

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 15 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860142

研究課題名(和文)細胞性免疫機構の維持・破綻に関する低分子量G蛋白質Rit1の機能解析

研究課題名(英文)Regulation of cellular immune system: an involvement of Rit1 GTPase in phagosome formation

研究代表者

江上 洋平 (Egami, Youhei)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80432780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ等の貪食細胞で活発に認められるファゴサイトーシスは、感染性病原体などの外来性異物を認識し、細胞内へ取り込み、分解・処理した後、獲得免疫を誘導する重要なエンドサイトーシス経路である。本研究課題では、ライブセルイメージング局在解析、遺伝子ノックアウト、蛋白質の過剰発現解析などにより、低分子量GTPaseの一つであるRit1が、IgGによりオプソニン化された異物を取り込むFcγRレセプター介在性ファゴサイトーシスの重要な制御因子であることを突き止めた。Rit1が貪食過程に関与するという知見は、これまで全く知られていない新規パラダイムである。

研究成果の概要(英文)：Phagocytosis is a fundamental pathway that enables cells to eliminate pathogens, and endogenous cell debris, and contribute to immunoprotection and the maintenance of tissue homeostasis. In this study, we found that Rit1 GTPase is recruited to the membrane of phagocytic cups during FcγR-mediated phagocytosis in macrophages. Live-cell imaging analysis revealed that Rit1 is transiently colocalized with PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 during early stage of phagosome formation. CRISPR/Cas9-mediated Rit1 knockout or the expression of GDP-locked mutant Rit1-S35N suppressed phagocytosis of IgG-opsonized erythrocytes. These data suggest that Rit1 is a crucial regulator of FcγR-mediated phagocytosis in macrophages.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ファゴサイトーシス Rit1 蛍光ライブセルイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

マクロファージ等の貪食細胞で活発に認められるファゴサイトーシス、マクロパイノサイトーシスは、感染性病原体などの外来性異物を認識し、細胞内へ取り込み、分解・処理した後、獲得免疫を誘導する重要なエンドサイトーシス経路である。この経路は体液性免疫の成立に必須の役割を果たす一方で、ある種の病原体の感染経路ともなりうる負の側面をもつ。すなわち、サルモネラ菌やHIVなどは、このエンドサイトーシス経路を利用して細胞内に侵入後、分解プロセスを巧妙に逃れ、免疫細胞内で増殖する。この生体にとって益、あるいは害となるかの運命を決定づける鍵が、小胞輸送・細胞骨格制御の分子スイッチである低分子量GTPaseだと推定される。以上のような背景のもと、申請者らはマクロファージにおける非自己抗原の取り込み・分解過程を制御する新規低分子量G蛋白質を同定する目的で、Ras、ARF/ARL、Rho familyの個々のメンバーについてライブセルイメージング解析による網羅的スクリーニングを行ってきた。本研究課題申請時点において、研究代表者らのライブセルイメージングによる局在解析から、低分子量G蛋白質Rit1が非自己抗原の取り込みプロセスであるファゴゾームの形成時に劇的に形質膜へとリクルートされることが明らかとなっていた。また、Rit1のドミナントネガティブ体(Rit1-S35N)をRAW264マクロファージに過剰発現させ、Rit1の機能阻害を行ったところ、Zymosan貪食の有意な低下が認められていた。そこで、本研究課題ではファゴゾーム形成に關与するRit1に焦点をあてて研究を行うこととした。

### 2. 研究の目的

ファゴゾーム形成は、アクチン細胞骨格の巧みな再構成による劇的な形態変化(ファゴサイティックカップの形成と閉鎖)をもって行われる。Rit1は、この過程を制御する重要なアダプター分子であると考えられるが、ファゴサイティックカップの閉鎖時におけるRit1の詳細な細胞内局在や活性化状態、さらには細胞骨格制御を行う直下のエフェクターは不明である。そこで本研究課題では、ファゴゾーム形成分子Rit1について、顕微形態学・生化学・分子生物学的切り口による機能の場の特定とRit1のエフェクター因子の同定、作用機序の解明を通して、当因子の細胞骨格調節アダプター分子としての新たな役割の提示と細胞性免疫機構の維持・破綻のキーファクターとしての学術的認知を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Fcガンマーレセプター介在性ファゴサイトーシス経路におけるRit1の細胞内局在・過剰発現解析

