

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860136

研究課題名(和文) 光遺伝学的手法を用いたマクロパイノサイトーシスの時空間的解析

研究課題名(英文) spatiotemporal analysis of macropinocytosis using optogenetics

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：光活性化Rac1(PA-Rac1)により顕微鏡下でマクロパイノサイトーシスを誘導する実験系を利用しマクロパイノサイトーシスの形態的特徴および分子基盤の解析を行った。その結果、PA-Rac1誘導性マクロパイノサイトーシスは、典型的なマクロパイノサイトーシスと異なりRab10が一過的に集積することを見出した。さらにRab10陽性のマクロパイノゾームは、チューブ構造を出芽した。Rab10陽性マクロパイノゾームおよびチューブ構造は、細胞外と行き来のある開いた構造であった。以上の結果から、PA-Rac1依存的マクロパイノサイトーシスは、従来型と異なる新規の取り込み経路であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Macropinocytosis is a non-selective uptake of liquid phase. In a previous study, we established an experimental system to induce macropinocytosis in specified region of cells using photo-activatable Rac1 (PA-Rac1) in macrophage culture cells, RAW264. It was revealed that PA-Rac1-induced micropinocytosis is different characteristics from typical micropinocytosis in several points. We found that Rab10 and its effector EHBP1 are transiently accumulated in macropinosomes during the novel micropinocytosis. Rab10 positive macropinosomes budded tubular structures and disappeared at the same time. In addition, it became clear that formation of tubular structures requires down-regulation of Rac1 activities. Furthermore, it was revealed that some of Rab10-positive macropinosomes and tubular structures budding from them are open structures. These results suggest that PA-Rac1-induced micropinocytosis is a novel uptake pathway different from the typical type.

研究分野：細胞生物学

キーワード：macropinocytosis endocytosis Rab

1. 研究開始当初の背景

マクロパイノサイトーシスは、エンドサイトーシスの一種で、比較的大型の非選択的な液相性の取り込み形態を示す。マクロパイノサイトーシスは、細胞膜の隆起である膜ラッフル形成、一定の領域を細胞膜で取り囲むカップ形成、カップを閉じることによって生じるマクロパイノゾーム形成、そして、様々な小胞が融合する成熟過程を経て最終的に内容物の分解に至る(図1)。近年、マクロパイノサイトーシス経路が、ウイルスおよび細菌の侵入経路として、あるいは、がん細胞の栄養の取り込み経路として利用されていることが報告されている。しかしながら、他のエンドサイトーシス経路(クラスリン依存的エンドサイトーシス、カベオラ依存的エンドサイトーシスあるいはファゴサイトーシスなど)と比較してマクロパイノサイトーシスの役割および分子基盤は不明な点が多い。マクロパイノサイトーシスの必須因子としてアクチン細胞骨格の再構成を介し膜ラッフル形成を誘導する Rac1 が知られている。これまでに我々は、光活性化 Rac1 (PA-Rac1) を利用し、顕微鏡下で Rac1 の活性を制御することで任意にマクロパイノサイトーシスを誘導する実験系を構築した。本研究では、この実験系を用いることにより、マクロパイノサイトーシスの分子基盤の解明を目指した。

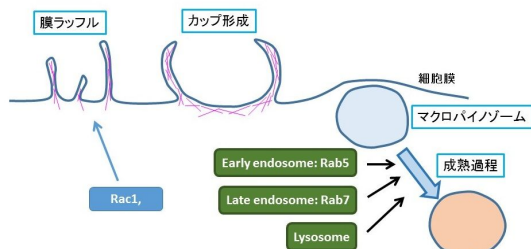


図1. マクロパイノサイトーシスの過程

2. 研究の目的

本研究の目的は、PA-Rac1 誘導性マクロパイノサイトーシスの形態的特徴およびマクロパイノゾームへ局在する分子の解析を行うことで、これまでに明らかになっていないマクロパイノサイトーシスの新たな役割あるいは分子基盤を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と遺伝子導入

細胞: RAW264 マウスマクロファージ(理研細胞バンク)を、10%ウシ退治血清を加えたダルベッコ変法イーグル培地にて 37 °C、5% CO₂ 環境下で培養した。RAW264 細胞への遺伝子導入には、neon nucleofection system (Life technologies 社)により核内へ plasmid DNA を導入した。細胞は、25 mm 径円形カバー

