keyence) で食食過程を撮影した。食胞の蛍光を BZ-II analysis system (Keyence) 用いた。

TMEM55A (F)	5' -GGTTAAGTGCACCGTGTGCAATGAAGCTAC-3'
TMEM55A (R)	5' -GTAGCTTCATTGCACACGGTGCACTTAACC-3'

**Table. 3** TMEM55A 変異導入用プライマー

Probe	Target
EGFP-MyoX-PH	PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>
EGFP-PLCδ-PH	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
EGFP-Lifeact	F-actin

**Table. 4** 本研究で使用した PIPs 及び F-actin 動態検出用プローブ

#### 1-11 3xHis-3xPHD を用いた PtdIns(5)P 定量

pEGFP-C1-3xPHD を Payrastre 教授 (Paul Sabatier 大学) よりご提供いただいた。3xPHD を以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して PCR によって増幅した (5'-GGTACCCGGACTCAGATCTCGGCA-3', 5'-GGATCCCCGTCGACTCATCACTAC)。PCR 産物を KpnI と BamHI サイトで pCold II ベクターにクローニングした。このプラスミドを事前に pG-KJE8 (シャペロンプラスミド) をトランスフォームした BL-21 にトランスフォームし、50 µg/mL の chloramphenicol 及び 50 µg/mL の ampicillin を含んだ LB 培地中で一晩培養した。シングルコロニーを 10 mL の chloramphenicol と ampicillin を含む LB 培地中で、37°C で一晩培養した。大腸菌を chloramphenicol と ampicillin、500 µg/mL の arabinose、5 ng/mL の tetracycline を含む LB 培地中で OD<sub>600</sub> が 0.5~0.7 に達するまで 37°C で培養し、さらに 15°C で 30 分間培養した。0.5 mM の IPTG を培養液に添加して、15 度で 24 時間インキュベートすることで 3xHis-3xPHD の発現を誘導した。TALON metal affinity resin (Clontech) の製品プロトコルに従って 3xHis-3xPHD の精製を行った。PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて 3xHis-3xPHD を単離し、SDS-PAGE 後にクマシー染色と抗 His 抗体 (Amersham Biosciences) を用いたウエスタンブロッティングにて精製した 3xHis-3xPHD を検出した。

食胞上の PtdIns(5)P 定量は以下のように行った。FITC-zymosan をマクロファージに貪食させた後、pH5.5 の RPMI1640 培地で結合した zymosan をはがした。細胞を 4% paraformaldehyde/PBS(-)を用いて室温で 15 分間固定した。PBS で洗浄した後、0.1% saponin/3% BSA/PBS で膜の透過処理を行った。精製した 3xHis-3xPHD を用いて 4°C で一晩インキュベートし、0.1% saponin /PBS で洗浄した。その後、室温にて抗 His 抗体 (1:1000、GE Healthcare) で 4 時間インキュベートし、Alexa Fluor 647 結合型二次抗体 (1:1000) で 2 時間インキュベートすることで染色した。Keyence BZ-9000 蛍光顕微鏡と CFI Plan Apo VC60×H レンズ (Keyence) を用いて顕微鏡解析を行った。無作為に選んだ 3 視野から 100 個以上の細胞の蛍光画像を撮影し、PtdIns(5)P 陽性食胞を計数した。

#### 1-12 ウェスタンブロッティング

RAW264.7 細胞を 24-well plate に播種し、62°C で 30 分間熱処理した 30 µg/mL の凝集 IgG で刺激した。細胞を氷温 PBS で洗浄後、50 µL の lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH7.4、0.5% NP-40、150 mM NaCl、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)、1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride、20 µM p-amidinophenyl-methylsulfonyl fluoride) で細胞を溶解した。Lysate を 20,000 g で 10 分間遠心し、上清を回収して Bio-Rad assay kit を用いてタンパク量を測定した。100 µg の総タンパク質を持つ lysate に 10 µL の 5x sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8、1% SDS、10% glycerol、5% 2-mercaptoethanol、0.02% Bromophenol Blue) を加えて 100°C で 5 分間加熱した。タンパク質を SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。PVDF 膜を 5% skim milk でブロッキングし、指定の抗体を用いて化学発光法 (Perkin-Elmer) にて検出した。

#### 1-13 LC-MS/MS システムによる PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> の定量

RAW264.7 細胞を 60-mm dish に播種し、62°C で 30 分間熱処理した 30 µg/mL の凝集 IgG で 2 分間刺激した。細胞を氷温 PBS で洗浄し、細胞を回収後 4°C で遠心してペレットにした後液体窒素で急速凍結した。細胞を methanol で溶解し、2 M HCl、1 M NaCl、超純水、methanol、chloroform (WAKO) を用いた Bligh-Dyer 法によってリン脂質を抽出した。さらに、Diethylaminoethyl cellulose (JNC) を用いて酸性リン脂質を濃縮し、0.6 M Trimethylsilyldiazomethane (TCI) を用いてリン脂質をメチル化した。さらに超純水、methanol、chloroform を用いてリン脂質を抽出し、窒素ガスにより溶媒を乾固させた後、methanol と超純水の混合溶液 (4:1) にて溶解した。カラムクロマトグラフィーには UltiMate 3000 LC system (Thermo Fisher Scientific) と HTC PAL autosampler (CTC Analytics) を使用した。エレクトロスプレーイオン化 MS/MS 解析には TSQ-Vantage (Thermo Fisher Scientific) を使用した。定量化の内部標準として 20:4/17:0 PIPs (Avanti) を使用した。

#### 1-14 統計解析

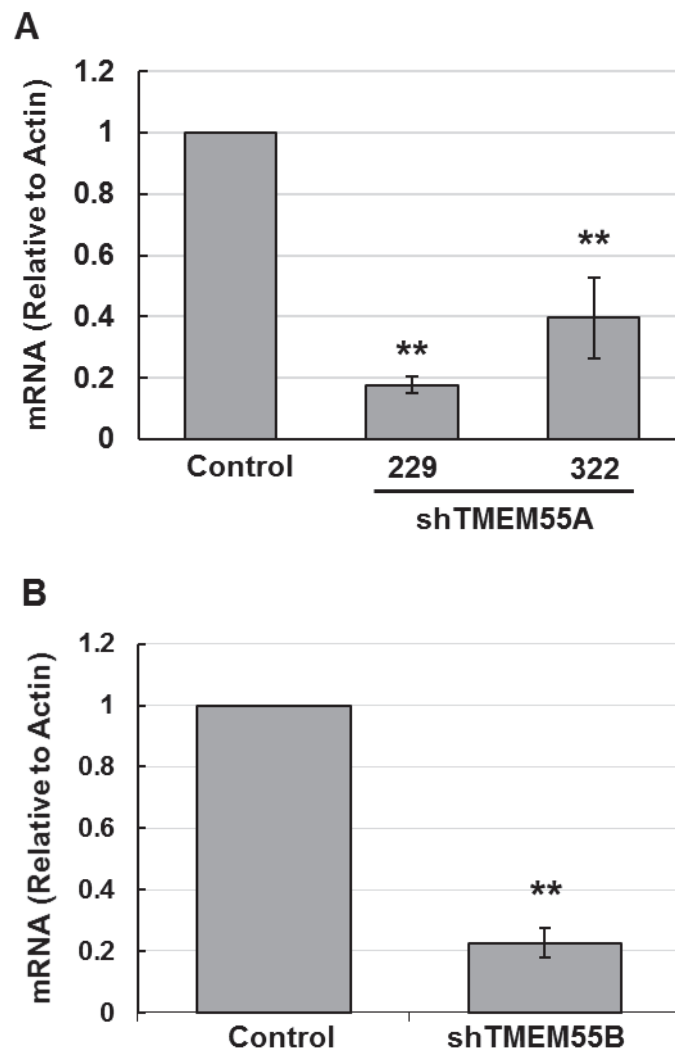
両側 Student の T 検定を行い、P<0.05 の P 値を有意なものとした。

## 2 結果

### 2-1 TMEM55A/TMEM55B 発現抑制細胞の作製

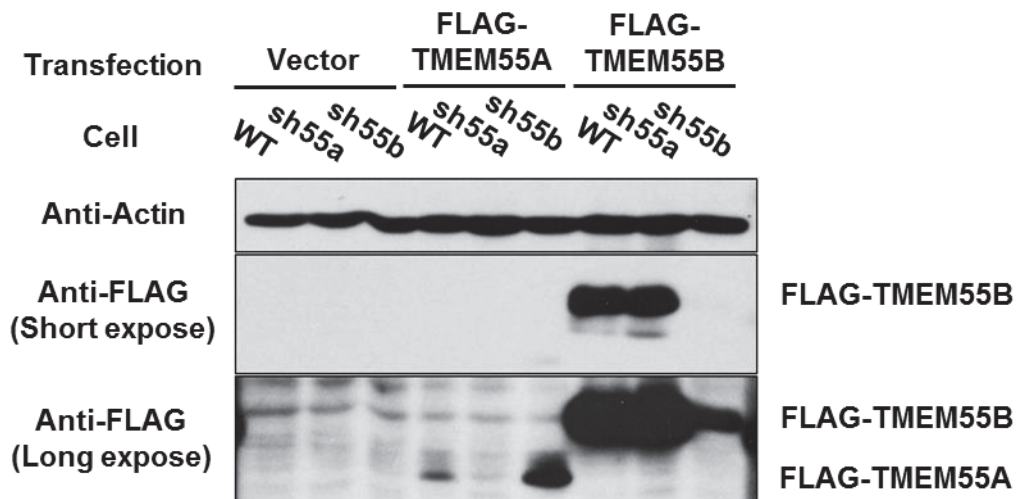
私は内在の TMEM55A と TMEM55B の役割を調べるため、前述の通り TMEM55A と TMEM55B の発現抑制細胞を作製し、mRNA レベルで発現抑制効率を評価した。その結果、樹立した二つの細胞株 (shTMEM55A 229 及び 322) において TMEM55A の mRNA レベルが 20%もしくは 40%まで低下した (Fig. 4A)。同様に、shTMEM55B 細胞においては TMEM55B の mRNA レベルが 20%まで低下した (Fig. 4B)。タンパク質レベルでの発現抑制効率も評価しようと試みたが、市販の抗体が機能しなかった。そこで各発現抑制細胞に FLAG タグの TMEM55A と TMEM55B を発現させて、抗 FLAG 抗体で検出した (Fig. 5)。shTMEM55A 細胞では TMEM55B タンパク質が Control 細胞と同程度に発現していた一方で、shTMEM55B 細胞では発現が抑制されていた。トランスフェクトした TMEM55A は WT 細胞では確認できたが、shTMEM55A 細胞では検出されなかった。興味深いことに、shTMEM55B 細胞では WT 細胞と比べて FLAG-TMEM55A の発現が増加していた。これは発現の抑制された TMEM55B を TMEM55A が代償していることを示唆している。内在性の TMEM55A の発現が shTMEM55B 細胞で増加している可能性がある。





**Fig. 4 shRNA による TMEM55A 及び TMEM55B の発現抑制**

Table. 1 に示した shRNA にて二つの TMEM55A 発現抑制細胞株を作製した。定量リアルタイム PCR で TMEM55A の mRNA レベルを測定し、Control 細胞の mRNA レベルを”1”とした時の TMEM55A 及び TMEM55B の mRNA レベルを縦軸として表した。3 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は means+S.E.とした。\*\*: P<0.01。



