

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07248

研究課題名(和文)新規非分解系エンドサイトーシス経路の生理的機能と病態との関連

研究課題名(英文) Physiological functions and pathology of a novel non-degradative endocytic pathway

研究代表者

川合 克久 (Kawai, Katsuhisa)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80534510

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)：マクロピノサイトーシスは細胞による外環境の大型の取り込みである。我々は形態的にマクロピノサイトーシスに似たRab10陽性管状エンドサイトーシス(Rab10陽性TE)を見出している。本研究目的はRab10陽性TEの分子基盤とその生理的意義の解明である。我々はRab10陽性TEが輸送する分子として、免疫チェックポイントに関わるPD-L1を同定した。また、Rab10陽性TEに局在する分子として、小胞体標的化膜タンパク質であるTMCC1を見出した。非常に興味深いことに、TMCC1は管状構造からRab10が消失する時期に最も強く局在した。よって、Rab10陽性TEの後期において小胞体の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rab10陽性管状エンドサイトーシス(Rab10陽性TE)は非分解系の取り込みであり、膜成分のリサイクリングに関わることが予想される。しかしながら、Rab10陽性TEの分子基盤はほとんど不明である。本研究で明らかとなったRab10陽性TEへの小胞体標的化分子であるTMCC1の関与は、リサイクリング機構における小胞体の新たな役割の存在を示唆している。近年、オルガネラコンタクトサイトにおける膜輸送の制御が非常に注目を集めている。本研究成果であるRab10陽性TEと小胞体の関連は、この点において大変興味深い。

研究成果の概要(英文)：Macropinocytosis is the large-scale uptake of the external environment by cells and is used as a route of nutrient uptake or virus infection. We found that Rab10-positive tubular endocytosis (Rab10-positive TE) that morphologically resembles macropinocytosis. We identified PD-L1 involved in immune checkpoints as a molecule transported by Rab10-positive TE. We also found TMCC1, a membrane protein that targets the endoplasmic reticulum, as a molecule localized in Rab10-positive TE. Interestingly, TMCC1 was found to be most strongly localized when Rab10 disappeared from tubular structures. These findings suggest the involvement of the endoplasmic reticulum in the late stages of Rab10-positive TE.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンドサイトーシス Rab GTPase マクロピノサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

大型の液相性取り込みであるマクロピノサイトーシスは、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞において細胞外液中の高分子を取り込み抗原提示経路へと提供することで免疫応答に寄与する。一方、サルモネラなどの病原菌やエボラウイルスなどは宿主細胞のマクロピ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ピ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。マクロピ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、その分子基盤の解明は重要性が高い。

我々は、最終的に分解系に至る従来型のマクロピノサイトーシスとは異なる非分解系の新規輸送経路を見出した。図1で示したように、この新規輸送経路は従来型のマクロピノサイトーシスと同様に、ラッフル形成、カップ形成で始まる。しかしながら、カップ形成の後に管状構造を出芽すると共にカップ構造は退縮し最終的に消滅する。さらに、従来型のマクロピノサイトーシスでは Rab5 陽性のマクロピノソームを形成するのに対し、新規輸送経路では、カップおよび管状構造は Rab5 陽性ではなく Rab10 陽性であることを見出した。

