

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590190
 研究課題名（和文）
 ファゴゾーム・マクロパイノゾームの形成と膜輸送
 研究課題名（英文）
 Phagosome/macropinosome formation and membrane traffic
 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

研究成果の概要： ファゴサイトーシス、マクロパイノサイトーシスは、細胞が粒子状外来異物や液体を細胞外から細胞内ファゴゾーム・マクロパイノゾームへと取り込み、処理する現象であり、生体防御機構の最前線で重要な役割を果たす。本研究は、ファゴゾーム・マクロパイノゾーム形成および膜輸送に関わる制御分子を探索し、その分子の時間空間的関与をライブセルイメージングにより明らかにする目的でおこなわれた。この研究により、ファゴゾーム形成、マクロパイノゾームの成熟過程に関わる分子として、Rab35, Rab21 などが見出され、重要な機能的意義を示唆する結果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：組織・細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：ファゴサイトーシス、マクロパイノサイトーシス、膜輸送、シグナル伝達、分子機構、イメージング

1. 研究開始当初の背景

ファゴサイトーシスは、マクロファージ等の活発な貪食細胞によくみられる粒子状外来異物の取り込み現象であり、生体防御

の最前線において重要な免疫機構の役割を担っている。IgGが結合した細菌などを取り込むFcレセプター介在性ファゴサイトーシスでは、粒子状異物の表面に結合したIgGがFcレセプターに結合することからシグナ

ルが生じ、F-actinの重合・構築変化が起きて粒子表面に沿って偽足がカップ状に伸展し、ファゴゾームを形成する。

マクロパイノサイトーシスは径0.2 μm 以上の大型のパイノソームによる非選択的な液相の取り込みであり、マクロファージ、樹状細胞では、抗原提示経路として重要な役割を持つ。マクロパイノゾーム形成はF-アクチン依存性で細胞表面波状（ラッフル）膜の移動による円状ラッフルの形成に始まり、円状ラッフルの上部が閉鎖されると細胞内に引き込まれてマクロパイノゾームとなり、次いでその膜からF-アクチンがはなれてライソゾームとの融合が起こる。これらの過程はファゴサイトーシスとよく似ており、ファゴサイトーシスおよびマクロパイノサイトーシスの機械的分子機構とシグナル制御系は、ある程度の類似性と特異性の両者を有していると考えられているが、その詳細は未知な点が多い。

ファゴサイトーシスは、細菌などの異物を貪食するだけでなく、アポトーシス小体の処理にも与り、そのファゴゾーム形成・成熟の異常が、自己免疫疾患の原因となる可能性が指摘されており、ファゴサイトーシス過程の分子メカニズム、制御機構の解明は非常に重要である。また近年、マクロパイノサイトーシスは、ある種の病原性細菌、ウイルス、狂牛病プリオンなどの感染経路となることが判明し、マクロパイノゾーム形成・成熟の分子メカニズム、制御機構の解明は、これらの感染症に対する予防法、創薬ターゲットの探索にもつながることが期待される。

2. 研究の目的

ファゴサイトーシスおよびマクロパイノサイトーシスは、マクロファージのような

活発な貪食細胞で観察される外来異物取り込み現象で、自然免疫・獲得免疫において重要な役割を果たしている。細胞内への取り込みすなわちファゴゾーム、マクロパイノゾーム形成には、複雑なアクチン細胞骨格の再編と膜輸送が関与しており、rab蛋白やその他のシグナル分子により巧妙に制御されているようである。本研究の目的は、ファゴゾーム、マクロパイノゾーム形成に必要な細胞内膜系の膜輸送を同定すると共に、その時間空間的制御に関わるシグナル、制御因子を明らかにすることである。さらに、形成されたファゴゾーム、マクロパイノゾームの成熟からライソゾームへの消化分解経路あるいは抗原提示経路への移行メカニズムに関わる分子の探索を行い、その機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ファゴゾーム形成、成熟にかかわるrabタンパク質と細胞内膜系要素の探索と機能分析

