

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390039

研究課題名(和文) Rac1活性の光制御によりマクロパイノサイトーシスをコントロールする

研究課題名(英文) Control of macropinocytosis by photomanipulation of Rac1 activity

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：マクロパイノサイトーシスにおけるRac1分子スイッチの役割を、photoactivatable (PA)-Rac1の光制御法により解析を行った。顕微鏡下で細胞の局所に光を照射してPA-Rac1をON状態にすると、アクチン重合やPIP2産生により細胞表層ラッフリングが起こり、多数のマクロパイノゾーム前駆構造が形成された。しかし、Rac1がONのままではその前駆構造は開口したカップ状態で留まり、光照射を止めOFF状態にすることで初めて閉鎖が起こりマクロパイノゾーム成熟過程へと進行する。このようにRac1のONとOFFが、カップの形成と閉鎖のそれぞれに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to characterize the activation and deactivation of Rac1 in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. Expression of genetically encoded photoactivatable(PA)-Rac1 in RAW264 macrophages enabled the local, reversible control of macropinocytosis using blue laser irradiation. Marked membrane ruffling and unclosed pre-macropinosomes were observed in the irradiated region of macrophages under the persistent activation of PA-Rac1. Although PI4,5P2 and actin accumulation were observed to this region, the recruitment of maturing endosome markers, such as PI3P and Rab21, was restricted until PA-Rac1 deactivation. After deactivating PA-Rac1 by ceasing irradiation, membrane ruffling immediately receded, and the macropinosomes acquired maturation markers. These data suggest that activation of Rac1 is sufficient to induce membrane ruffling and macropinocytic cup formation, but subsequent deactivation of Rac1 is required for macropinosome closure and further maturation.

研究分野：解剖学、細胞生物学

キーワード：Rac1 分子スイッチ マクロパイノサイトーシス 蛍光イメージング 光遺伝学 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

低分子量 G タンパク質は、Ras, Rho, Rab, ARF, Ran の subfamily からなる低分子量 GTPase で、活性化 GTP 結合型から GTP を GDP に加水分解することにより不活性型にかわる。さらにその GDP を GTP に交換することで再活性化する。このように、GTP の結合、分解、交換による活性型と不活性型間の変換サイクルによって細胞内シグナル伝達における分子スイッチとして機能し、細胞増殖、細胞運動、小胞輸送など多くの細胞機能の制御調節に関わっている。このうち Rho family に属する Rac1 は、細胞骨格の構築をダイナミックに制御することにより、細胞移動やアクチン依存性のマクロパイノサイトーシスやファゴサイトーシスなどの細胞機能に深く関わり、癌細胞の浸潤、形態形成、異物貪食による免疫機能などの重要な調節因子として注目されている。この分子スイッチは、細胞内の局所で ON、OFF することにより下流エフェクター分子の正確な時間空間的制御をおこない、細胞内のサブミクロンレベルでの複雑な形態変化をおこしていると考えられているが、その詳細は不明な点が多い。

生体シグナル分子の機能の解析は、ドミナントネガティブ変異体の発現、RNA 干渉などの技術を用いて行われることが多いが、これらの方法は、その分子の機能を不可逆的に障害したり、分子を恒常的にノックダウンさせたりするため、分子スイッチ ON、OFF を操作することはできない。FRET イメージング法では、Rac や Ras 分子の活性化状態を生きた細胞内で可視化することが可能になったが、この方法でもその分子の細胞局所における活性化、不活性化がどのような細胞応答を起こすのか直接的に観察することはできなかった。最近、米国の Klaus Hahn らは、生きた細胞にブルーレーザー光を特定の領域に、任意のタイミングで照射することにより GTP 結合タンパク質の活性スイッチを自由に ON、OFF できる光遺伝学的プローブを開発した (Wu et al. Nature, 2009)。これは、植物の光依存性 kinase である phototropin に含まれる light-oxygen-voltage (LOV) domain を Rac1 に融合させたもので、LOV domain は、光の無いところでは、Rac1 のエフェクター結合部位を覆うように位置する (スイッチ OFF 状態となる) が、青色光を浴びると自身の構造を変化させ、エフェクターの結合部位を露出させる (スイッチ ON 状態となる)。この photoactivatable (PA)-Rac1 プローブを遺伝子導入により発現させ、ブルーレーザー光照射することで生きた細胞内の Rac1 活性を制御すれば、Rac1 依存性の細胞現象をコントロールできると考えられる。

