

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06831

研究課題名(和文) マクロパイノサイトーシスに関連する新規エンドサイトーシス経路の分子基盤と機能解析

研究課題名(英文) Molecular and functional analysis of a novel endocytic pathway associated with macropinocytosis

研究代表者

荒木 伸一 (Araki, Nobukazu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10202748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マクロファージのマクロパイノサイトーシス経路の初期過程でRab10陽性の管状構造が派生することを見出し、この構造が新たなエンドサイトーシス経路であることを提唱した。さらにこのRab10陽性管状構造の微小管依存性、Rac1やPI3Kによる制御、EHBP1などRab10下流分子との関連をライブセルイメージングで明らかにした。この経路は、PI3K阻害時に液相性マクロパイノゾームから分岐し管状エンドゾームによる膜輸送へと切り替えられ、ゴルジ域の中心へと運ばれる。免疫チェックポイント分子として着目されるPD-L1は高濃度にRab10陽性管状エンドゾームに取り込まれ、輸送されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってマクロパイノサイトーシス経路から派生する新たなエンドサイトーシス経路としてRab10陽性管状エンドゾームの存在が確立され、その形成・制御の分子基盤や機能の一部が解明された。この経路は、通常のエンドサイトーシス経路と異なりリソゾームによる分解を受けないという特徴があり、機能的には、免疫チェックポイント療法の標的分子として知られるPD-L1の細胞内輸送経路として働いている可能性が高い。これらのことから、この経路の分子メカニズムを理解し制御することが可能になれば、がん免疫療法の改善・応用にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that Rab10-positive tubular structures arise from macropinocytic cups during an early stage of macropinocytosis in RAW264 macrophages and proposed that these structures represent a novel endocytic pathway. By live-cell imaging, we further demonstrated that the Rab10-positive tubular structures are dependent on microtubules, regulated by Rac1 and PI3K, and are associated with EHBP1, as a downstream molecule of Rab10. Upon PI3K inhibition, fluid-phase endocytosis through macropinosomes was switched to a membrane transport pathway through Rab10-positive tubules. It was also found that PD-L1, a target molecule for immune checkpoint therapy, is incorporated into Rab10-positive tubular endosomes and transported toward the Golgi region. Thus, this novel endocytic pathway may contribute to the intracellular transport of important membrane molecules.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンドサイトーシス 膜輸送 Rabタンパク質 マクロパイノサイトーシス ライブセルイメージング 光遺伝学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

液相性取り込みであるマクロパイノサイトーシスは、マクロファージや樹状細胞になどの抗原提示細胞で細胞外液中の高分子を取り込み抗原提示経路へと供することで免疫応答に与る。一方、サルモネラなどの病原菌、エボラウイルス、インフルエンザ、HIVなど多くのウイルスは宿主細胞のマクロパイノサイトーシスを誘起させて侵入し、感染することも知られている。また最近では、がん細胞が増殖のためのアミノ酸摂取経路としてマクロパイノサイトーシスを利用することが報告され注目を集めている。このようなマクロパイノサイトーシスの機能的な重要性や多くの疾患との関連から鑑みて、その分子基盤や制御機構の解明は重要な課題である。

我々は、Gタンパク質分子スイッチ Rac1 のオプトジェネティクス(光制御)でマクロパイノソーム形成機構を解析する中で、Rac1 光制御で誘導したマクロパイノソーム前駆構造からゴルジ域へ向かう Rab10 陽性の長い管状構造が多数起こることを見出した。この Rab10 陽性管状構造は、これまでに知られるエンドゾームマーカー (Rab4, Rab5, Rab7, Rab11 など) が局在せず、リソゾームとも融合しないことから通常のリソゾーム分解系へ向かうエンドサイトーシスとは異なる新規のエンドサイトーシス経路であろうと考え、この未知のエンドサイトーシス経路の特性、制御機構、機能について探求することにした。