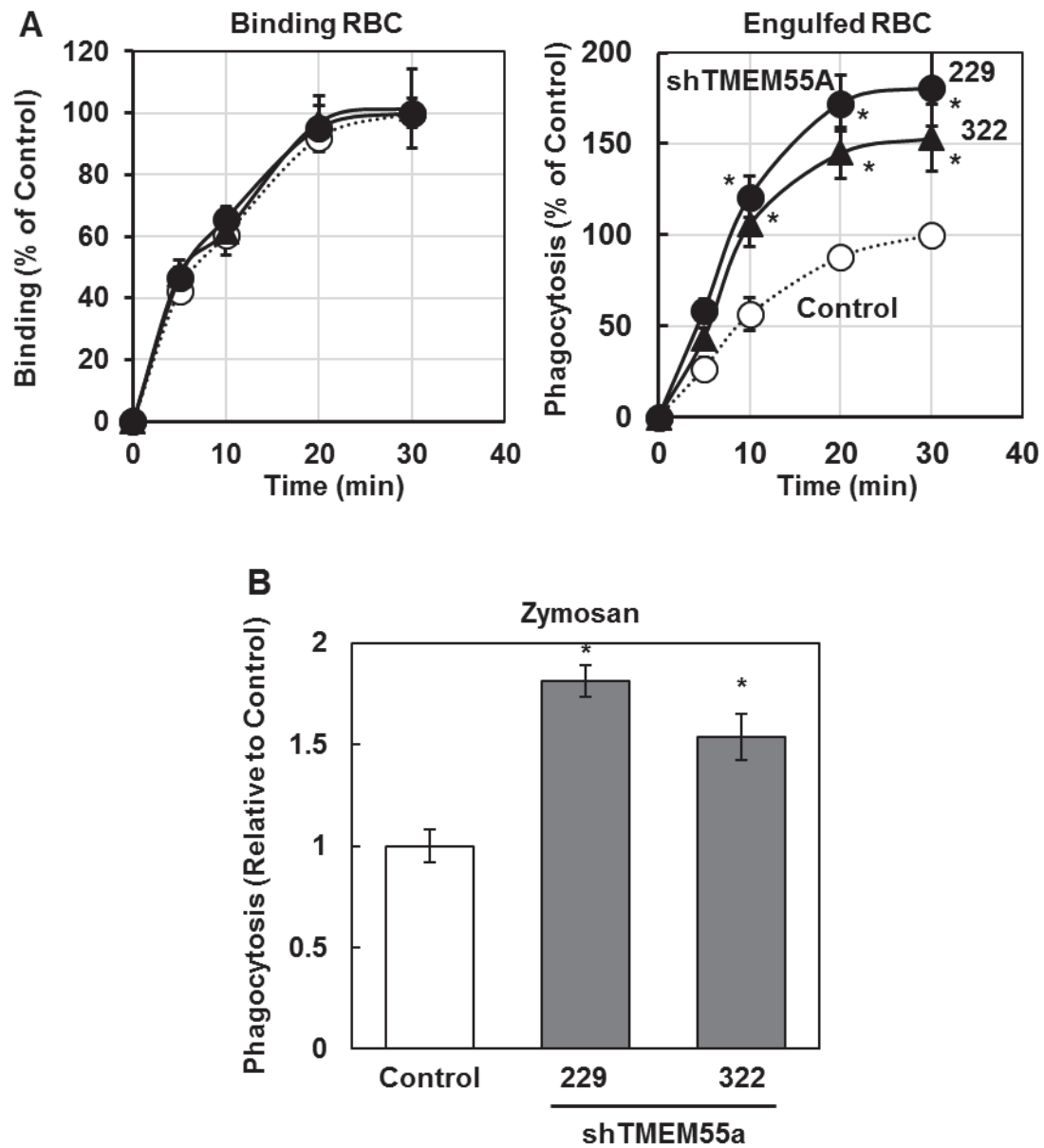
**Fig. 5 FLAG-TMEM55A/B 発現による発現抑制効率の確認**

FLAG-TMEM55A/TMEM55B を RAW264.7 細胞の WT 細胞と shTMEM55A 細胞、shTMEM55B 細胞にそれぞれ発現させた。抗 Actin 抗体と抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにてそれぞれ検出し、発現抑制効率を確認した。

## 2-2 shTMEM55A 細胞では大きい粒子の貪食活性が亢進する

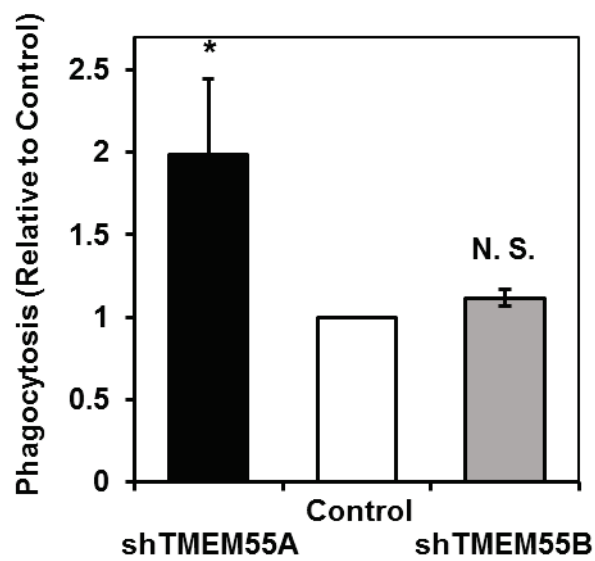
2 種類の shTMEM55A 細胞を用いて貪食量を比較したところ、IgG 感作赤血球および zymosan の貪食量は shTMEM55A 細胞で増加した (Fig. 6)。この時、マクロファージ表面に結合した IgG 感作赤血球数にはほとんど変化がなかった。これは shTMEM55A 細胞でも細胞表面の Fc $\gamma$ 受容体数が変化していないことを示している。一方で、もう一種類の PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 脱リン酸化酵素である TMEM55b の欠損細胞では IgG 感作赤血球の貪食が Control 細胞と同程度だった (Fig. 7)。この結果は TMEM55A が貪食を抑制的に制御していることを示唆している。さらに TMEM55A が貪食に関与していることを確かめるために、shTMEM55A 細胞に shRNA 抵抗性の FLAG-TMEM55A を発現させた。その結果、WT の TMEM55A を発現させた細胞では IgG 感作赤血球の貪食が抑制されていた。この変化は PD 体の TMEM55A を発現した細胞では見られなかった (Fig. 8)。

小さな粒子の貪食に対する TMEM55A の役割について検討するために、Control 細胞と shTMEM55A 細胞に IgG 感作大腸菌を貪食させて、その貪食活性を比較した。その結果、大腸菌の取り込みには TMEM55A 発現抑制の影響が見られなかった (Fig. 9)。大きな粒子の貪食が完了するためにはクラス I の PI3K によって産生される PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> を介した Rho ファミリー GTPase の不活性化が必須であると報告されているが [7]-[9]、小さな分子の貪食にはこれが不要である。確かに、PI3K 阻害剤である wortmannin 処理によって IgG 感作赤血球の貪食は著しく阻害されるものの、IgG 感作大腸菌の貪食には大きな影響が見られなかった (Fig. 10)。この結果から、shTMEM55A 細胞における貪食活性の亢進は PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> の増加によるものと推測された。



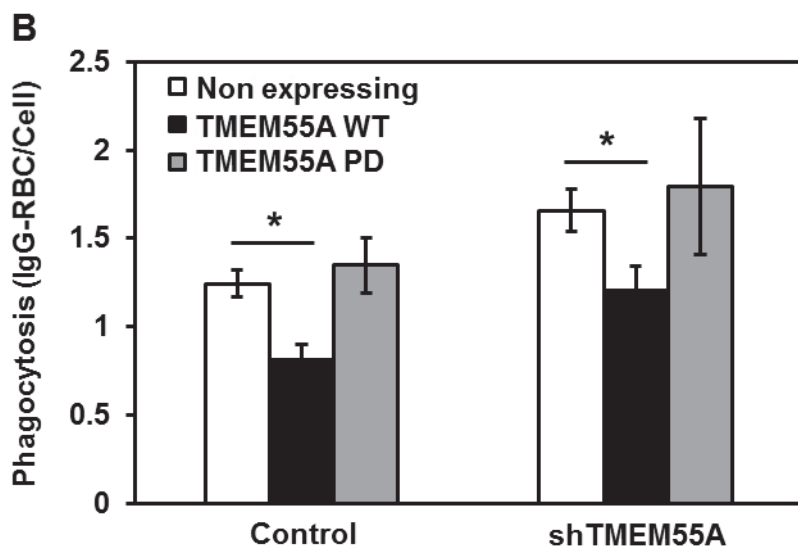
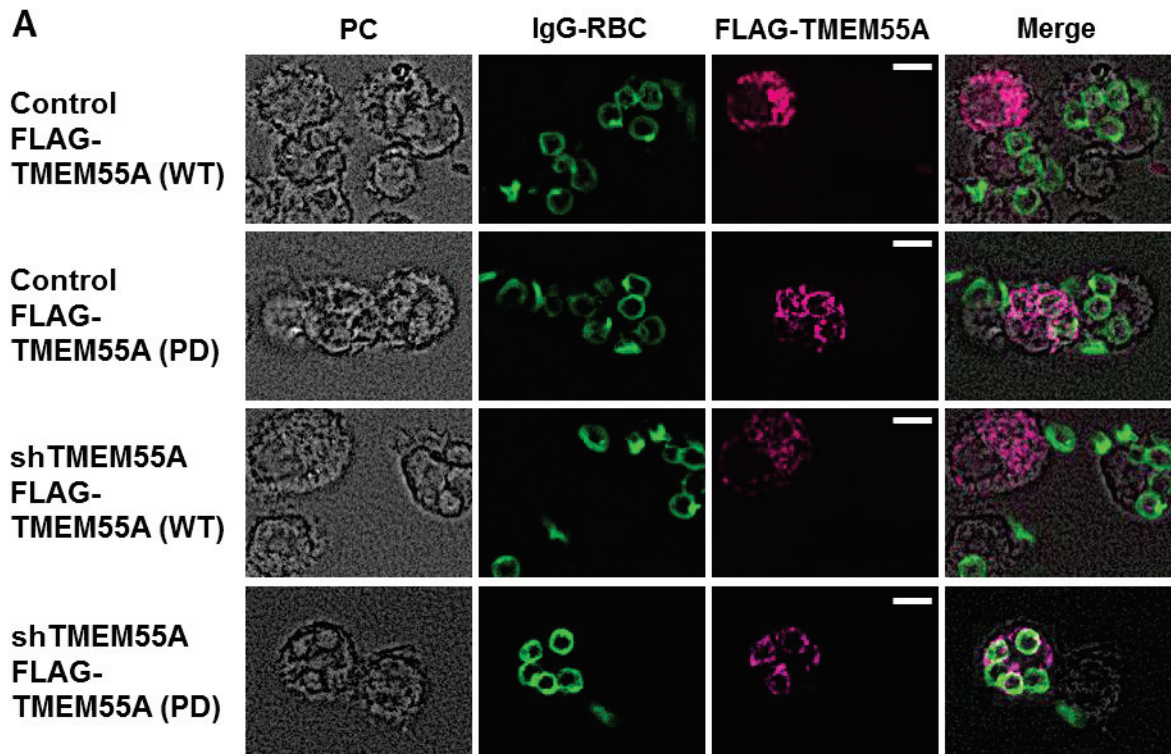
**Fig. 6 shTMEM55A 細胞の大きい粒子に対する食食活性**

(A) Control 細胞 (○)、shTMEM55A 細胞 (●) に IgG 感作赤血球を添加し、37°C で所定の時間インキュベートした。グラフは細胞表面に結合した赤血球数と細胞内に取り込まれた赤血球数をそれぞれ示しており、30 分時点での Control 細胞の数値を 100% として算出した。(B) Control 細胞、shTMEM55A 細胞に非感作 zymosan を添加して 37°C で 15 分間インキュベートした。zymosan 粒子は TxRed 標識と無標識のものを 1:1 で混合して使用した。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 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は mean±S.E. とした。\*: P<0.05。



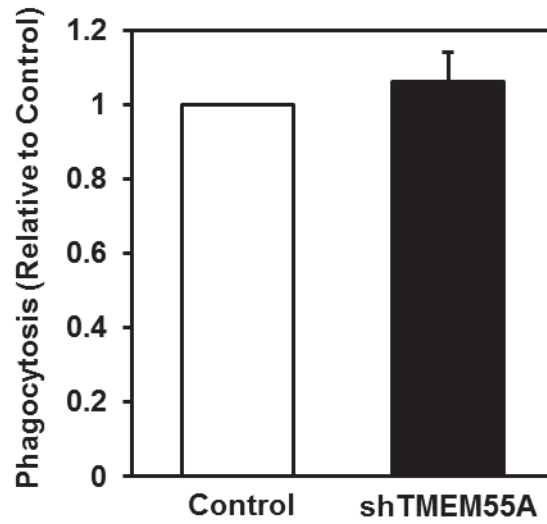
**Fig. 7 shTMEM55B 細胞の貪食活性**

Control 細胞、shTMEM55A 細胞、shTMEM55B 細胞にそれぞれ IgG 感作赤血球を添加して、蛍光顕微鏡下で取り込んだ赤血球数を計数した。3 回の独立した実験を行い、Control 細胞の数値を”1”として算出した。縦軸の数値は means+S.E.とした。\*:  $P < 0.05$ 。N.S.: 有意差なし。