Rit1 GTPaseはZymosanの貪食過程におい

てファゴサイティックカップに集積する。また、Rit1のGDP結合型を過剰発現するとZymosanの取り込みが抑制されることがわかっている。そこで、当因子のファゴサイトーシス過程における普遍的重要性を確認するために、IgGによりオプソニン化された異物を取り込むFcガンマーレセプター介在性ファゴサイトーシス経路におけるRit1の細胞内局在とRit1蛋白質の過剰発現による貪食への影響について検討を行った。

(2) 多色蛍光ライブセル観察によるRit1と各種貪食マーカーの時空間的な相関関係の明確化

ファゴゾーム形成時におけるRit1の詳細な細胞内局在は不明である。そこで、ファゴサイティックカップの形成・閉鎖に重要なPI(4,5)P<sub>2</sub>、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>を認識する蛍光プローブを用いて多色蛍光ライブセル観察を行い、Rit1とこれらシグナル脂質の時空間的な相関関係を調べた。

(3) リコンビナントGST-Rit1とホスホイノシタイドとの結合

Rit1のC末端領域はこれまでに、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>と結合することが報告されている。そこで、Rit1の全長リコンビナント蛋白質を作製し、様々なホスホイノシタイドが固定化されているニトロセルロース膜(PIP Strips)を用いることにより、ホスホイノシタイドとRit1蛋白質の直接的な結合を検討した。

(4) 活性化型Rit1結合プローブによるRit1活性化状態の追跡

Rit1の活性化型(GTP結合型)はこれまでにRGL3と結合することが報告されている

(Shao H, Andres DA. J Biol Chem. 2000)。

そこで、RGL3のGST融合蛋白質を作製、利用することにより、異物貪食過程におけるRit1の活性化状態を培養細胞のLysateを用いたPull down assayにより追跡した。

(5) Rit1のノックアウト細胞株の樹立と貪食能の定量化

貪食過程における内在性Rit1の重要性を再確認するために、CRISPR/Cas9システムを利用したノックアウト(KO)を行った。このRit1 KO細胞株を用いて、Rit1のドミナントネガティブ体の過剰発現と同様の表現型(異物貪食能の低下)が認められるかどうか確認した。

(6) Rit1のエフェクター分子の探索

Rit1 GTPaseは、ファゴサイティックカップの形成・閉鎖に重要な因子である。しかしながら、貪食過程におけるRit1の下流エフェクターは不明である。そこで、これまでにRit1と結合することが報告されている蛋白質を対象にして、ファゴゾーム形成への関与の有無について検討した。

### 4. 研究成果

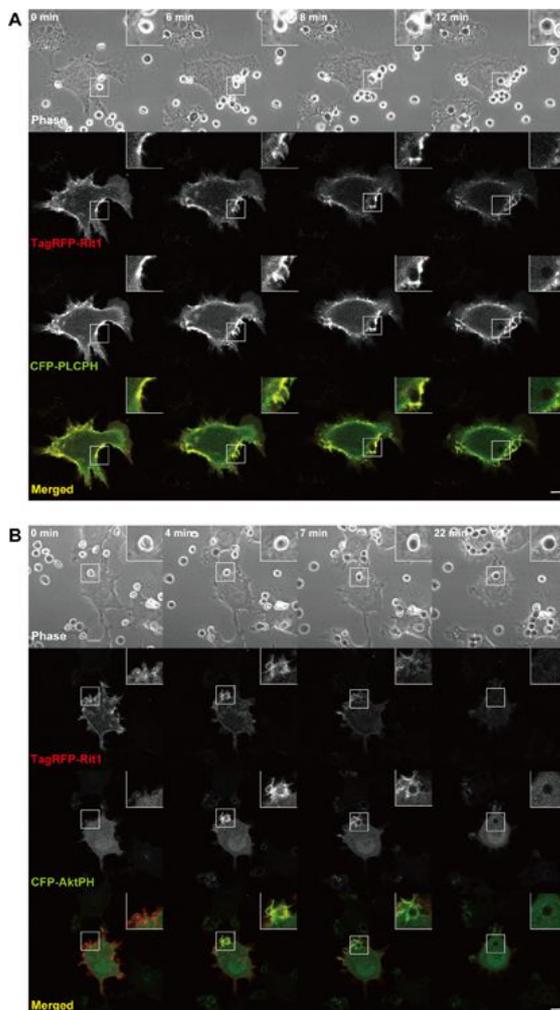
(1) Fcガンマーレセプター介在性ファゴサイトーシス経路におけるRit1の細胞内局