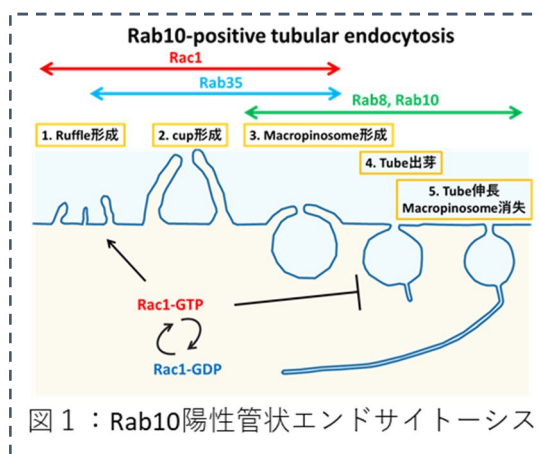


図1: Rab10陽性管状エンドサイトーシス

低分子量 GTPase である Rab は小胞輸送や小胞融合で重要な役割をする分子スイッチであり、従来型のマクロピノサイトーシスにおいて複数の Rab タンパク質が制御していることが報告されている。新規輸送経路において Rab10 が非常に強く局在することから、Rab10 は分子スイッチとして重要な機能を果たすことが予想される。そこで、我々は、この新規輸送経路を Rab10 陽性管状エンドサイトーシス(Rab10 陽性 TE)と呼び、Rab10 の機能解析を中心に形態的に特徴的な Rab10 陽性 TE の分子基盤および生理的意義の解明を目指した。

2. 研究の目的

ユニークな形態的特徴を示す Rab10 陽性 TE がどのような分子基盤を有しているのかを明らかにし、管状構造の出芽、カップの消滅の制御機構を解明する。さらに、Rab10 陽性 TE は、何をどこに輸送するのか全く分かっていない。そこで、Rab10 陽性 TE により運ばれるものを同定し、その輸送経路を明らかにすることにより Rab10 陽性 TE の生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

Rab10 陽性管状 TE は、マクロファージ様培養細胞である RAW264 あるいは J774.1 細胞で恒常的に観察される。しかしながら、その頻度は非常に低くそのままでは解析に適さない。そこで、我々はこれまでに確立した2つの方法を利用した。

(1) 光活性化 Rac1 による Rab10 陽性 TE の誘導

光活性化 Rac1(PA-Rac1)は青色光非照射時では、不活性化状態であるが、青色光照射により、活性化状態へと光依存的に変換できる光遺伝学的ツールである。RAW264 細胞にこの PA-Rac1 を導入することにより、顕微鏡下で局所的に Rac1 の活性を制御することができ、マクロピノソーム様の構造が多数形成される(Fujii et al., Sci Rep. 2013)。PA-Rac1 により誘導された多数のマクロピノソーム様の構造の大部分は、Rab10 陽性 TE であり、通常の

マクロピノサイトーシスは一部のみである(Kawai et al., Front Immunol. 2021)。

(2) PI3K 阻害剤存在下における PMA 刺激における Rab10 陽性 TE の誘導
ホルボールエステルである PMA 刺激は、RAW264 細胞においてマクロピノサイトーシスを誘導することが知られている。PMA 刺激の 10-20 分後、Rab10 陽性 TE の形成が多くみられる。さらに PI3K 阻害剤である wortmannin を前処理しておくことで従来のマクロピノソームの形成は阻害され、大部分が Rab10 陽性 TE となる。

以上の2つの方法を用い、蛍光顕微鏡 (共焦点レーザー顕微鏡 LSM700, Carl Zeiss) 下で Rab10 陽性 TE の生きたままの観察を行った。Rab10 陽性 TE に局在する分子を同定し、さらに局在する時期を明確にするため、2色(GFP, mCherry)あるいは3色(CFP, YFP, mCherry)の蛍光像を比較する条件を確立した。RAW264 細胞へのプラスミドの導入は、neon transfection system を使用し、一過的に発現させ、24 時間以内に観察した。

4. 研究成果

(1) Rab10 のカップおよび管状構造への局在機構

一般的に、Rab タンパク質の局在は、3つの方法が考えられている。1. 脂質修飾付近のアミノ酸配列の特性、主に電荷を介して特定の膜に標的化する。2. 活性化因子により特定の領域で活性化されることにより局所的に集積する。3. エフェクター分子との結合を介して特定の領域に局在する。

Rab10 の局在が上記のどのタイプで決定されているかを解析するために、Rab10 と他の Rab タンパク質を部分的に入れ替えたキメラ変異体を作製した。これらのキメラ変異体の局在を解析したところ、Rab10 の N 側領域(約 170 aa)を含むキメラ変異体は、Rab10 陽性のカップおよび管状構造に局在した(図 2)。