ファゴサイトーシスのモデルとして、IgGコートしたカバースリップに接着、伸展中のマクロファージを全反射顕微鏡でLive観察し、IgGガラス接着面の細胞膜への細胞内膜の輸送、シグナル分子の挙動を高距離分解能、高時間分解能解析する。対照として、IgGコートをしていないカバーガラス上にマクロファージを接着させ、単なる接着とIgGを介したfrustrated phagocytosisとの比較を行う。通常の粒子状異物の取り込み過程のLive cell 蛍光顕微鏡観察とも比較し、ファゴゾーム形成時の膜輸送とそのシグナル制御を解析した。具体的な方法は以下のとおりである。
① Rab5, Rab11, Rab34, Rab21, Rab35などのメンブラントラフィック制御に関わる

分子の GFP 変異体融合蛋白質、phosphoinositides に対する特異的なプローブ、細胞内膜マーカー蛋白の GFP-融合蛋白質などを電気穿孔遺伝子導入装置により発現させ、細胞内膜の細胞膜への輸送・融合への関与、相互関係を GFP/RFP または YFP/CFP 共発現系で顕微鏡観察した。

②さらに、これら Rab タンパクの mutant (constitutive active GTP bound form および dominant negative GDP bound form) と wild type の発現細胞で偽足の伸展程度が異なるかどうかをガラス面に接着した面積を形態計測することにより、定量した。

③Rab mutant を発現させたマクロファージで IgG オプソニン化ヒツジ赤血球をファゴサイトーシスさせ、通常の Fc レセプター介在性ファゴサイトーシスの MetaMorph イメージングシステムによるタイムラプスイメージングで動画解析し、機能分析を行った。

(2) マクロパイノゾーム形成と成熟経路に関わる Rab タンパク質の同定と機能解析

①RAW264 マクロファージ、上皮系細胞 A431 細胞においてファゴサイトーシスの場合と同様に上述の Rab タンパクを発現させ、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) または上皮性成長因子 (EGF) を添加することによりマクロパイノサイトーシスを亢進、誘起させ、Live cell imaging で Rab タンパク挙動を蛍光顕微鏡観察した。マクロパイノゾームにリクルートすることが確認された Rab タンパクについて、そのリクルートの時期、局在場所、他のマーカータンパクとの共存状態を観察し、時間空間的局在変化とマクロパイノサイトーシスに伴う形態的変化の関連を解析した。

②マクロパイノサイトーシスに関与することが判明した Rab タンパクについて、GDP-bound mutant (inactive form)

GTP-bound mutant (active form) を発現させ、マクロパイノゾームへのリクルートへの影響、マクロパイノゾーム形成への影響成熟過程への影響の有無を調べることでより、その Rab タンパクの機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 全反射顕微鏡、live cell microscopy によるファゴゾーム形成に関わる膜輸送とシグナル制御の解析

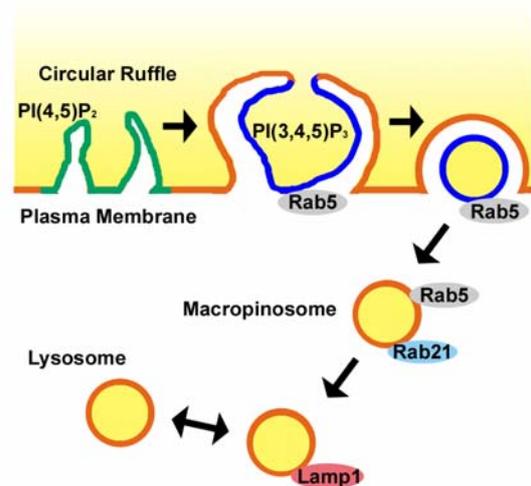
①IgG コートしたカバースリップ上に生きたマクロファージを接着伸展させる“frustrated phagocytosis”をファゴゾーム形成のモデルとして全反射顕微鏡法で観察し、膜輸送のタイミングと部位を分子レベルで高分解能観察するというユニークな方法での解析を試みた。Rab34、Rab11 などの small GTPase や細胞内膜マーカー蛋白の GFP-融合タンパク質を発現させた RAW マクロファージを IgG-coat カバースリップ上で frustrated phagocytosis を起こさせたところ、骨髄由来のマクロファージのようには広く伸展せず、IgG コートをしていないものとあまり差が認められなかった。frustrated phagocytosis モデルでファゴゾーム形成機構を解析するには、骨髄マクロファージにおいて GFP 融合タンパク遺伝子導入を行うか、免疫組織化学染色で観察する必要があることが分かった。最近、骨髄マクロファージへの遺伝子導入に成功し、引き続き frustrated phagocytosis の解析を進める予定である。我々の観察の結果は、マクロファージの由来、細胞種によってファゴゾーム形成に寄与する膜輸送、膜供給が異なっていることを示唆している。今後、由来の異なるマクロファージにおいてファゴゾーム形成のメカニズムの差異についても解析を加えたい。