### 2. 研究の目的

マクロパイノサイトーシスから派生する Rab10 陽性管状構造を Rac1 光制御や細胞刺激の方法で選択的に誘導し、従来のエンドサイトーシスとの分子特性の比較により新規エンドサイトーシス経路としての存在を確立する。Rac1 GTPase 及び PI3K ホスホイノシチド代謝による制御や Rab10 下流分子の探索、Rab10 変異体発現の影響、関連分子局在の特徴からこの経路の特徴や管状構造形成制御の分子メカニズムを明らかにする。そして、この従来の概念にない非分解系経路で輸送される物質を特定しこの経路の生理的機能、病態との関連について追究する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Rab10陽性管状エンドゾームの新規細胞内輸送経路としての確立

RAW264 マクロファージ様培養細胞に photoactivatable-Rac1 (PA-Rac1, LOV融合-Rac1Q61L) ないし PHR-iSH PI3Kを核内遺伝子導入で発現させ、これらの分子の活性を顕微鏡下で青色光照射することによって光制御をしながら RFP-Rab10 との共発現系ライブセルイメージングで観察した。Rab10 陽性管状エンドゾーム経路と Rab10陰性マクロパイノサイトーシス経路を経時的に追跡することで、これら細胞内輸送経路との Rac1 および PI3K の関連性を解析した。また、ホルボールエステル (PMA) やマクロファージコロニー刺激因子 (CSF-1) による細胞刺激でのマクロパイノサイトーシス誘導の実験系でも Rab10陽性管状エンドゾームの新規細胞内輸送経路としての存在を確認した。

#### (2) Rab10 陽性管状構造形成のメカニズムおよび特性について

PI3Kクラス特異性阻害剤、Akt阻害剤の影響、Rab10タンパク質下流分子の発現、Rab10変異体発現、Akt-PH domain発現による PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の可視化、細胞骨格系機械分子のダイナミクスなどを蛍光ライブセルイメージングで観察し、管状構造形成と輸送の制御メカニズムを解析した。

#### (3) Rab10陽性管状エンドサイトーシス経路の機能について

この経路によって何がどこへ輸送されるのかをマクロファージ細胞膜に存在する Toll-like レセプター (TLRs)、マンノースレセプター、PD-L1 などについて蛍光タンパク質融合分子を発現させて観察した。また、種々の蛍光標識トレーサーの取り込みあるいは免疫蛍光法によって Rab10陽性輸送経路への関わりを探索した。

### 4. 研究成果

(1) RAW264 細胞に PA-Rac1 ないし PHR-iSH PI3K を発現させ、顕微鏡下オプトジェネティクスで Rac1 と PI3K それぞれの活性を光制御し、それによって誘起されるマクロパイノサイトーシス過程を比較解析した。蛍光タンパク質融合 Rab10 との共発現系ライブセルイメージングで Rab10 陽性となるものとならないものを経時的に追跡した結果、PI3K の活性化により誘起されたマクロパイノサイトーシスでは、初期のマクロパイノサイティックカップに Rab10 は一過性に少量しかリクルートされず、カップが閉じて Rab10 陰性マクロパイノソームになった。一方 Rac1 活性化により誘起した場合はマクロパイノサイティックカップが Rab10 強陽性となりそこから Rab10 陽性の管状構造が伸張し、マクロパイノソーム本体は小さくなって消失した。また、RAW264 細胞に PKC 活性化剤である PMA や CSF-1 を添加した細胞を活性化した場合、通常のマクロパイノサイトーシスが誘起されるが、その中から少数であるが Rab10 陽性管状エンドゾームが生じることも確認された。この Rab10 陽性管状エンドゾームも、Rab4, Rab5, Rab7, Rab11 などの通常のエンドゾームマーカーの局在が見られず、リソゾームとの融合も認められないため PA-Rac1 で誘導される

新規エンドサイトーシス経路と同一のものとして確認できた。このことは、Rab10陽性管状エンドサイトーシス経路が、Rac1の光制御という人工的な環境下のみならず生理的な条件下での細胞で普遍的に存在し、何らかの機能をはたしていることを示唆する。さらにPI3K阻害剤のwortmanninやLY294002存在下でPMAやCSF-1を添加した場合は、典型的なマクロパイノゾーム形成は抑制され、代わりにRab10陽性管状エンドソーム構造の形成が多数見られた。このことからRab10陽性のエンドサイトーシス経路は、PI3K活性化非依存的にRac1活性化で誘起され、PI3K阻害状態ではさらにこのエンドサイトーシス経路が亢進することが分かった。