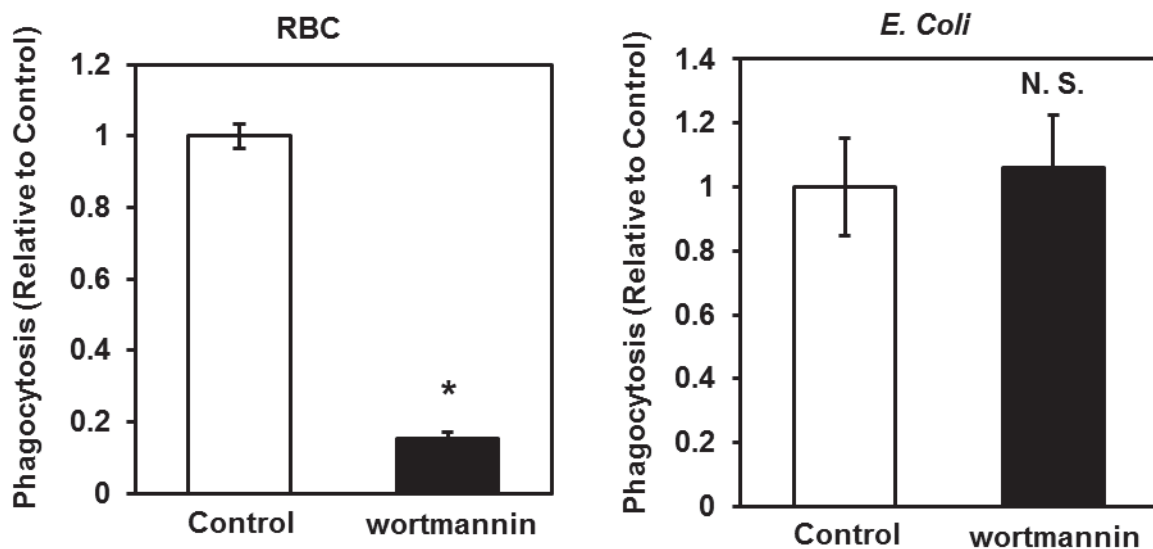
**Fig. 8 FLAG-TMEM55A 発現時の食食活性**

Control 細胞、shTMEM55A 細胞に shRNA 抵抗性の FLAG-TMEM55A (WT もしくは PD) を発現させて 4 時間後に IgG 感作赤血球を添加して蛍光顕微鏡下で取り込んだ赤血球数を計数した。TMEM55A を発現した細胞に対しての比較対象として TMEM55A を発現していない細胞の取り込み量を利用した。3 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は means+S.E.とした。\*: P<0.05。PC: phase-contrast images。Scale bar: 5  $\mu$ m。



**Fig. 9 shTMEM55A 細胞の大腸菌に対する食食活性**

Control 細胞、shTMEM55A 細胞にそれぞれ IgG 感作 mCherry-大腸菌を添加して、蛍光顕微鏡下で大腸菌の蛍光面積から細胞内の大腸菌量を算出した。3 回の独立した実験を行い、Control 細胞の数値を”1”として算出した。縦軸の数値は means+ S.E.とした。



**Fig. 10 Wortmannin 処理時の貪食活性**

WT の RAW264.7 細胞を 30 nM の wortmannin で、37°C で 15 分間処理し、その後 IgG 感作赤血球もしくは IgG 感作大腸菌を添加した。その後、蛍光顕微鏡下で取り込んだ標的量を計数もしくは算出した。3 回の独立した実験を行い、Control 細胞の数値を”1”として算出した。縦軸の数値は means+ S.E.とした。\*: P<0.05。



### 2-3 TMEM55A/TMEM55B は食胞に局在する

前述の通り shTMEM55A 細胞では大きい粒子の貪食が亢進していたが、shTMEM55B 細胞ではこの変化が見られなかった。この二つの細胞株間の矛盾を説明するために、以下の3つの仮説が考えられる。

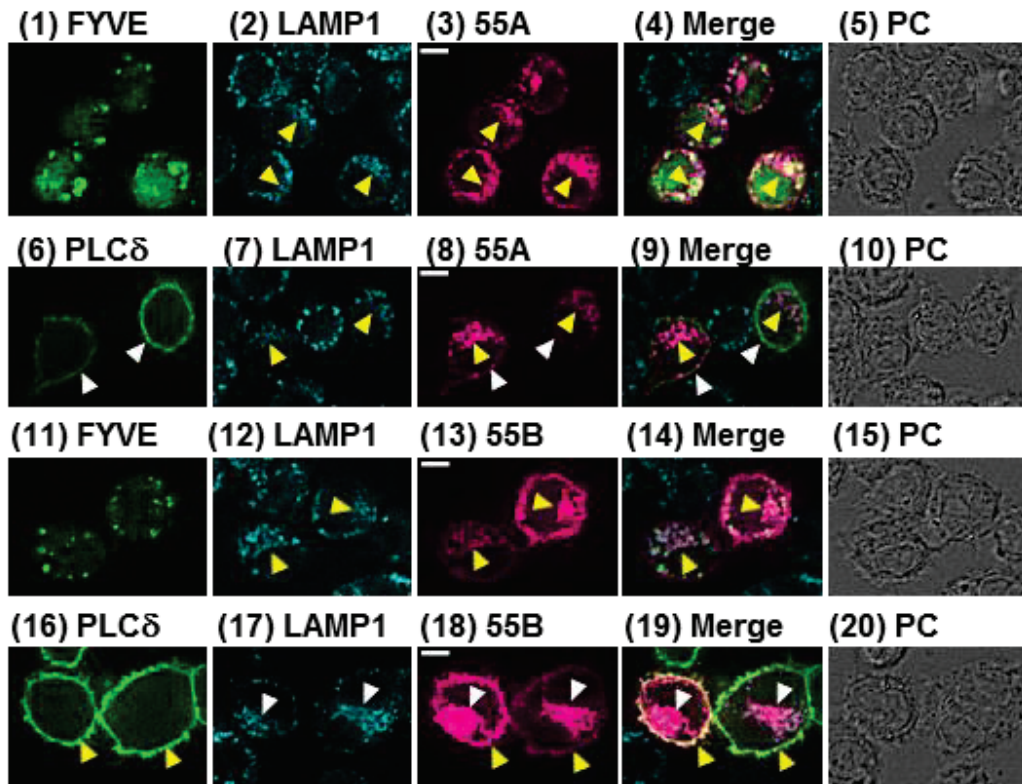
- 1) TMEM55A と TMEM55B では細胞内局在が異なり、TMEM55A だけが貪食に参与している。
- 2) TMEM55A の酵素活性ではなく、TMEM55A 特異的な構造上の特徴に依存して貪食活性が変化している。
- 3) TMEM55A が TMEM55B の活性を上回っており、TMEM55B の機能を代償している。

これらの仮説について検証するため、私は蛍光タグ付きの TMEM55A と TMEM55B を RAW264.7 細胞に発現させて、その局在を確認した。まず、mCherry-TMEM55A もしくは mCherry-TMEM55B を PtdIns(3)P 特異的に結合する EGFP-EEA1-FYVE と共にトランスフェクトして、paraformaldehyde を用いて固定した。固定後、細胞を抗 LAMP1 抗体と Alexa647 結合型蛍光二次抗体で免疫染色した。TMEM55A と TMEM55B はともに LAMP1 とは共局在したが、PtdIns(3)P とは共局在しなかった (Fig. 11、panel 1-5、11-15)。これはこれら二つの脱リン酸化酵素が初期エンドソームではなく後期エンドソームに局在することを示唆している。さらに細胞に mCherry-TMEM55A/B と EGFP-PLC $\delta$ -PH (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> プロブ) を共にトランスフェクトして、抗 LAMP1 抗体で免疫染色した。定常状態では TMEM55A は細胞膜で部分的に PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> と共局在していた (Fig. 11、panel 6-10)。TMEM55B は細胞膜で顕著に EGFP-PLC $\delta$ -PH と共局在した。

次に、貪食時に TMEM55A/B がどこに局在するかを確認した。RAW264.7 細胞に mCherry-TMEM55A/B と共に様々な Rab GTPase をトランスフェクトし、IgG 感作赤血球添加後に固定して TMEM55A/B の局在を観察した。TMEM55A は Rab GTPase の中でも Rab7 と強く共局在した (Fig. 12)。この Rab7 は後期ファゴソームからファゴリソソームに局在し、食胞とリソソームの融合において重要な役割を担っている[28]-[29]。リサイクリングエンドソームのマーカである Rab11 や、初期エンドソームにリクルートされて食胞の酸性化を制御していると報告されている Rab20 とは部分的に共局在していた[30]-[32]。初期エンドソームマーカである Rab5 との共局在は限定的だった[33]。また、TMEM55B についても TMEM55A と同様の局在を示した (Fig. 13)。主に Rab7 と共に共局在した。

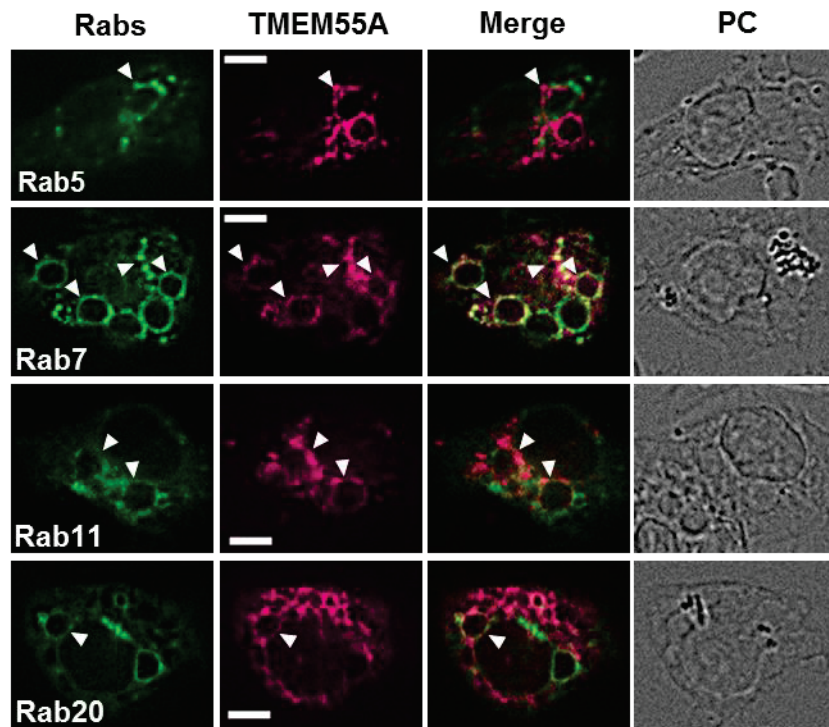
さらに私は TMEM55A/B が基質である PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> が蓄積する phagocytic cup に局在するかどうか検討した。mCherry-TMEM55A/B と EGFP-PLC $\delta$ -PH を発現させたところ

ろ、TMEM55B が特に強く phagocytic cup 上で PLC $\delta$ -PH と共局在した。TMEM55A についても phagocytic cup 上で PLC $\delta$ -PH との共局在を確認した (Fig. 14)。以上のように TMEM55A に特異的な細胞内局在は確認できなかった。これらの結果を踏まえて、私は TMEM55A の方が TMEM55B よりも酵素活性が強く、phagocytic cup や細胞膜やで PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> を脱リン酸化していると推測している。この推測は TMEM55A よりも TMEM55B の方が強く PLC $\delta$ -PH と共局在していたというデータが根拠となっている。