しかしながら、Rab10 の C 側領域(約 30 aa)を含む変異体はカップおよび管状構造には局在しなかった(図 2)。このことから、Rab10 のカップおよび管状構造への局在は Rab10 のエフェクター結合領域である N 側領域が担っていることが明らかとなった。しかしながら、Rab10 の小胞体およびゴルジ体局在は Rab10 の C 側領域が担っていることが明らかとなった。このことから、Rab10 は N 側および C 側の2か所で別々の膜構造に標的化しうることが示唆された(図 3)。この結果は、近年、注目されているオルガネラコンタクトによる膜輸送の制御において非常に興味深いものである。

(2) Rab10 の活性制御因子の関与

Rab10 の活性は他の Rab タンパク質と同様に、Guanine nucleotide exchange factor (GEF) により活性化、GTPase 活性化タンパク質により不活性化される。Rab10 の GEF あるいは GAP として複数の分子が報告されており、これらの分子の局在について調べた。本研究では、Rab10 陽性 TE に局在する GEF および GAP は見つからなかった。今後の解析が必要である。

(3) Rab10 のエフェクター分子の関与

Rab10 には複数のエフェクター分子が報告されている。これまでの解析により、Rab10 のエフェクター分子の1つである EHBP1 が Rab10 陽性 TE に局在することを見出している。そこで、EHBP1 の下流の分子である EHD1 の関与について調べた。EHD1 は膜の管状構造の形成あるいは分離を制御する分子として知られ、EHBP1 と結合する分子である。EHD1 と EHBP1 の結合は Rab タンパク質の EHBP1 への結合により調節されていることが報告されている。Rab10、EHBP1、EHD1 の Rab10 陽性 TE での局在について調べた。

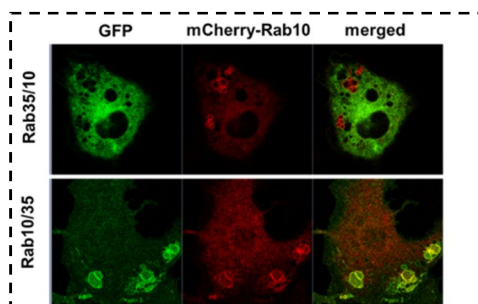


図 2 : Rab10 と Rab35 の入れ替えキメラ変異体の局在
Rab10 の N 側領域および C 側領域を Rab35 と入れ替えたキメラ変異体を作製した(上図)。キメラ変異体を RAW264 細胞に発現させ、顕微鏡観察を行った。Rab10/35 は Rab10 陽性カップ構造に局在したが、Rab35/10 は局在しなかった(下図)。

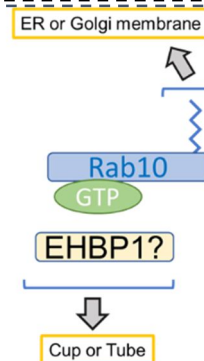


図 3 : Rab10 の 2 か所での膜標的化
Rab10 は N 側領域でエフェクター分子との結合を介してカップおよび管状構造に局在し、C 末の脂質修飾領域を介して小胞体およびゴルジ体に標的化する。

その結果、EHD1 は Rab10 陽性 TE に局在することが明らかとなった。しかしながら、EHD1 は Rab10 や EHBP1 とは異なり、カップ構造には局在せず、管状構造にのみ局在した。よって、EHBP1 と EHD1 の結合は管状構造の出芽以降に見られることが分かった。さらなる解析により、Rab10 陽性の管状構造の出芽の分子機構が明らかになることが期待される。

(4) その他の分子の寄与

マクロピノサイトーシスあるいはリサイクリング経路に関わる分子について、Rab10 陽性 TE への関与を調べることで、新たに Rab10 陽性 TE に関与する分子の同定を行った。様々な分子について検討した結果、小胞体に標的化する TMCC1 が Rab10 陽性の管状構造に局在することを見出した。さらに、TMCC1 の局在時期は、Rab10 が管状構造から消えた後に最も強くなることが明らかとなった(図 4)。TMCC1 は、エンドソームからの管状構造の出芽に寄与することが報告されており(Hoyer et al., Cell. 2018)、TMCC1 の Rab10 陽性 TE への局在は、Rab10 陽性 TE の管状構造消滅の制御機構を考える上で非常に興味深い結果である。