②通常のLive cell imagingによる解析では、Rab35, Rab34などの分子がファゴサイトーシスに関わることを形態学的に証明された。Rab34は、マクロパイノサイトーシスへの関与を示唆する報告があるが、ファゴサイトーシスへの関与を形態学的に直接証明したのは、我々の研究が初めてである。Rab35についても、プロテオーム解析でファゴゾームに局在することが予測されていたが、その機能やいかなる過程で関与するのかは全く知られていなかった。我々のライブセルによる時間空間的解析からRab35は、ファゴゾーム形成時にリクルートされ、Rab35のGDP-bound mutantの発現で、ファゴゾームの形成は抑制されることから、ファゴゾーム形成に関わることが示唆された。Rab35, Rab34のファゴサイトーシス過程における役割は現在さらに詳細な解析を進めている。

(2) マクロパイノゾーム形成と成熟に関わる分子の探索と機能解析

細胞外液を液相で取り込むマクロパイノサイトーシスは、自然免疫での抗原提示経路として働くだけでなく、HIVウイルスやある種の病原菌感染経路となるため、その制御機構の解明は、その治療法の開発につながる重要な課題である。我々は、マクロパイノサイトーシスの形成と成熟過程での膜輸送を制御すると予測されるRabタンパク質について解析した。これまで60種類以上が同定されているRab family Gタンパク質の一つであるRab21は、主にエンドゾームに局在し、receptor-mediated endocytosis過程で膜輸送に関わることが推定されているが、マクロパイノサイトーシスへの関与は明らかにされていない。そこで我々は、マクロパイノサイトーシス過程へのRab21の関与とその機能的役割について、GFP変異体融合タンパク質発現Live cell imaging法により

解析した。GFP変異体融合Rab21を強制発現させた上皮系A431細胞およびRAW264マクロファージ培養細胞にEGFないしM-CSFを添加してマクロパイノサイトーシスを誘起させ、Rab21の時間空間的局在の変化を動画観察すると、Rab21は、初期エンドゾームに局在するRab5と大部分共存するが、Rab5よりわずかに遅れてマクロパイノゾームにリクルートされ、後期エンドゾームに局在するRab7よりやや早い時期にアソシエイトすることが判明した。また、後期エンドゾーム/ライソゾームのマーカーであるLampタンパクが現れる前には消失することが分かった。このことから、Rab21は、マクロパイノサイトーシスの初期から中期にまたがるRab5とRab7の中間的ポジションをとっていることが分かった(下図)。



また、Rab21のGTPが結合しない不活性型変異体 (Rab21T33N) では、マクロパイノゾームへのリクルートが見られなかったが、マクロパイノゾーム形成には影響を与えなかった。以上のことから、Rab21は、初期から中期のマクロパイノゾーム機能、おそらく成熟過程での膜輸送に関与し、その局在には、GTPの結合が必須であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Egami, Y., Araki, N.: Characterization of rab21-positive tubular endosomes induced by PI3K inhibitors. *Experimental Cell Research*, 314, 729-737 (2008) 査読有
- ② Araki, N., Egami, Y., Watanabe, Y., Hatae, T.: Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Experimental Cell Research* 313, 1496-1507 (2007) 査読有
- ③ Tuboi, K., Zhao, L.-Y., Okamoto, Y., Araki, N., Ueno, M., Sakamoto, H., Ueda, N.: Predominant expression of lysosomal N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase in macrophages revealed by immunochemical studies. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771, 623-632 (2007) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 江上洋平、荒木伸一: マクロパイノサイトーシス過程におけるRab21の時間空間的局在変化. 第114回日本解剖学会総会, 2009年3月28日, 岡山市
- ② 荒木伸一: 脂質シグナル分子のlive cell imaging 解析, 日本顕微鏡学会第51回シンポジウム, 2007年10月20日, 徳島市

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

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