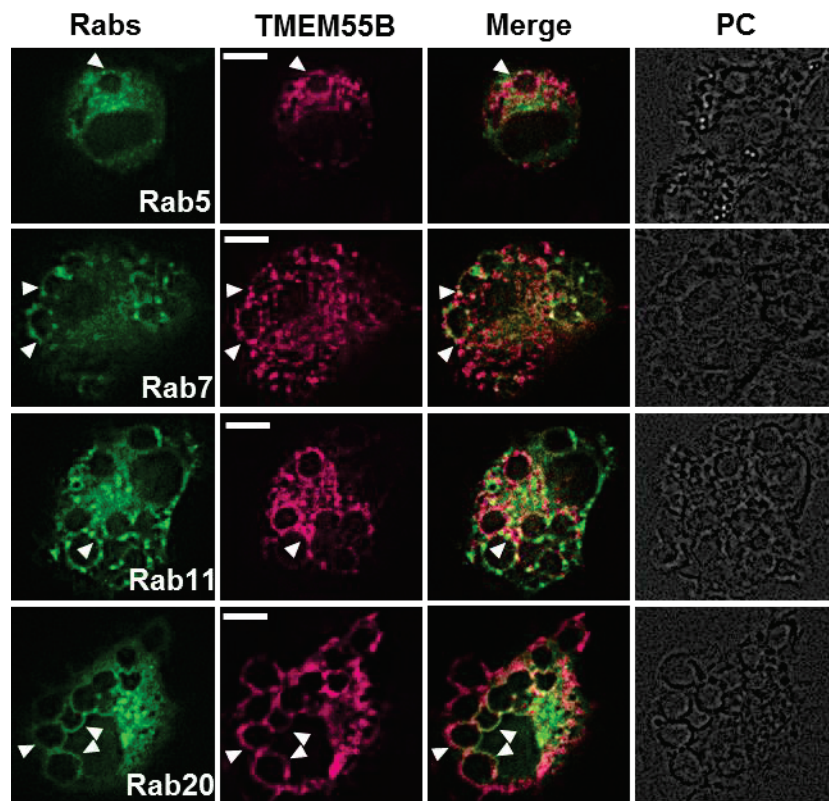
**Fig. 11** 定常状態での TMEM55A/B の細胞内局在

WT の RAW264.7 細胞に mCherry-TMEM55A/B と EGFP-EEA1-FYVE もしくは EGFP-PLCδ-PH をトランスフェクトした。細胞を固定後、抗 LAMP1 抗体で免疫染色して顕微鏡解析を行った。Z スタックは 5  $\mu\text{m}$  の z 軸距離にわたって 1  $\mu\text{m}$  感覚で撮影した。黄色の矢印は TMEM55A/B と LAMP1 の共局在を、白色の矢印は TMEM55A/B と PLCδ-PH との共局在を示している。PC: Phase-contrast images。Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ 。



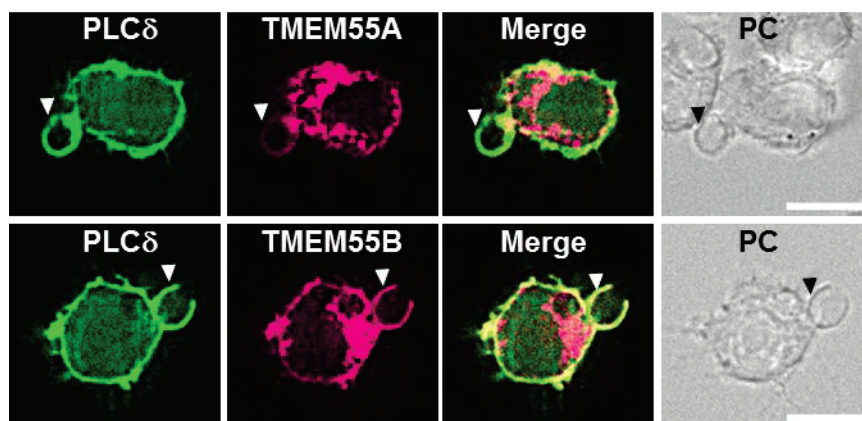
**Fig. 12** 食食過程の食胞上での TMEM55A の局在

WTのRAW264.7細胞に mCherry-TMEM55Aと EGFP タグ付けした各 Rab GTPase をトランスフェクトした。5 時間後に IgG 感作赤血球を添加し、細胞を固定して顕微鏡解析を行った。Z スタックは 5  $\mu\text{m}$  の z 軸距離にわたって 1  $\mu\text{m}$  感覚で撮影した。白色の矢印は TMEM55A と各 Rab GTPase との共局在を示している。PC: Phase-contrast images。Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 13** 食食過程の食胞上での TMEM55B の局在

WT の RAW264.7 細胞に mCherry-TMEM55B と EGFP タグ付けした各 Rab GTPase をトランスフェクトした。5 時間後に IgG 感作赤血球を添加し、細胞を固定して顕微鏡解析を行った。Z スタックは 5  $\mu\text{m}$  の z 軸距離にわたって 1  $\mu\text{m}$  感覚で撮影した。白色の矢印は TMEM55B と各 Rab GTPase との共局在を示している。PC: Phase-contrast images。Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ 。



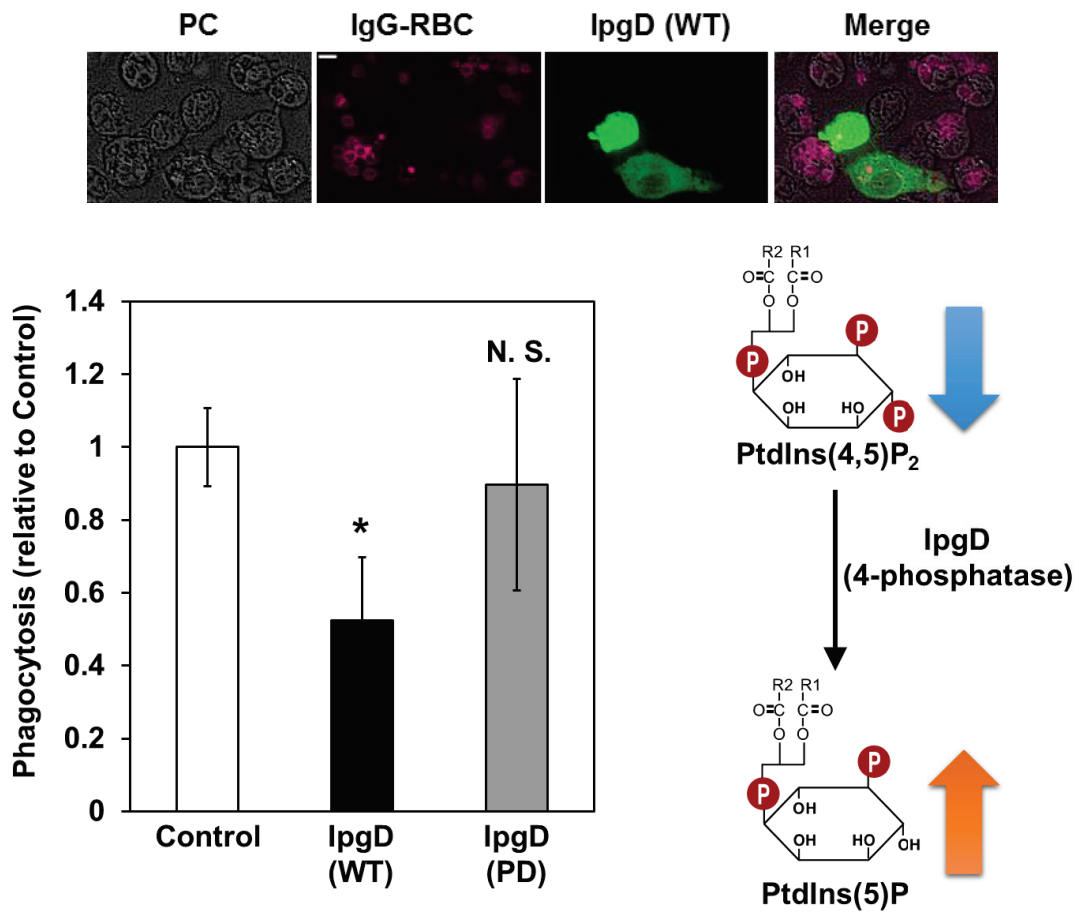
**Fig. 14 phagocytic cup への TMEM55A/B の局在**

WT の RAW264.7 細胞に mCherry-TMEM55A/B と EGFP-PLCδ-PH をトランスフェクトした。5 時間後に IgG 感作赤血球を添加し、細胞を固定して顕微鏡解析を行った。Z スタックは 5  $\mu\text{m}$  の z 軸距離にわたって 1  $\mu\text{m}$  感覚で撮影した。白色の矢印は TMEM55B と PLCδ-PH との共局在を示している。PC: Phase-contrast images。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ 。

## 2-4 PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>の蓄積によって貪食が亢進する

(Fig. 6) や (Fig. 9) で述べた通り、shTMEM55A 細胞では大腸菌の貪食に影響が見られない一方で、大きい粒子の貪食が亢進していた。shTMEM55A 細胞の食胞膜では TMEM55A の減少により、基質である PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>が増加し、PtdIns(5)P が減少していると考えられる。貪食活性の変化が TMEM55A の酵素活性に依存するものであることを確認するために、shTMEM55A 細胞内やその食胞で起きていると考えられる PIPs 変動を模倣して貪食活性にどのような影響を与えるか検討した。まず私は細胞に *Sigella flexineri* 由来の PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の 4 位脱リン酸化酵素である IpgD を RAW264.7 細胞にトランスフェクトし、IgG 感作赤血球の貪食活性を測定した。IpgD の発現により、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>が減少し、PtdIns(5)P が増加すると推測される。その結果、IpgD を発現した細胞では Control 細胞と比較して貪食量が有意に減少した (Fig. 15)。次に、PtdIns(5)P を PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> にリン酸化する PIPK II $\alpha$  を細胞に発現させて貪食活性を測定した。PIPK II $\alpha$  発現細胞では shTMEM55A 細胞と同様に PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>が増加し、PtdIns(5)P が減少しているものと予想される。EGFP-PIPK II $\alpha$  は食胞に局在し、PIPK II $\alpha$  を発現した細胞の貪食量が有意に増加していた (Fig. 16)。

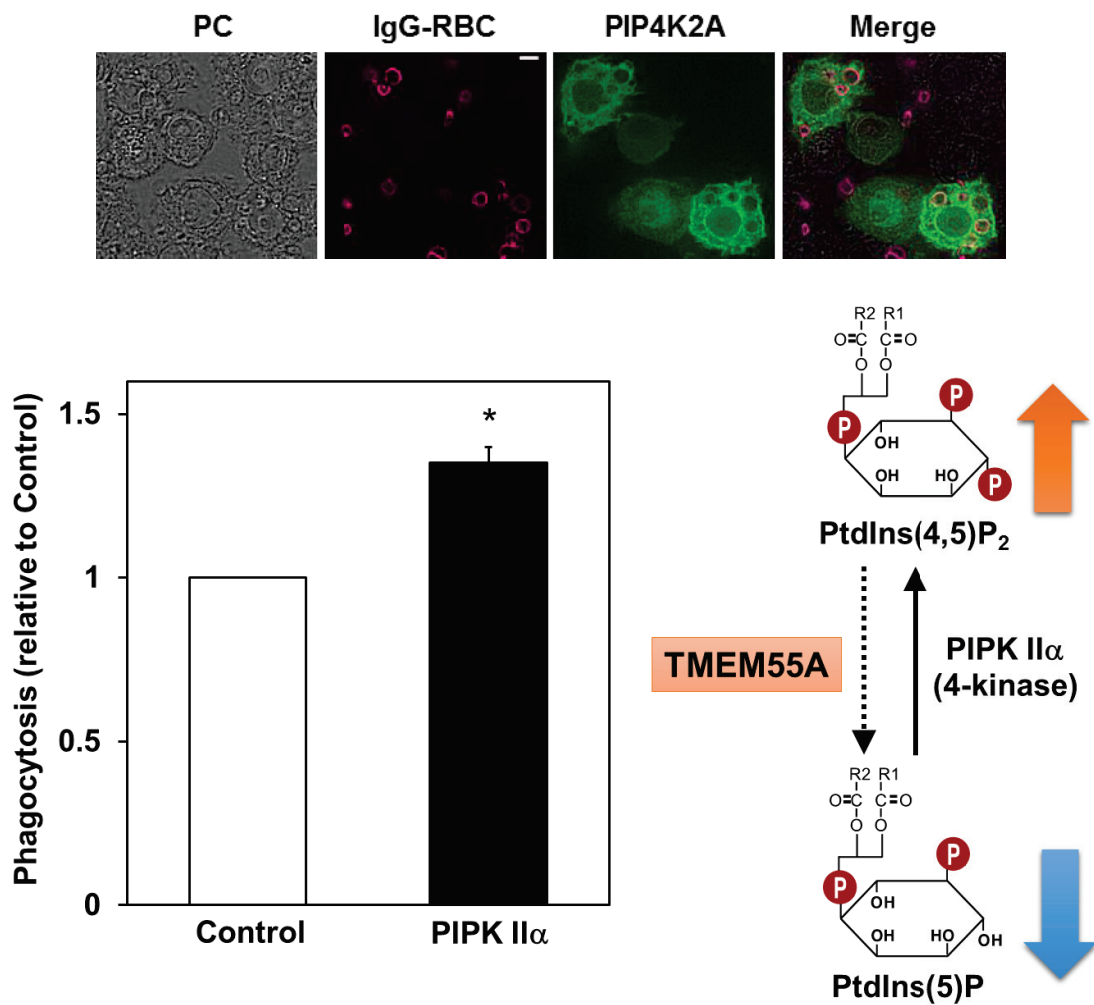
さらに私は PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の 4 位脱リン酸化酵素の産物である PtdIns(5)P が貪食を阻害するかどうか検討した。細胞に外部から C16 の PtdIns(5)P をキャリアタンパク質と共に添加して IgG 感作赤血球の貪食量を測定した。その結果、PtdIns(5)P 処理をしても WT 細胞、shTMEM55A 細胞ともに貪食活性には影響がなかった (Fig. 17)。この結果から、「PtdIns(5)P」の減少よりもむしろ「PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>の増加とそれに続く PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>の増加」が shTMEM55A 細胞における貪食の亢進に関与しているのではないかと示唆された。