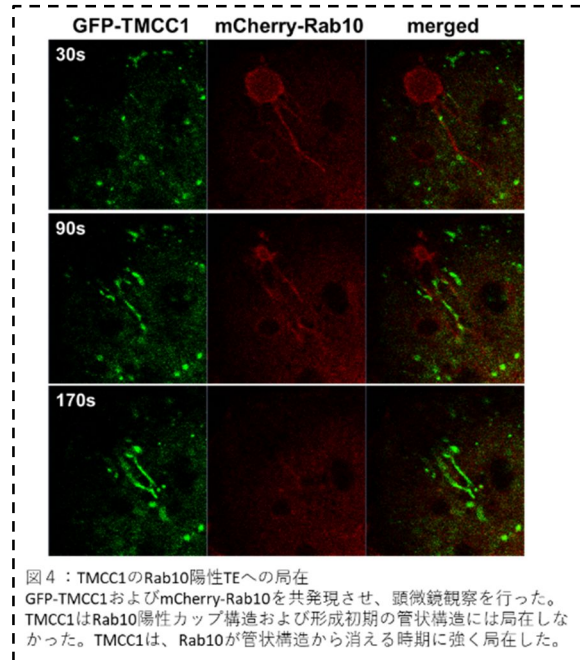


図 4 : TMCC1 の Rab10 陽性 TE への局在
GFP-TMCC1 および mCherry-Rab10 を共発現させ、顕微鏡観察を行った。
TMCC1 は Rab10 陽性カップ構造および形成初期の管状構造には局在しなかった。TMCC1 は、Rab10 が管状構造から消える時期に強く局在した。

(5) Rab10 陽性 TE により輸送される分子の探索

受容体および接着分子などの膜タンパク質が Rab10 陽性 TE により輸送されているかどうかを明らかにするため、GFP を融合した各種受容体および接着分子を作製し、顕微鏡観察を行った。その結果、免疫チェックポイントに関与する膜タンパク質である PD-L1 が非常に強く Rab10 陽性カップおよび管状構造に局在した。さらに、インターフェロン 刺激 24 時間後の RAW264 細胞を wormannin 存在下で PMA 刺激し 20 分後固定、内在性 PD-L1 と内在性 Rab10 の局在を抗 PD-L1 抗体および抗 Rab10 抗体で二重染色を行った。その結果、内在性 PD-L1 は Rab10 陽性管状構造に強く局在していることが明らかとなった。よって、免疫チェックポイント分子である PD-L1 は Rab10 陽性 TE により細胞膜から回収されることが明らかとなった。今後、細胞内に回収された PD-L1 の運命を解明することで Rab10 陽性 TE の役割が明確になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 649600
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)
2. 論文標題 Rac1 ON-OFF スwitch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） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Katsuhisa Kawai, Youhei Egami, Arata Nishigaki, Nobukazu Araki	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 Histochem Cytochem.	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 Binte Mustafiz SS, Uyama T, Morito K, Takahashi N, Kawai K, Hussain Z, Tsuboi K, Araki N, Yamamoto K, Tanaka T, Ueda N	4. 巻 1864
2. 論文標題 Intracellular Ca ²⁺ -dependent formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines by human cytosolic phospholipase A2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids	6. 最初と最後の頁 158515-158528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbalip.2019.158515.	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0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 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川合 克久、丹羽 悠、荒木 伸一
2. 発表標題 Rab10陽性管状エンドサイトーシスにおける小胞体の関与
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川合 克久、丹羽 悠、荒木 伸一
2. 発表標題 Rab10はC末端、N末端の2か所の局在化領域により別々の膜構造に標的化する
3. 学会等名 第76回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	荒木 伸一	香川大学・医学部・教授	
	(Araki Nobukazu)		
	(10202748)	(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	江上 洋平 (Egami Youhei) (80432780)	香川大学・医学部・講師 (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