リップ上に培養し、遺伝子導入後 12-24 時間後、カバーリップを Attofluor cell chamber (Life technologies 社)に組み入れ、Ringer's buffer (155 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 2 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, 0.5 mg/mL bovine serum albumin and 10 mM HEPES at pH7.2)を 0.5-1.0 mL 入れライブセルイメージに用いた。

(2) 蛍光顕微鏡観察

蛍光タンパク質を融合した遺伝子産物を共焦点レーザー顕微鏡(LSM700, Carl Zeiss 社)で観察した。特に、37 °C で細胞を生きのままの状態を経時的に観察するタイムラプス観察を重点的に用いた。

(3) 光活性化 Rac1 (PA-Rac1)

顕微鏡下で Rac1 の活性を制御するために PA-Rac1 を用いた。PA-Rac1 は、活性型の Rac1 に植物由来の LOV ドメインを融合したもので、通常状態では、LOV ドメインが Rac1 を立体的に阻害している(図2)。青色光(本実験では 445 nm および 488 nm)を照射すると LOV ドメインの立体阻害がはずれ Rac1 が活性化状態となる。局所的に活性化する場合は、共焦点レーザー顕微鏡(LSM700)の bleach system を用いた。細胞全体に活性化する場合は、画像取得のための励起光を用いた。

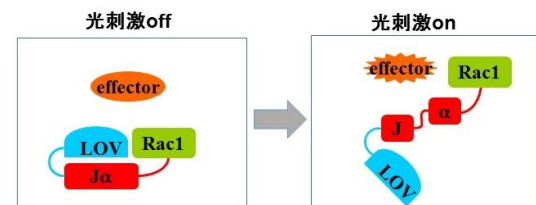


図2. PA-Rac1 の模式図

Yi I. Wu et al. Nature 2009

4. 研究成果

(1) PA-Rac1 誘導性マクロパイノゾームは短時間で消失する。

PA-Rac1 を細胞全体(RAW264 細胞)で活性化させると、細胞全体からランダムにマクロパイノサイトーシスが誘導される(Fujii M, et al. Sci Rep. 2013)。しかしながら、通常のマクロパイノサイトーシスでは、マクロパイノゾームが細胞内に長時間とどまるのに対し、PA-Rac1 で誘導したマクロパイノゾームの大部分は、短時間(5 min 以内)に消失した。このマクロパイノゾームは、徐々に小さくなって消えるのではなく急速に消失した。さらに従来のマクロパイノゾームに局在する Rab タンパク質である Rab5 および Rab7 などが局在しないことから、PA-Rac1 誘導性のマクロパイノサイトーシスは、従来型とは異なることが示唆された。

(2) PA-Rac1 誘導性マクロパイノゾームには Rab8a、Rab10、Rab35 が集積する。

PA-Rac1 誘導性のマクロパイノサイトーシスに関与するタンパク質を同定するため、一群の Rab タンパク質について解析を行った。Rab タンパク質として、Rab1b、Rab8a、Rab10、Rab12、Rab13、Rab15、Rab35 をそれぞれ GFP 融合発現プラスミドとして用意し、RAW264 細胞に PA-Rac1 および mCherry-LactC2 (ホスファチジルセリンプロブ: マクロパイノゾームを示す) と同時に一過的に発現させ、PA-Rac1 で誘導したマクロパイノゾームに集積するかどうかを検討した。その結果、図3に示したように、Rab8a、Rab10、Rab35 がマクロパイノゾームに強く集積することが明らかとなった。さらに、それぞれの Rab タンパク質が局在する時期について調べたところ、まず、Rab35 が集積し、その後、Rab8a および Rab10 が集積することが明らかとなった。