**Fig. 15 EGFP-IpgD 発現時の食食活性**

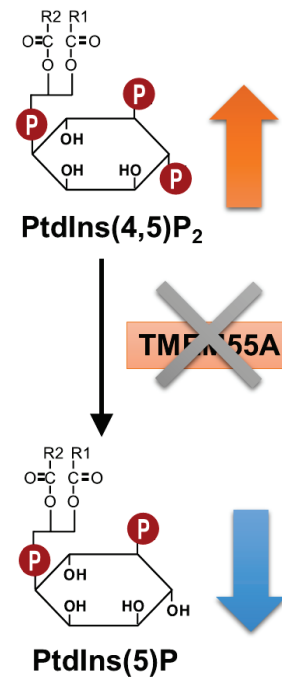
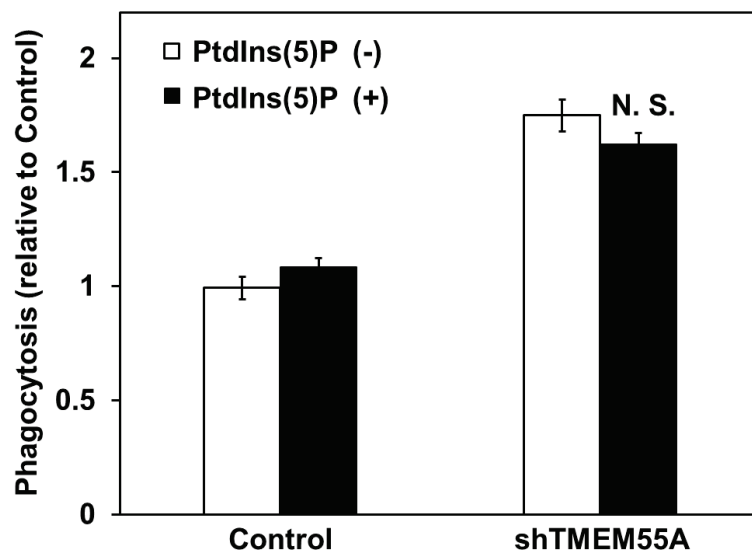
WT の RAW264.7 細胞に EGFP-IpgD (WT もしくは PD) を発現させて、IgG 感作赤血球を添加して蛍光顕微鏡下で取り込んだ赤血球数を計数した。IpgD を発現した細胞に対しての比較対象として IpgD を発現していない細胞の取り込み量を利用した。3 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は means+S.E.とした。\*: P<0.05。PC: phase-contrast images。Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ 。





**Fig. 16 EGFP- PIPK II $\alpha$ 発現時の貪食活性**

WT の RAW264.7 細胞に EGFP-PIPK II $\alpha$  を発現させて、IgG 感作赤血球を添加して蛍光顕微鏡下で取り込んだ赤血球数を計数した。PIPK II $\alpha$  を発現した細胞に対しての比較対象として PIPK II $\alpha$  を発現していない細胞の取り込み量を利用した。3 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は means+S.E. とした。\*: P<0.05。PC: phase-contrast images。Scale bar: 5  $\mu$ m。



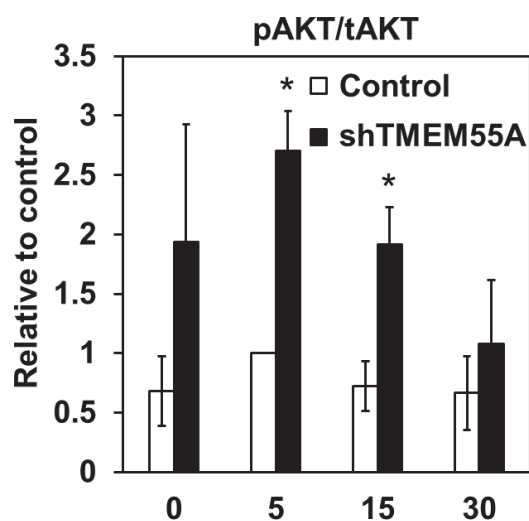
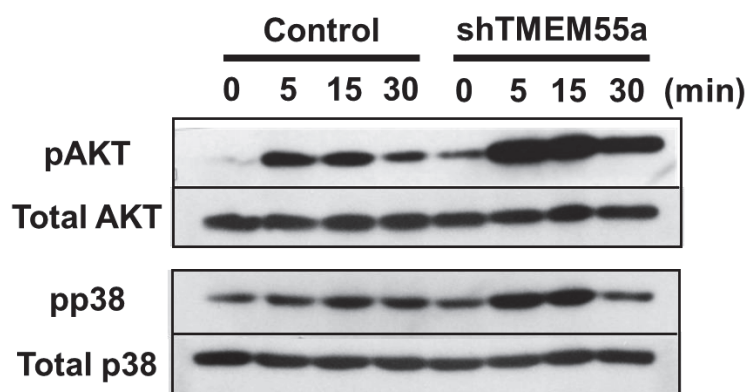
**Fig. 17 PtdIns(5)P 導入時の貪食活性**

WT の RAW264.7 細胞に外部から C16 の PtdIns(5)P をキャリアタンパク質と共に添加した後、IgG 感作赤血球を添加して蛍光顕微鏡下で取り込んだ赤血球数を計数した。Control 細胞の取り込み量を”1”として算出した。3 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は means+S.E.とした。N.S.: 有意差なし。

## 2-5 shTMEM55A 細胞では IgG 刺激時に PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> が増加する

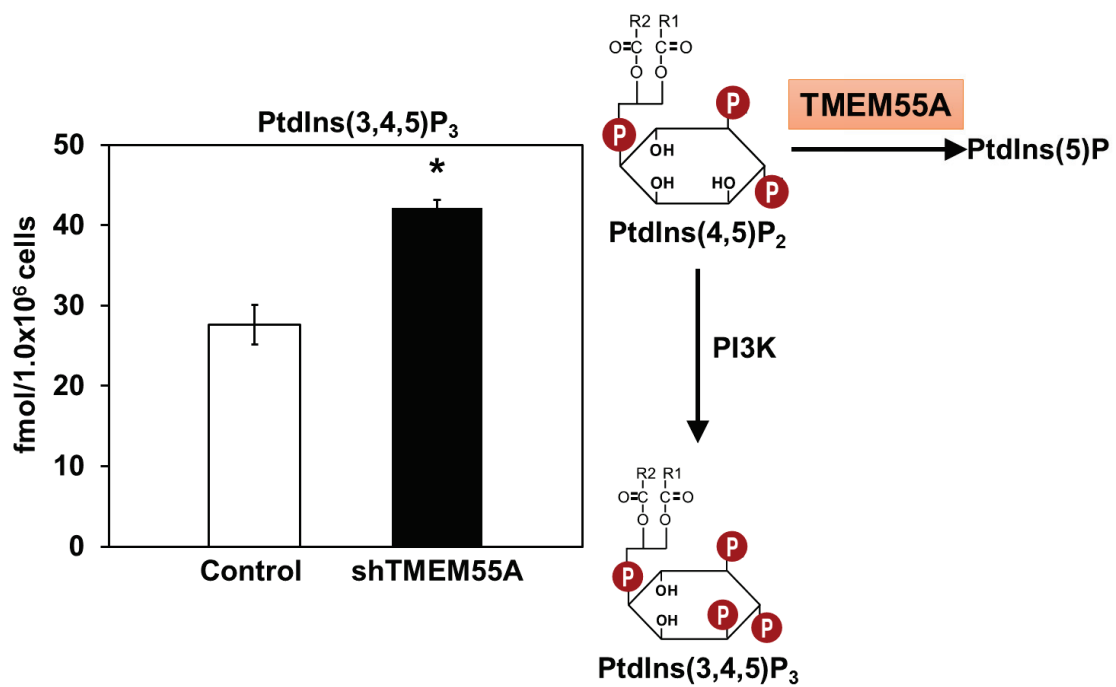
これまでの実験結果より、shTMEM55A 細胞での貪食活性の亢進は TMEM55A の減少に起因する PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 及び PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> の増加によるものであると示唆されている。実際に PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 量に変化があるのか検討した。セリン/スレオニンキナーゼである AKT は PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> を介した活性化を受ける。そのため、AKT のリン酸化レベルは PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> レベルの良い指標として扱われている。そこで、Control 細胞と shTMEM55A 細胞を凝集 IgG で刺激して、AKT のリン酸化をウエスタンブロッティングで評価した。その結果、shTMEM55A 細胞において AKT のリン酸化が Control 細胞と比較して亢進していた (Fig. 18)。p38 についてはリン酸化レベルの変化はわずかなものであった。この結果から、Fcγ受容体刺激時に shTMEM55A 細胞では PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> レベルが上昇していることが示唆された。

続いて私は LC-MS/MS システムを用いた PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> の定量を試みた。凝集 IgG で刺激した RAW264.7 細胞を回収後、酸性リン脂質を抽出して LC-MS/MS システムによって PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 量を測定した。その結果、凝集 IgG 刺激時に shTMEM55A 細胞で Control 細胞と比較して有意に PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> が増加していた (Fig. 19)。先の結果と合わせると、shTMEM55A 細胞で蓄積した PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> が速やかに PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> へ変換されることで AKT のリン酸化が亢進していると考えられる。この結果は IgG 感作された標的の貪食時に、shTMEM55A 細胞の食胞膜で PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> が増加していること、そして TMEM55A が食胞膜で PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> を脱リン酸化していることを強く示唆している。



**Fig. 18 shTMEM55A 細胞の AKT リン酸化レベル**

Control 細胞と shTMEM55A 細胞を 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の凝集 IgG を添加し、37°C で指定の時間インキュベートした。SDS-PAGE でタンパク質を分離後、ウエスタンブロッティングにてリン酸化 AKT を検出した。同時にリン酸化 p38 についても検出を行い、アプライ量のコントロールとして Total AKT 及び Total p38 を検出した。リン酸化レベルの定量化は ImageJ を用いて行い、AKT のリン酸化レベルを Total AKT のバンドの濃さで normalize した。Control 細胞の 5 分時点の数値を”1”として算出した。3 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は means+S.E.とした。\*: P<0.05。



**Fig. 18 shTMEM55A 細胞の PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 量**

Control 細胞と shTMEM55A 細胞を 30 μg/mL の凝集 IgG を添加し、37°C で 2 分間インキュベートした。細胞を回収後 Bligh-Dyer 法にてリン脂質を抽出し、LC-MS/MS システムを用いて PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> を定量した。内部標準として使用した 10 pmol の 20:4/17:0 PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> のクロマトグラムのピーク面積から各 PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 分子種の存在量を算出した。3 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は means+S.E. とした。\*: P<0.05。