(2)初年度の研究で、RAW264 細胞に、すべてのクラスのPI3キナーゼを阻害するwortmanninの存在下でPMAを添加すると、典型的なマクロパイノゾーム形成は阻害され、そこからRab10陽性管状構造が多数形成されることが分かったので、このRab10 陽性管状新規輸送経路におけるPI(3,4,5)P<sub>3</sub>生成の役割について解析を行った。RAW264細胞にGFP-Rab10を発現させ、PMA刺激によるRab10陽性管状エンドソームの形成に対するwortmannin以外のPI3キナーゼ阻害剤の影響を定量的に評価した。その結果、LY294002,ZSTK474などのクラスI PI3Kを阻害する薬剤で、マクロパイノゾーム形成が抑制されRab10陽性管状エンドソームの形成が有意に増加した。さらにクラスI PI3キナーゼの下流にあるAkt(protein kinase B)を、MK-2206やAKT inhibitor Xで阻害した場合は、マクロパイノゾームの形成は抑制されないが、Rab10陽性管状エンドソームはやはり増加した。これらの結果は、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>が生成されないことでマクロパイノサイティックカップの閉鎖が抑制され、さらにAktが抑制されることでRab10陽性管状エンドソーム形成が促進されるということが考えられ、通常のマクロパイノサイトーシスで必要であるPI3K-Aktシグナリングを阻害することで、Rab10陽性管状エンドソームによる膜輸送経路へ切り替えられることが示唆される。

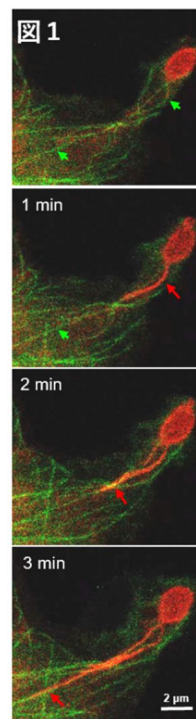
Rab10およびその近縁のRab8、Rab35などの活性状態を制御する活性化因子(GEF)と不活性化因子(GAP)の関わりについても検討したが、Rab10のGEFとして働くDENND4C、GAPとして働くTBC1D4(AS160)の局在とRab10陽性管状構造には明らかな関係性は見いだせなかった。近縁の制御因子の中では、GRAF2(ARHGAP10)がRab10陽性のカップと管状構造に局在し、これら構造との関与が示唆された。また、Rab10陽性カップ・管状構造との関連性が認められなかった他のDENNDファミリーの中で、DENND1Bが細胞基底部の未知の構造物に局在することが確認された。このDENND1Bが局在する構造について細胞骨格系や他のマーカートンパク質の関係を調べ、ラメリポディア基底部に存在し細胞接着に関わる新規構造として論文発表した(Park et al. Histochem. Cell Biol.2021)。

Rab10陽性エンドサイトーシス経路におけるRab10の役割の解析では、常時活性型Rab10変異体発現は野生型Rab10と大きな差異が見られず、常時不活性型Rab10の過剰発現では、細胞が死んだり形態に大きな影響を与えたりするため、管状構造形成過程への影響は評価が難しいということが分かった。Rab10下流分子の探索においてはRab10に結合するEHBP1がRab10陽性カップと管状エンドソーム上に多く見られ、さらにEHBP1に結合するEHD1が管状部分に局在していた。Rab10は、EHBP1を介してEHD1を膜にリクルートすることで膜管状化に働くことが考えられる。管状エンドソームは、微小管に沿って細胞中心部のゴルジ域に移動することもライブイメージングで可視化された(図1)。

我々の研究によりRac1活性の光制御やPI3K阻害時に通常のマクロパイノサイトーシス経路から派生して生じるRab10陽性管状エンドサイトーシス経路が、新規のエンドサイトーシス経路であると証明され、Rab10陽性管状構造形成のメカニズムの一部が解明されたので、これを原著論文として発表した。(Kawai et al., Front. Immunol.2021)。