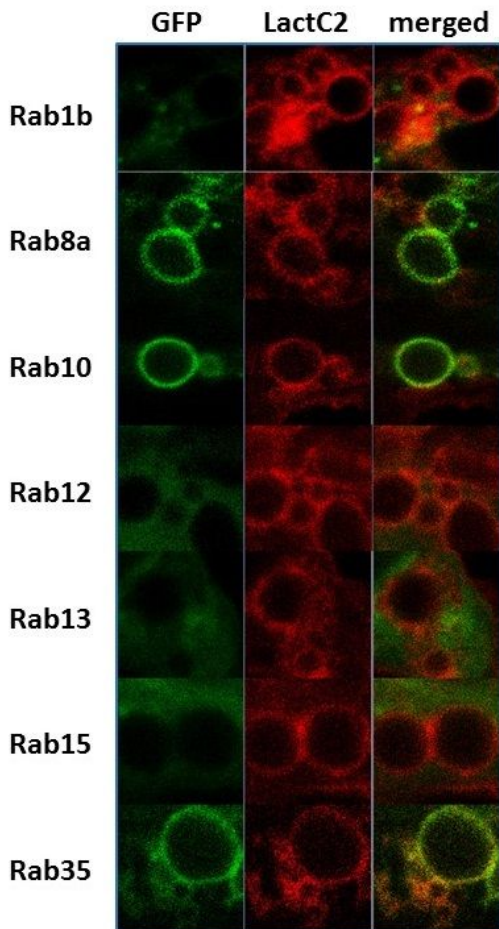


図3 . PA-Rac1 誘導性マクロパイノゾームへの Rab タンパク質の局在
Rab8a、Rab10、Rab35 がマクロパイノゾームに局在する。LactC2(ホスファチジルセリンプロブ)は、マクロパイノゾームを示すために使用している。

(3) Rab10 陽性のマクロパイノゾームからチューブ構造が出芽する。

PA-Rac1 誘導性マクロパイノサイトーシスを GFP-Rab10 を発現させ観察したところ、Rab10 陽性のマクロパイノゾームから、Rab10 陽性のチューブ構造が、細胞の中心に向かって出芽することを見出した。図4に示したように、このチューブ構造は、微小管に沿って移動していることも明らかとなった。さらに、Rab10 陽性のマクロパイノゾームは、チューブ構造を出芽すると同時に消失した。

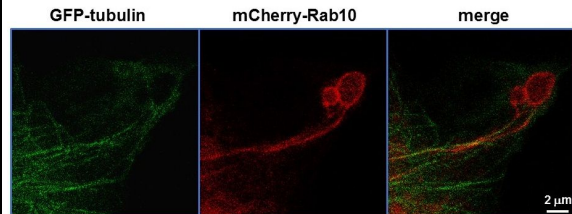


図4 . 微小管構成タンパク質であるチューブリン(GFP)と Rab10(mCherry)

(4) チューブ構造の出芽は Rac1 の活性により制御されている。

Rac1 の活性化を細胞の一部に行うと、Rac1 を活性化した領域のみにマクロパイノゾームが蓄積することができ、さらに Rac1 を不活性化すると蓄積したマクロパイノゾームの大部分が消失する。このときの Rab10 の局在を調べたところ、PA-Rac1 を on にしている状態では、Rab10 陽性のマクロパイノゾームは形成されるが、チューブ構造は形成されおらず、PA-Rac1 を off にすると直ちに、Rab10 陽性のチューブ構造が多数出芽することが明らかとなった(図5)。このことから、Rac1 の活性化しているままでは、チューブの出芽が抑制されており、チューブの出芽には、Rac1 が不活性化される必要があると考えられた。

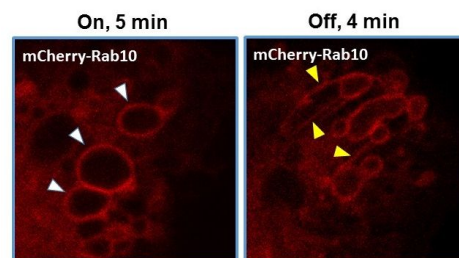


図5 . PA-Rac1 を on で誘導されたマクロパイノゾーム (白色矢尻端) が見られるがチューブ構造は見られない (左図) PA-Rac1 を off にすると多数のチューブ (白色矢尻端) が形成される (右図)。