## 2-6 TMEM55A は食胞膜上の PIPs 動態に関与する

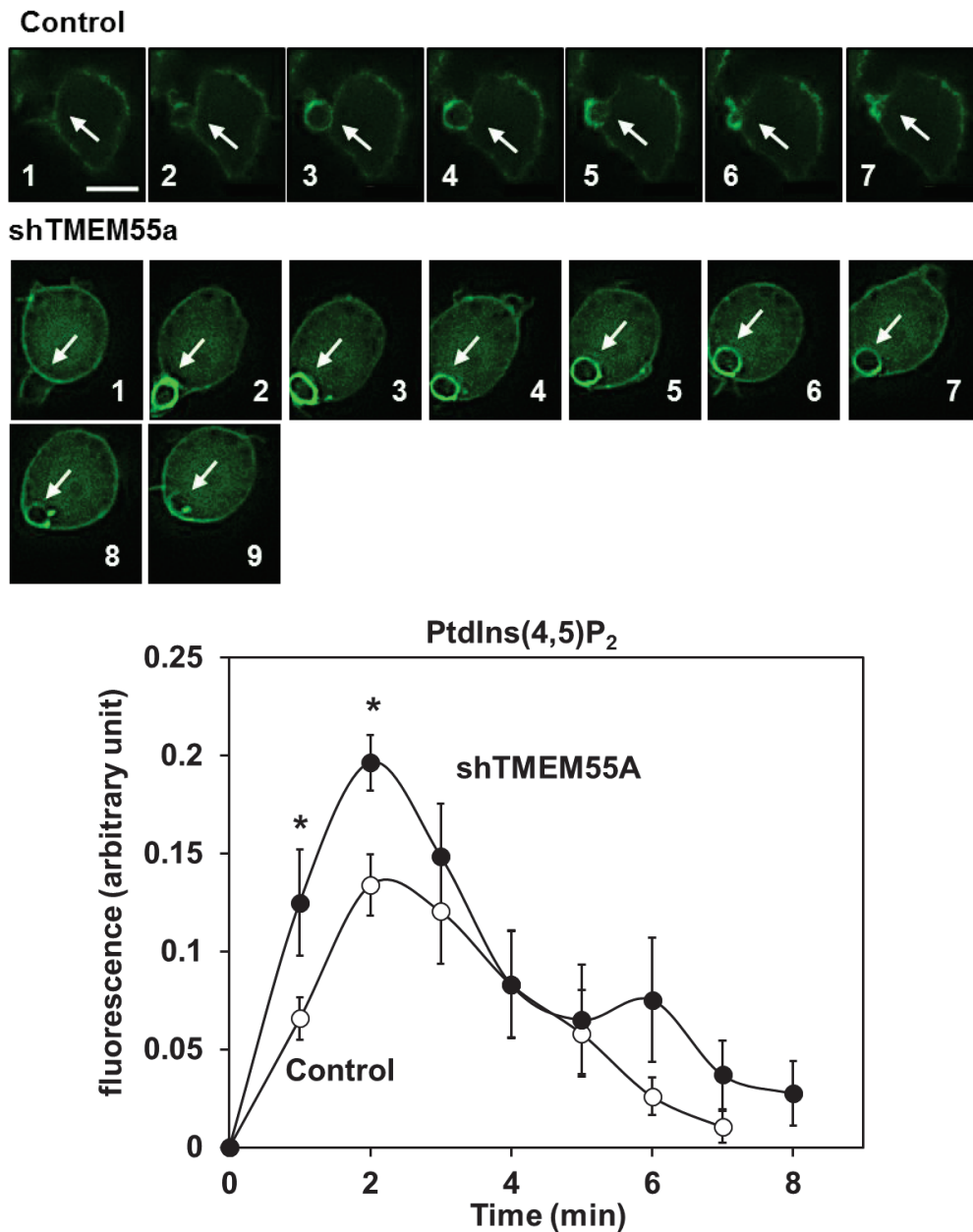
前述の通り、細胞レベルでは IgG 刺激時に PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 量が増加していた。さらに、実際に食胞膜の PIPs レベルが TMEM55A の発現抑制によって変動しているかどうか検討した。PIP<sub>s</sub> を可視化するために、EGFP を融合させた MyoX-PH、PLC $\delta$ -PH をそれぞれ PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> のプローブとして使用した。IgG 感作赤血球を添加後、取り込まれる赤血球の周囲にある蛍光を検出し、蛍光の集積を評価した。

内在性の TMEM55a が PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> を PtdIns(5)P へ脱リン酸化することを示すため、私はまず食胞上の PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> レベルが shTMEM55A 細胞で変化するかどうか調べた。phagocytic cup の形成が開始すると、細胞膜の PtdIns(4)P が cup 上で PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> へリン酸化される [34]。PLC $\delta$ -PH の蛍光は Control 細胞でも shTMEM55A 細胞でも 3 分程度で急速にピークを迎えるが、shTMEM55A 細胞でより強く蛍光が蓄積していることを検出した。それに加えて shTMEM55A 細胞では取り込み完了後も食胞周辺の蛍光の消失が遅延していた (Fig. 19)。次に PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> からクラス I の PI3K によって変換される PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> レベルの変動を評価した。Control 細胞では貪食の開始から 5 分程度で MyoX-PH の蛍光が消失した。一方で、shTMEM55A 細胞では食胞上の PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> レベルが Control 細胞より高く、長く維持されていた (Fig. 20)。

さらに TMEM55A が食胞上での PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> から PtdIns(5)P への脱リン酸化に関与するか確かめるため、私は次に PtdIns(5)P を測定しようと試みた。かねてより、PtdIns(5)P の可視化は難しかったが、PtdIns(5)P に結合するとされる inhibitor of growth protein-2 (ING2) の plant homodomain (PHD) をプローブとして用いた新たな可視化戦略を開発した [27]。シャペロンプラスミドと pColdTM vector を用いた低温発現システムによって 3xHis-3xPHD の組換えタンパク質の精製が可能になった。作製した 3xHis-3xPHD で固定した細胞の表面を覆い、抗 His 抗体と蛍光二次抗体で可視化した。Control 細胞では点状の 3xPHD が zymosan 粒子の表面を囲んでいるのが確認できた (Fig. 21A)。細胞を低張に曝露することで、PtdIns(5)P レベルが顕著に減少することが報告されている [35]。点状の 3xPHD の認識しているものが PtdIns(5)P かどうかを確認するため、貪食後に RAW264.7 細胞を低張の培地に曝露した。驚くべきことに、3xPHD の点状の構造体はほぼ完全に細胞から消失した (Fig. 21A)。さらにこのプローブの有効性を補強するため、細胞を過酸化水素水で処理して 3xHis-3xPHD で染色した。過酸化水素処理によって PtdIns(5)P レベルが増加すると報告されており [36]、実際に核で PtdIns(5)P が蓄積していることを確認した (Fig. 21B)。

食胞の PtdIns(5)P 陽性と陰性を判別するために、profiling image を利用した。食胞の縁がすぐ外側のエリアよりも明るいものを PtdIns(5)P 陽性の食胞とした (Fig. 22A)。この解

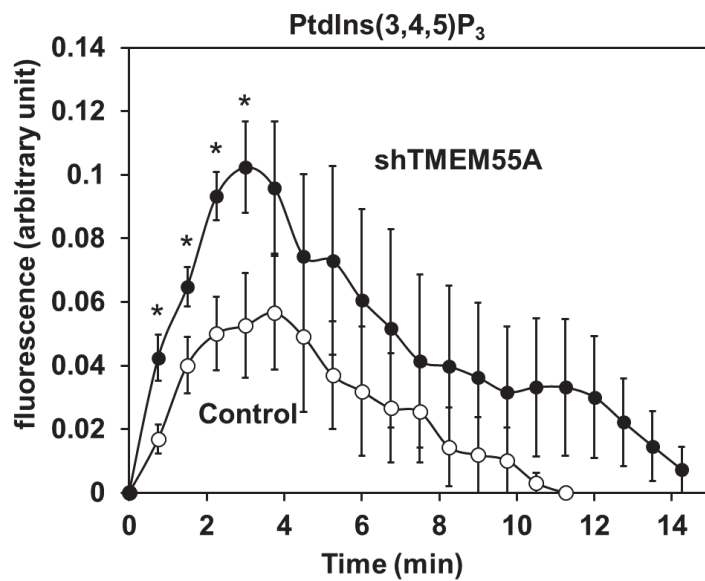
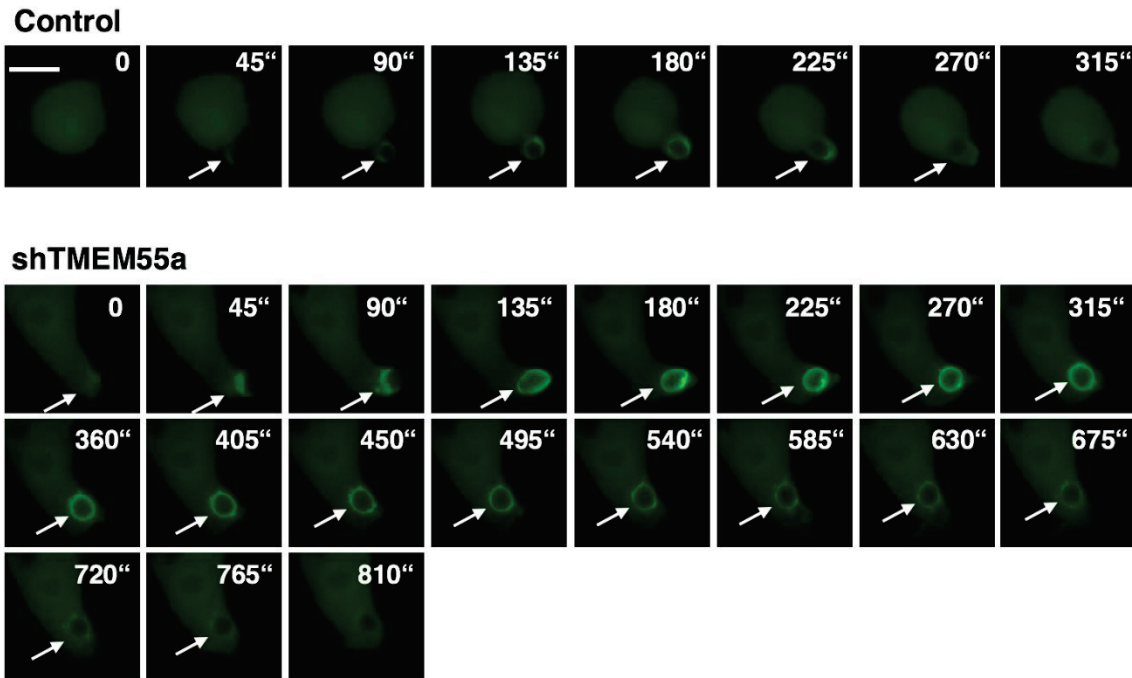
析によって、shTMEM55A 細胞では PtdIns(5)P 陽性の食胞が少ないことを明らかにした (Fig. 22B)。この細胞に外から PtdIns(5)P を添加したところ、細胞の PtdIns(5)P は増加した (Fig. 22B)。この結果から TMEM55A が食胞上で PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> から PtdIns(5)P を産生していることが示唆された。



**Fig. 19 shTMEM55A 細胞の食胞膜における PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 動態**

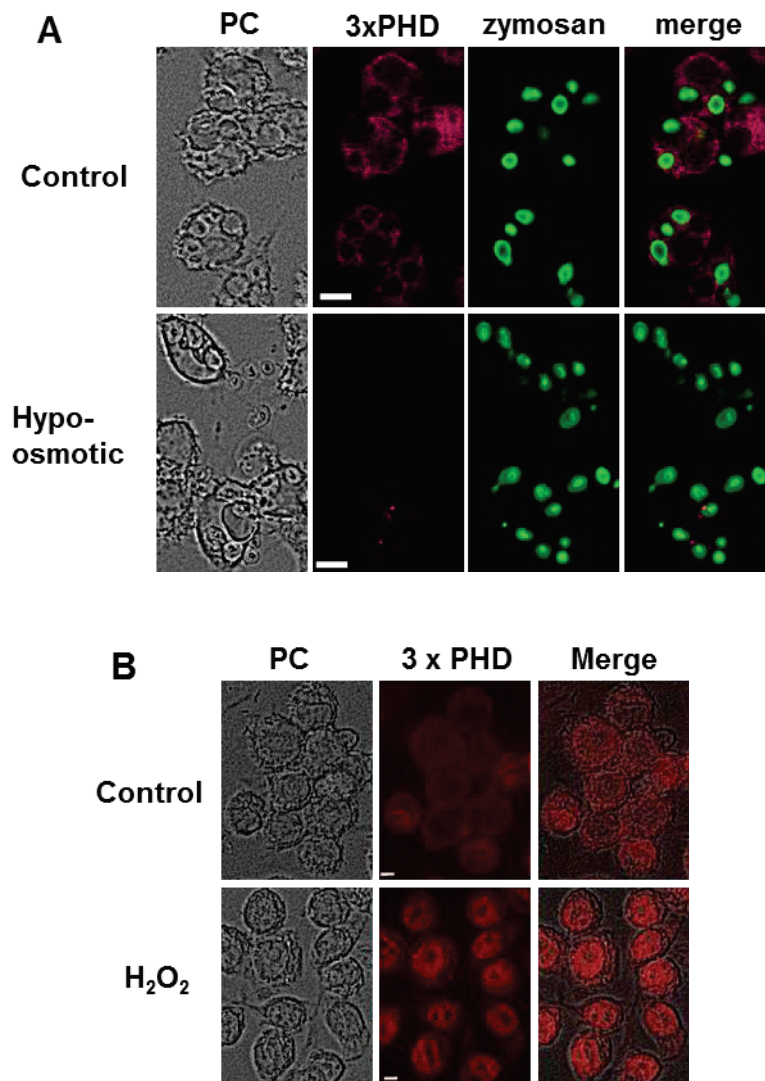
Control 細胞と shTMEM55A 細胞に EGFP-PLC $\delta$ -PH をトランスフェクトして、IgG 感作赤血球を貪食させた。細胞全体の蛍光強度に対する食胞の蛍光強度を算出した。3 つの食胞を測定した結果を、縦軸の数値は means+ S.E.として表している。\*: P<0.05。PC: Phase-contrast images。Scale bar: 10  $\mu$ m。