(3) Rab10 陽性管状エンドサイトーシス経路が、何を輸送しているのか、どこへ運ばれているのかを、エンドソームやリサイクリングエンドソームに取り込まれることが知られるいくつかの蛍光トレーサーを用いて観察した。コレラトキシンB、IgG、ConAレクチンなどのRab10陽性管状エンドソームへの取り込みが確認できたがいずれも少量で非特異的な膜の取り込みではないかと思われる。蛍光タンパク質融合Toll-likeレセプターやFcレセプターの取り込みを観察しても蛍光シグナルは微弱で非選択的な膜の取り込みによるものと思われた。

これまでに我々が観察した中で、Rab10陽性管状構造に最も強いシグナルが認められたのは、がん細胞表面のPD-1に結合するPD-L1であった。GFP-PD-L1の強制発現だけでなく抗PD-L1抗体での免疫蛍光顕微鏡観察においても内在性PD-L1がRab10陽性管状エンドソームに局在することが確認された。PD-L1は、マクロファージを含む抗原提示細胞の細胞膜表面に発現しPD-1と共に腫瘍免疫療法の重要なターゲット分子であるが、その細胞内輸送経路については解明されていない。PD-L1は、Rab10陽性エンドサイトーシス経路によって輸送される重要なカーゴ(積み荷)の一つとして考えられ、今後の研究の発展が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Swanson Joel A., Araki Nobukazu	4. 巻 98
2. 論文標題 Roles for 3' Phosphoinositides in Macropinocytosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Subcellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 119 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-94004-1_7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawai Katsuhisa, Nishigaki Arata, Moriya Seiji, Egami Youhei, Araki Nobukazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Rab10-positive tubular structures represent a novel endocytic pathway that diverges from canonical macropinocytosis in RAW264 macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.649600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 川合 克久, 荒木 伸一	4. 巻 56
2. 論文標題 Rac1 ON-OFFスイッチングによるマクロピノサイトーシスとファゴサイトーシスの時空間制御の解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 64-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.56.2_64	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Katsuhisa, Egami Youhei, Nishigaki Arata, Araki Nobukazu	4. 巻 53
2. 論文標題 Rab35 Targeting to the Plasma Membrane Is Dependent on the C-terminal Polybasic Cluster	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 93 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.20-00006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Park Eugene Won、Kawai Katsuhisa、Egami Youhei、Araki Nobukazu	4. 巻 155
2. 論文標題 A novel DENND1B-localized structure found at the basal side of adherent cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 9~18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01935-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川合克久、江上洋平、荒木伸一
2. 発表標題 Rac1とphosphoinositides に制御される新規エンドサイトーシス経路の解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会・全国学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 朴世薫、川合克久、江上洋平、荒木伸一
2. 発表標題 DENND1Bの細胞内局在パターンとDENND1Bが局在する「未知なるひも状構造」の解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会・全国学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真鍋 悠利、井川 聡、川合 克久、 荒木 伸一
2. 発表標題 新規Rab10陽性輸送経路におけるイノシトールリン脂質代謝の役割
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木伸一、川合克久
2. 発表標題 生体膜ホスホイノシチド代謝によるマクロパイノサイトーシス制御：ライブイメージングとオプトジェネティクスによる解析
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川合克久、江上 洋平、荒木 伸一
2. 発表標題 Rac1とphosphoinositidesに制御される新規エンドサイトーシス経路の解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>医学部学生が細胞内の新規構造体を発見！  <a href="http://www.kms.ac.jp/articles/000/001/744/?fbclid=IwAR2n41qMAH_DeG190nFfbXhjiFqWpQzt3ksPiXofSI4a1hNCAJiEo9DmNXU">http://www.kms.ac.jp/articles/000/001/744/?fbclid=IwAR2n41qMAH_DeG190nFfbXhjiFqWpQzt3ksPiXofSI4a1hNCAJiEo9DmNXU</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	江上 洋平  (Egami Youhei)  (80432780)	香川大学・医学部・講師    (16201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	川合 克久  (Kawai Katsuhisa)  (80534510)	香川大学・医学部・助教    (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Michigan			