(5) Rab10 陽性のマクロパイノゾームおよびチューブ構造は開いた状態である。

PA-Rac1 により誘導したマクロパイノゾームはカップ形成から僅かな時間で消失することから、このマクロパイノゾームが完全に閉

じていない可能性が考えられた。そこで、PA-Rac1 によりマクロパイノゾームを誘導し、直ちに細胞外液に FM4-64 の添加を行った。FM4-64 は、細胞膜非透過性で細胞膜に結合すると強い蛍光を発する。よって、マクロパイノゾームが閉じていれば、FM4-64 はマクロパイノゾーム内には取り込まれず染色されないが、マクロパイノゾームが、細胞外との行き来のある開いた状態であれば、マクロパイノゾーム内に FM4-64 が入り染色される。実際に、Rab10 陽性のマクロパイノゾームで観察したところ、FM4-64 陽性となった。さらに Rab10 陽性のマクロパイノゾームから出芽するチューブ構造も FM4-64 陽性となったことから、マクロパイノゾームおよびそこから伸びるチューブ構造までもが、開いた状態であることが明らかとなった。

以上のことから、RAW264 細胞における PA-Rac1 誘導性のマクロパイノサイトーシスは典型的なマクロパイノサイトーシス(Rab5 および Rab7 陽性)とは異なり、全く新しいマクロパイノサイトーシス経路と考えられた(図6)。その特徴は、Rab8a および Rab10 陽性を示し、カップが閉じずに開いた構造維持していることである。さらに、マクロパイノゾームから細胞中心に向かってチューブ構造を出芽すると同時にマクロパイノゾーム自身は消失する特徴を示した。また、このチューブの出芽は Rac1 の活性状態により制御されていることが明らかとなった。この新規の取り込み形態が生理的にどのような役割を果たしているのか非常に興味深いところである。

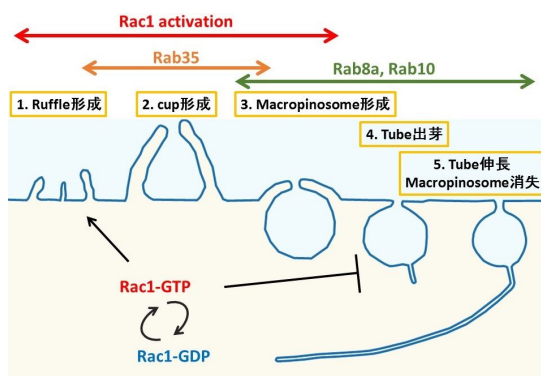


図6 . PA-Rac1 誘導性マクロパイノサイトーシスの特徴

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 4 件)

Hayashida Y, Ikeda Y, Sawada K, Kawai K, Kato T, Kakehi Y, Araki N, Invention of a novel photodynamic therapy for tumors using a photosensitizing PI3K inhibitor, Int J Cancer. 2016 Aug 1;139(3):700-11.

査読有

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 (Oxf). 2016 Jun; vol. 65(3):pp. 233-42. 査読有

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. 2015;2015:429439.

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. 2014 May 21;9(5):e97749. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

川合 克久, 江上 洋平, 荒木 伸一, 新規マクロパイノサイトーシス経路の形態と分子基盤, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年 3 月 28 日~30 日 長崎大学 (長崎県長崎市)

Nishigaki A, Sawada K, Yagi K, Kawai K, Araki N. Sequential recruitments of Rab35, Rab8 and Rab10 during macropinosome formation. 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 27 年 3 月 21 日~平成 27 年 3 月 23 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Kawai K, Nishigaki A, Egami Y, Araki N. Rab10-positive macropinosome-like structures provide a novel endocytic pathway. 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 27 年 3 月 21 日~平成 27 年 3 月 23 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Kato T, Kawai K, Egami Y, Araki N, Kakehi Y, Optogenetic control of Rac1-dependent lamellipodial motility in prostate cancer PC-3 cells. 第 66 回西日本泌尿器学会総会 2014 年 11 月 6 日~2014 年 11 月 8 日 倉敷市芸文館 (岡山県倉敷市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

香川大学医学部組織細胞生物学：URL：
<http://www.kms.ac.jp/%7Eanatomy2/index.html>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

荒木 伸一 (Araki Nobukazu)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10202748

江上 洋平 (Egami Youhei)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：80432780

(3)連携研究者

三宅 克也 (Miyake Katsuya)
国際医療福祉大学・成田保険医療学部・教授
研究者番号：30219745

(4)研究協力者

沢田 光一 (Sawada Kouichi)
香川大学 医学部 学生

西垣 新 (Nishigaki Arata)
香川大学 医学部 学生