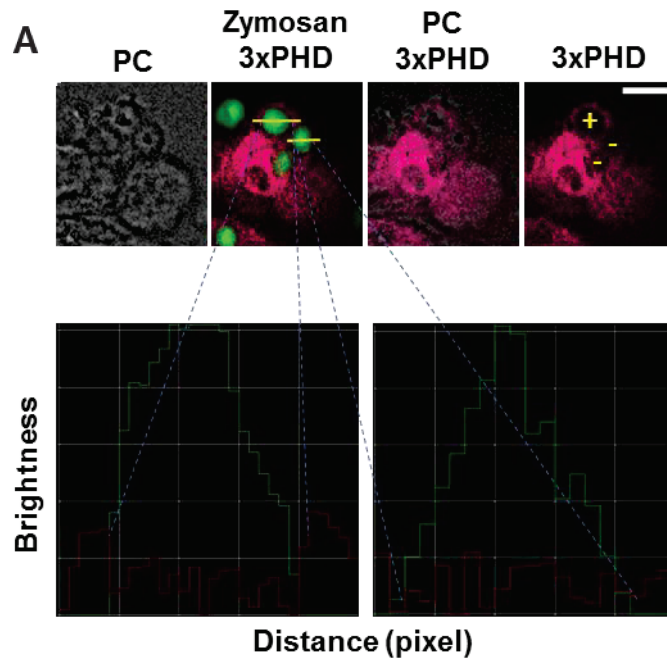
**Fig. 20 shTMEM55A 細胞の食胞膜における PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 動態**

Control 細胞と shTMEM55A 細胞に EGFP-MyoX-PH をトランスフェクトして、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 つの食胞を測定した結果を、縦軸の数値は means+ S.E.として表している。\*: P<0.05。PC: Phase-contrast images。Scale bar: 10 μm。



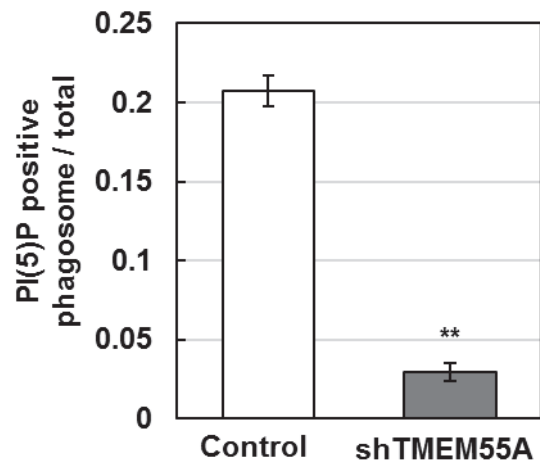
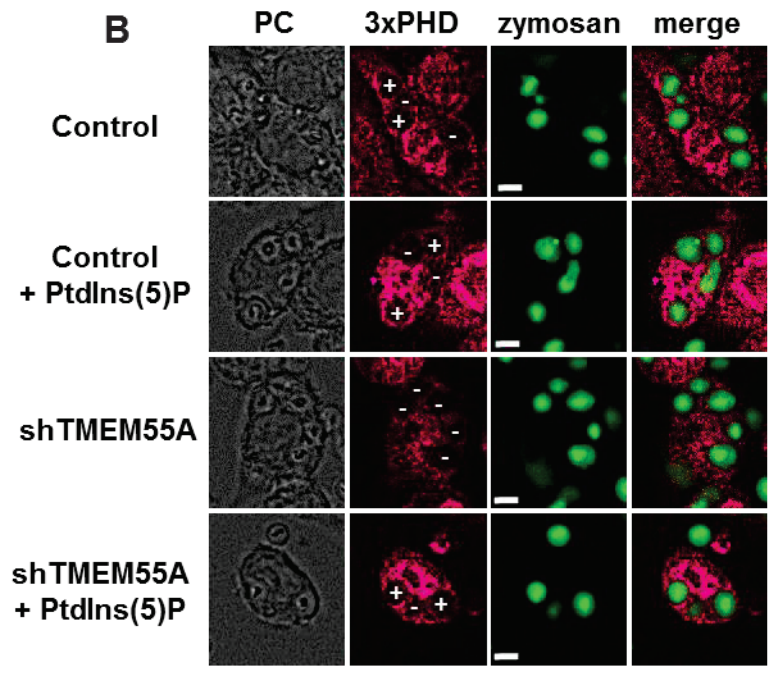
**Fig. 21** 食胞上の PtdIns(5)P 検出

(A) WT の RAW264.7 細胞に FITC-zymosan を貪食させ、細胞を通常の培地と 1/5 の濃度に希釈した培地にそれぞれ曝露した。細胞を固定した後、3xHis-3xPHD を用いて PtdIns(5)P を可視化した。その後、顕微鏡解析を行った。(B) 細胞を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 40 分間処理して、3xHis-3xPHD を用いて細胞を染色した後、顕微鏡解析を行った。PC: Phase-contrast images。Scale bar: 5 μm。



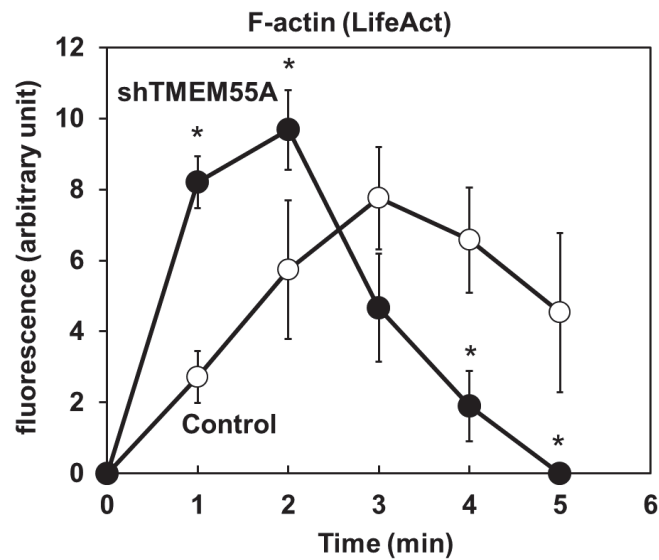
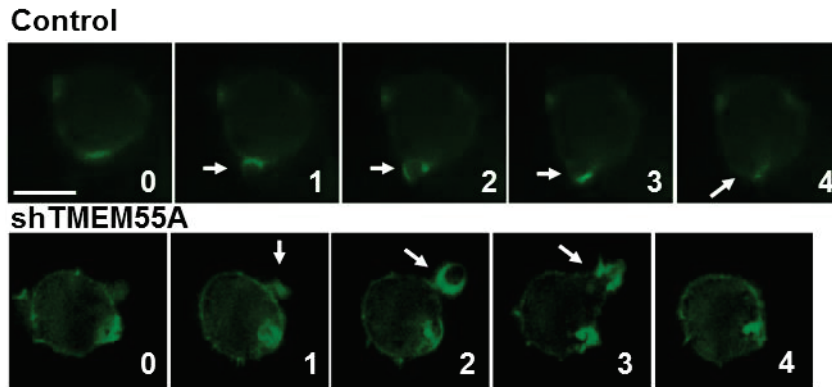
**Fig. 22 shTMEM55A 細胞の食胞膜における PtdIns(5)P レベル**

(A) 食胞の PtdIns(5)P 陽性と陰性を判定するため、食胞に線を引き、その線上の蛍光強度を評価した。食胞の縁の蛍光がすぐ外側の蛍光よりも強いものを PtdIns(5)P 陽性食胞とした。(B) Control 細胞と shTMEM55A 細胞に FITC-zymosan を貪食させ、細胞を固定した後、3xHis-3xPHD を用いて PtdIns(5)P を可視化した。Control 細胞では 60~142 個の zymosan 粒子中 13~28 個の食胞が PtdIns(5)P 陽性であった。shTMEM55A 細胞では 128~141 個の zymosan 粒子中 3~5 個の食胞が PtdIns(5)P 陽性であった。3 回の独立した実験を行い、縦軸の数値は means+ S.E.とした。\*\*: P<0.01。PC: Phase-contrast images。Scale bar: 5  $\mu$ m。



## 2-7 shTMEM55A 細胞では F-actin の重合-脱重合サイクルが促進される

shTMEM55A 細胞では食胞膜の PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> レベル及び PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> レベルが上昇していた。最後に私は TMEM55A の発現抑制によって起こるこれらの PIPs 動態の変動が貪食に重要な F-actin の代謝にどのような影響を与えるか検討した。IgG 感作赤血球取り込み時に phagocytic cup 上の PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> は F-actin の重合を促進する[4]-[6]。その後、重合した F-actin はカップの閉環時には PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> が消失することによって直ちに脱重合する[7]-[9]。F-actin の動態を評価するため、細胞に EGFP-Lifeact をトランスフェクトし、IgG 感作赤血球を取り込ませた。shTMEM55A 細胞では phagocytic cup 上の F-actin の蓄積が増加した (Fig. 23)。予想外だったのは、shTMEM55A 細胞では Control 細胞よりも早く F-actin が分解されたことである。shTMEM55A 細胞で F-actin の消失が加速した原因については正確には不明である。しかし、(Fig. 18) や (Fig. 20) で示したように、PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> の産生が増加していたことから、Rho GTPase を不活性化する Rho-GAP が活性化し、結果としてアクチンの重合が終結した可能性がある。shTMEM55A 細胞で F-actin の蓄積が増加し、かつ F-actin がすばやく分解したことは大きな粒子の取り込みに遊離に働くと考えられる。



**Fig. 23 shTMEM55A 細胞の食胞膜における F-actin 動態**

Control 細胞と shTMEM55A 細胞に EGFP-Lifeact をトランスフェクトして、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つの食胞を測定した結果を、縦軸の数値は means+ S.E.として表している。矢印は phagocytic cup を示している。\*: P<0.05。Scale bar: 10  $\mu$ m。

### 3 考察

shTMEM55A 細胞では IgG 感作赤血球と zymosan 粒子の様な大きい標的の貪食活性が亢進していた一方で、IgG 感作大腸菌の様な小さな標的の取り込みに関しては変化が見られなかった。そして shTMEM55A 細胞において食胞周辺の PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> レベルと PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> レベルが上昇しており、また PtdIns(5)P 陽性の食胞数が有意に減少していた (Fig. 19-22)。これらに加えて F-actin の蓄積も検出した (Fig. 23)。これらの結果から TMEM55A の機能について以下のように考えられる。

TMEM55A は定常状態では主として後期エンドソームに局在し、一部は細胞膜に局在する (Fig. 11-12)。標的粒子を取り込んだ際には、TMEM55A を含む細胞膜が伸展して phagocytic cup を形成する (Fig. 14)。phagocytic cup 上の PtdIns(4)P が PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> にリン酸化されると、この PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> は F-actin の重合を加速させる。TMEM55A は PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> を脱リン酸化してアクチン重合を制限する。これによって最終的に貪食を抑制している。または、F-actin の重合と脱重合のサイクルが大きな粒子の取り込みに必要であることを考えると、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> が減少することで PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> の産生が減少し、次に F-actin の脱重合に関わる Rho-GAP の局在を乱すことで、標的のサイズ依存的な貪食を抑制していると考えられる [9]。TMEM55A の逆反応を触媒する PIPK II $\alpha$  の過剰発現によって貪食が亢進したことも、この仮説を補強している (Fig. 16)。PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の 4 位脱リン酸化酵素である IpgD の発現によって貪食量が低下したことから、酵素活性に従って貪食を抑制している可能性が支持された (Fig. 15)。