### 在・過剰発現解析

GFP-Rit1 を RAW264 マクロファージに発現させ、オプソニン化赤血球の取り込みを共焦点顕微鏡でライブセル観察したところ、Zymosan の貪食時と同様に Fc ガンマーレセプター介在性ファゴサイトーシス過程でも Rit1 がファゴサイティックカップに集積することが明らかとなった。また、GDP 結合型 Rit1 の過剰発現では、貪食の抑制が認められた。以上の結果は、Rit1 GTPase が Zymosan の貪食に特異的な制御因子ではなく、様々なファゴサイティックプロセスに関与する普遍的な調節因子である可能性を示唆するものである。

(2) 多色蛍光ライブセル観察による Rit1 と各種貪食マーカーの時空間的な相関関係の明確化

RAW264 マクロファージに TagRFP-Rit1 と CFP-PLC-PH (PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブ) あるいは CFP-Akt-PH (PI(3,4,5)P<sub>3</sub> プローブ) を共発現させ、オプソニン化赤血球の貪食過程をライブセル観察したところ、Rit1 はこれらのマーカーと極めてよく共局在することがわかった(下図 A, B)。



(3) リコンビナント GST-Rit1 とホスホイノシタイドとの結合

Rit1のGST融合蛋白質を大腸菌で作製し、ホスホイノシタイドとの直接的な結合につい

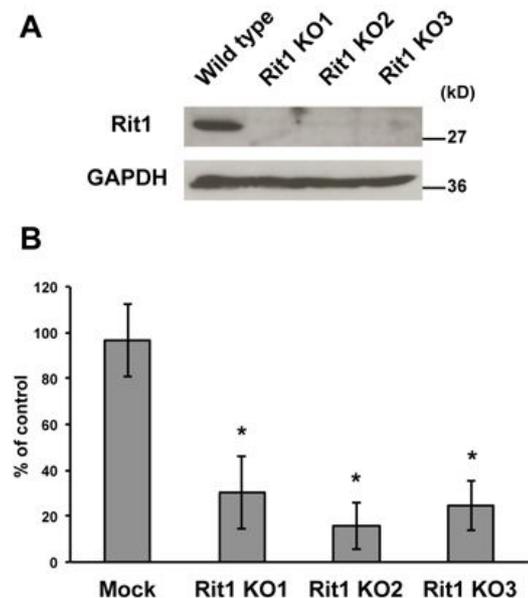
て検討を行ったところ、Rit1はPI(3,4,5)P<sub>3</sub> のみならずPI(4,5)P<sub>2</sub>とも直接的に結合することが判明した。

(4) 活性化型 Rit1 結合プローブによる Rit1 活性化状態の追跡

Fc ガンマーレセプター介在性ファゴサイトーシス過程における Rit1 の活性化状態を調べる目的で、RGL 3 の GST 融合蛋白質を作製した。予備実験として、Rit1 の GTP 及び GDP 結合変異体を発現させた Cell Lysate を用いて GST pull down assay を行ったところ、作製したリコンビナントは Rit1 の GTP 結合型に強い親和性を示した。このプローブを用いて、オプソニン化赤血球の貪食過程における Rit1 蛋白質の活性化状態を追跡したが、活性化状態に大きな変化は認められなかった。

(5) Rit1 のノックアウト細胞株の樹立と貪食能の定量化

マウス Rit1 の ORF 領域の N 末端側に sgRNA ターゲット配列を 2 つデザインし、ピュロマイシン耐性マーカーを持つプラスミド pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459 Addgene より入手) にターゲット配列をそれぞれ挿入した。これらのプラスミドを RAW264 マクロファージに遺伝子導入し、ピュロマイシンの存在下で培養後、限界希釈によりシングルセル由来のコロニーを約 200 クローン選択した。これらのクローンについてウエスタンブロットングによる Rit1 KO 細胞株のスクリーニングを行ったところ、そのうち 3 クローンが Rit1 の蛋白発現を消失していることがわかった(下図 A)。次に、樹立した Rit1 KO 細胞株を用いて、Fc レセプターを介した貪食ターゲットの取り込みを定量化したところ、いずれの細胞株においても貪食の抑制が認められた(下図 B)。