TMEM55B は TMEM55A と類似の局在を示す PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の 4 位脱リン酸化酵素である (Fig. 11、13)。しかし、TMEM55B の発現を抑制しても貪食活性は亢進しなかった (Fig. 7)。shTMEM55B 細胞で FLAG-TMEM55A の発現が増加していること (Fig. 5)、過剰発現させた TMEM55B の方が phagocytic cup に強く局在していること (Fig. 14)、そしてデータとしては示していないが TMEM55A の過剰発現が RAW264.7 細胞にとって致死的である一方で、TMEM55B はそのような影響が見られないことを踏まえると、マクロファージにおいては TMEM55A 固有の酵素活性が TMEM55B よりも強く、TMEM55B が欠損したときに代替しているものと考えられる。同等の致死性を IpgD の過剰発現でも確認している。

## 総括

本研究において私はこれまで明らかにならなかった TMEM55A の生理機能の一端を明らかにした。

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> が新生食胞の形成中に F-actin の重合とリモデリングに関与していることは一般的に受け入れられている [37]。食胞上の PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 量は様々なリン酸化酵素や脱リン酸化酵素によって制御されている。この中で、PtdIns(4)P の 5 位リン酸化酵素は以前から貪食と結びつけられてきた。私たちの研究室では RAW264.7 細胞において、少量の PI(4)P 5-kinase  $\beta$  を検出している [38]。一方で  $\alpha$  と  $\gamma$  のサブタイプはより貪食に関与しているようである。PtdIns(4)P 5-kinase  $\gamma$  のノックアウトマウスの骨髄由来マクロファージではアクチン骨格が高レベルで重合されており、Fc $\gamma$  受容体を介した IgG 感作赤血球の結合に支障が生じていた [38]。一方で、PtdIns(4)P 5-kinase  $\alpha$  のノックアウトでは結合には影響がなかったが、WASP と Arp2/3 の活性化が低下したことで貪食が阻害された。そして次に phagocytic cup での新規のアクチン重合が障害された。このように、私は PtdIns(4)P 5-kinase によって産生される PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> が TMEM55A によって脱リン酸化されており、この結果 PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> から産生される PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> が減少する。これによって大きな粒子に対する phagocytic cup の形成と貪食の完了に必要な F-actin の重合と脱重合のサイクルが抑制されているものと推測している (Fig. 24)。本研究は、発見からこれまで進展のなかった TMEM55A の研究において、実際に細胞内で内在酵素が PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の 4 位脱リン酸化酵素として機能していることを初めて示したものである。

TMEM55A と TMEM55B はもともとエンドソームの成熟に関与していると報告された酵素である [11]。両方の酵素が貪食中の食胞に局在したことから (Fig. 14)、これらがともに食胞の成熟段階において働いているというのは合理的な考え方である。更なる研究によって、食胞の酸性化や食胞における Rab-GTPase と LAMP1/2 の交代における TMEM55A の機能について評価していく。また、東京医科歯科大学病態生理化学分野にて TMEM55A のノックアウトマウスが樹立されている。そしてこのマウスには骨の形成異常と成長の遅延という表現型が存在する。マクロファージは骨代謝に関わる破骨細胞と起源を同じくする細胞であり、TMEM55A の発現抑制によってマクロファージの貪食が活性化していることと、ノックアウトマウスにて骨の形成異常が起きていることはつながっているように考えられる。ノックアウトマウスを利用した *in vivo* での TMEM55A の機能解明についても研究を進めていく。



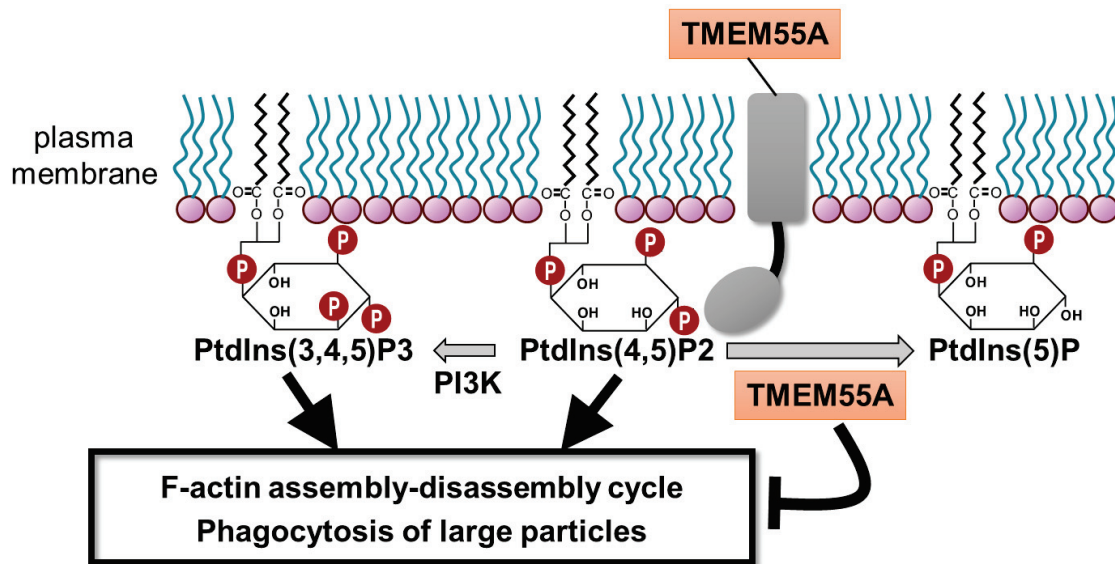


Fig. 24 TMEM55A の食胞膜における働き

## 原著論文

本研究は以下の通り公表した。

Morioka S, Nigorikawa K, Okada E, Tanaka Y, Kasuu Y, Yamada M, Kofuji S, Takasuga S, Nakanishi H, Sasaki T, Hazeki K, “TMEM55a localizes to macrophage phagosomes to downregulate phagocytosis.”, *Journal of Cell Science*, 131(5), jcs213272, 2018.

## 参考文献

- [1] R. S. Flannagan *et al*, “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] R. J. Botelho *et al*, “Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis.” *J. Cell Biol.*, vol. 151, no. 7, pp. 1353–1368, 2000.
- [5] S. A. Freeman, and S. Grinstein, “Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton.”, *Immunol. Rev.*, vol. 262, no. 1, pp. 193–215, 2014.
- [6] E. Szymańska *et al*, “Expression of PI(4,5)P<sub>2</sub>- binding proteins lowers the PI(4,5)P<sub>2</sub> level and inhibits FcγRIIA-mediated cell spreading and phagocytosis.” *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 1, pp. 260–272, 2008.
- [7] N. Araki *et al*, “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.
- [8] D. Cox *et al*, “A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension.”, *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 3, pp. 1240–1247, 1999.
- [9] D. Schlam, *et al*, “Phosphoinositide 3-kinase enables phagocytosis of large particles by terminating actin assembly through Rac/Cdc42 GTPase-activating protein.”, vol. 6, 2015.

- [10] Y. Ikeda *et al*, “Rac1 switching at the right time and location is essential for Fcγ receptor-mediated phagosome formation.”, *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 15, pp. 2530–1240, 2017.
- [11] A. Ungewickell *et al*, “The identification and haracterization of two phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatases.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102, no. 52, pp. 18854–18859, 2005.
- [12] K. Niebuhr, *et al*, “Conversion of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology.”, *EMBO J.*, vol. 21, no. 19, pp. 5069–5078, 2002.
- [13] F. Boal *et al*, “TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation.”, *J. Cell Sci.*, vol. 128, no. 4, pp. 815–827, 2015.
- [14] D. Ramel, *et al*, “Shigella flexneri infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling.”, *Sci. Signal.*, vol. 4, no. 191, pp. ra61, 2011.
- [15] J. Zou, *et al*, “Type I phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatase regulates stressinduced apoptosis.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 104, no. 43, pp. 16834–16839, 2007.
- [16] C. D. Ellson *et al*, “Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes.”, *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 20, pp. 1631–1635, 2001.
- [17] R. A. Fratti, *et al*, “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.
- [18] O. V. Vieira *et al*, “Phagosome maturation: aging gracefully.”, *Biochem. J.*, vol. 366, no. Pt 3, pp. 689–704, 2002.
- [19] 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. 19–25, 2001.

- [20] 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.
- [21] G. Schabbauer *et al*, “Myeloid PTEN promotes inflammation but impairs bactericidal activities during murine pneumococcal pneumonia.”, *J Immunol.*, vol. 185, no. 1, pp. 468–476, 2010.
- [22] S. Morioka, K *et al*, “Phosphoinositide phosphatase Sac3 regulates the cell surface expression of scavenger receptor A and formation of lipid droplets in macrophages.”, *Exp Cell Res.*, vol. 357, no. 2, pp. 252–259, 2017.
- [23] N. Ninomiya *et al*, “Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling.”, *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 36, pp. 22732–22737, 1994.
- [24] M. Vicinanza *et al*, “PI(5)P regulates autophagosome biogenesis.”, *Mol. Cell.*, vol. 57, no. 2, pp. 219–234, 2015.
- [25] M. Fukuda *et al*, “Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity.”, *Mol Cell Proteomics.*, vol. 7, no. 6, pp. 1031–1042, 2008.
- [26] J. Riedl *et al*, “Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin.”, *Nat. Methods.*, vol. 5, no. 7, pp. 605–607, 2008.
- [27] O. Gozani *et al*, “The PHD Finger of the Chromatin-Associated Protein ING2 Functions as a Nuclear Phosphoinositide Receptor.”, *Cell.*, vol. 114, no. 1, pp. 99–111, 2003.
- [28] G. D. Farin *et al*, “How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes.”, *Trends Immunol.*, vol. 33, no. 8, pp. 397–405, 2012.
- [29] O. V. Vieira *et al*, “Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase.”, *Mol. Cell.*, vol. 23, no. 7, pp. 2501–2514, 2003.

- [30] D. Cox *et al*, “A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 97, no. 2, pp. 680–685, 2000.
- [31] Y. Egami *et al*, “Rab20 regulates phagosome maturation in RAW264 macrophages during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis.”, *PLoS ONE.*, vol. 7, no. 4, e35663, 2012.
- [32] 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. 365–375, 2014.
- [33] H. Horiuchi *et al*, “A novel Rab5 GDP/ GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function.”, *Cell.*, vol. 90, no. 6, pp. 1149–1159, 1997.
- [34] M. G. Coppolino *et al*, “Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Ialpha impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis.”, *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 46, pp. 43849–43857, 2002.
- [35] D. Sbrissa *et al*, “Phosphatidylinositol 5-phosphate biosynthesis is linked to PIKfyve and is involved in osmotic response pathway in mammalian cells.”, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 49, pp. 47276–47284, 2002.
- [36] D. R. Jones *et al*, “PtdIns5P is an oxidative stress-induced second messenger that regulates PKB activation.”, *FASEB J.*, vol. 27, no. 4, pp. 1644–1656, 2013.
- [37] L. Tuosto *et al*, “The multifaceted role of PIP2 in leukocyte biology.”, *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 23, pp. 4461–4471, 2015.
- [38] Y. S. mao *et al*, “Essential and unique roles of PIP5K-gamma and -alpha in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis.”, *J. Cell Biol.*, vol. 182, no. 2, pp. 281–296, 2009.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導してくださいました広島大学医系科学研究科の野村渉教授、小澤孝一郎教授、細井徹准教授、濁川清美助教に心より感謝いたします。また、ご退官された樫木薫准教授に深く感謝いたします。

各種プラスミドベクターを快く分与くださいました東京医科歯科大学の佐々木雄彦教授、東北大学の福田光則教授、Paul Sabatier 大学の Bernard Payrastre 教授、秋田大学の高須賀俊輔助教に感謝いたします。

LC-MS/MS システムについて熱心にご指導くださいました秋田大学の中西広樹助教に感謝いたします。

実験に関して快く相談に乗ってくださった東京医科歯科大学の小藤智史先生に感謝いたします。

これまでの研究生活を共にし、本研究を様々な面で支えてくださいました創薬標的分子科学研究室の皆様、特に苦楽を共にした嘉数裕大学士、田中良昌学士、岡田恵理学士には大変感謝しております。

最後に、いつも応援し、温かく見守ってくれた父、母、弟、祖母に心より感謝したいと思います。

ありがとうございました。

令和2年1月6日