(6) Rit1 のエフェクター分子の探索

Rit1 の結合蛋白質として報告されているアクチン結合蛋白質 AF6/Afadin について

マクロファージにおける発現を調べたところ、骨髄由来マクロファージ、並びに RAW264 細胞において AF6 蛋白の発現が認められた。そこで、内在性 AF6 の貪食への影響を調べるために、CRISPR/Cas9 によるノックアウト細胞の樹立を行った。マウス AF6 の ORF 領域の N 末端側に sgRNA ターゲット配列をデザインし、ピューロマイシン耐性マーカーを持つプラスミド pSpCas9(BB)-2A-Puro にターゲット配列を挿入後、RAW264 マクロファージに遺伝子導入した。ウエスタンブロッティングによるスクリーニングの結果、AF6 の蛋白質発現が消失したシングルセル由来のクローンを複数得ることができた。現在、この細胞を用いて、Fc レセプターを介した貪食ターゲットの取り込みへの影響について検討を行っている。

Rit1 GTPase は近年、肥大型心筋症や骨格の異常を伴うヌーナン症候群の原因遺伝子の一つであると報告された。しかしながら、当因子がマクロファージにおける貪食に直接的に関与することは全く知られていない。本研究により得られた知見は、Rit1 GTPase がファゴサイトーシスのキーファクターであることを支持するものであり、今後、Rit1 の下流エフェクターの早急な同定が必要であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Lu Y, Cao L, Egami Y, Kawai K, Araki N. Cofilin contributes to phagocytosis of IgG-opsonized particles but not non-opsonized particles in RAW264 macrophages. *Microscopy*. 査読有.in press. doi: 10.1093/jmicro/dfv376.

Egami Y. Molecular imaging analysis of Rab GTPases in the regulation of phagocytosis and macropinocytosis. *Anat Sci Int*. 査読有. 91 (2016) 35-42 doi: 10.1007/s12565-015-0313-y.

Egami Y, Fujii M, Kawai K, Ishikawa Y, Fukuda M, Araki N. Activation-Inactivation Cycling of Rab35 and ARF6 Is Required for Phagocytosis of Zymosan in RAW264 Macrophages. *J Immunol Res*. 査読有. 2015 (2015) 429439 doi: 10.1155/2015/429439.

Egami Y, Taguchi T, Maekawa M, Arai H, Araki N. Small GTPases and phosphoinositides in the regulatory mechanisms of macropinosome formation and maturation. *Front Physiol*. 査読有. 5 (2014) 374 doi: 10.3389/fphys.2014.00374.

Kato T, Kawai K, Egami Y, Kakehi Y, Araki N. Rac1-dependent lamellipodial

motility in prostate cancer PC-3 cells revealed by optogenetic control of Rac1 activity. *PLoS One*. 査読有. 9 (2014) e97749 doi: 10.1371/journal.pone.0097749.

Araki N, Ikeda Y, Kato T, Kawai K, Egami Y, Miyake K, Tsurumaki N, Yamaguchi M. Development of an automated fluorescence microscopy system for photomanipulation of genetically encoded photoactivatable proteins (optogenetics) in live cells. *Microscopy*. 査読有. 63 (2014) 255-260 doi: 10.1093/jmicro/dfu003.

Fujii M, Kawai K, Egami Y, Araki N. Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. 査読有. 3 (2013) 2385 doi: 10.1038/srep02385.

[学会発表](計5件)

江上洋平, 川合克久, 荒木伸一: RhoC GTPase は mDia1 によるアクチン重合を介してファゴゾーム形成を調節する. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

江上洋平: 低分子量 GTPase によるマクロピノサイトーシス及びファゴサイトーシスの制御に関する分子形態学的解析. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

江上洋平, 川合克久, 荒木伸一: RhoC GTPase はマクロファージにおけるファゴゾーム形成に関与する. 第 87 回日本**生化学会**大会, 2014 年 10 月 15 日 ~ 18 日, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル (京都府・京都市)

江上洋平, 川合克久, 荒木伸一: Zymosan 貪食過程における Rit1 GTPase のライブセルイメージングと機能解析. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014 年 3 月 27 日 ~ 29 日, 自治医科大学キャンパス (栃木県・下野市)

江上洋平, 川合克久, 荒木伸一: Zymosan  
貪食過程における Rit1 GTPase の機能解  
析. 第 54 回組織細胞化学会学術総会,  
2013 年 9 月 27~28 日, 航空会館 (東京  
都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江上 洋平 (EGAMI YOUHEI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 80432780