2. 研究の目的

Rac 依存性の細胞現象の一つであるマクロパイノサイトーシスは、細胞外液を取り込み、抗原提示経路に供するという生理的機能を

担うほか、ドラッグデリバリー経路としての利用やサルモネラ菌などの病原菌やエボラウイルスをはじめ多くの種のウイルスの感染経路ともなるためその分子機構の解明は重要な課題であり、近年広い分野の研究者から注目を集めている。我々は、アクチン依存性液相エンドサイトーシスであるマクロパイノサイトーシスの制御機構に関する研究を長年続けており、マクロパイノサイトーシス過程でのアクチン細胞骨格と膜輸送、それを制御する因子の動態をライブイメージング解析で明らかにしてきた。今回の研究プロジェクトでは、光遺伝学 (オプトジェネティクス) による光制御イメージングという画期的な技術をマクロパイノサイトーシスの解析に応用し、生きたマクロファージで Rac1 分子スイッチの光による時間空間的制御をおこなうことで、マクロパイノサイトーシスという動的な細胞現象における Rac1 の分子スイッチとしての真の機能を可視化、解明することを目的とした。

マクロパイノゾーム形成過程のアクチン依存性の細胞表面運動は、ホスホイノシチド脂質シグナルや Rac1, Cdc42 など多くのシグナル因子により、巧妙な時間空間的制御を受けているがその詳細は不明な点が多い。このプロジェクトにより、Rac1 の活性化、不活性化が、マクロパイノサイトーシスのどの過程を制御し、どのような形態変化やエフェクター分子のリクルートに関与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

PA-Rac1 の cDNA を RAW264 マクロファージへ Neon 核内エレクトロポレーション (Invitrogen) で遺伝子導入することで mCherry 融合 PA-Rac1 を発現させ、mCherry の赤色蛍光で Rac1 の発現、局在をレーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM700) で確認した。発現細胞の特定領域を指定し、その部位に青色レーザー (445 nm) を連続照射または一定期間のパルス照射することで Rac1 を活性化させ、その部位に起こる形態変化、アクチン細胞骨格系機械分子、イノシトールリン脂質や Rab シグナル分子の局在変化を YFP ないし GFP 融合タンパクを用いてライブセルイメージング観察および蛍光定量解析を行った。光制御 Rac1 の局所的な活性化およびその後の不活性化によりマクロパイノサイトーシスの過程を人為的にコントロールし、Rac1 の分子スイッチとしての機能を可視化、画像定量解析を行った。

マクロファージのファゴサイトーシス過程においてもアクチン細胞骨格制御に Rac1 が関与していることが知られているため、PA-Rac1 光制御システムを応用してファゴサイトーシス過程での Rac1 分子スイッチの役割解明にも研究を発展させた。ファゴサイトーシス時の PA-Rac1 光制御には、我々が開発した optogeneic microscopy system (論

文)を利用した。

更にマクロファージ以外の細胞では、PA-Rac1 を発現させた前立腺がん PC3 細胞で Rac1 を光制御し、ラメリポディア形成、ラッピング運動における Rac1 分子スイッチの ON と OFF の役割を顕微鏡下で解析した。また、Rac1 と PI3K の関係を明らかにする目的で、PI3K 阻害剤の存在下で PA-Rac1 の光制御を行い、がん細胞の浸潤、転移機構における Rac1 分子スイッチと PI3K の関係についても検討した。

4. 研究成果

PA-Rac1 を発現させた RAW264 マクロファージに青色レーザーを照射することで Rac1 の ON・OFF を光制御し、アクチン依存性のマクロパイノサイトーシス過程を顕微鏡下でコントロールすることに世界で初めて成功した。

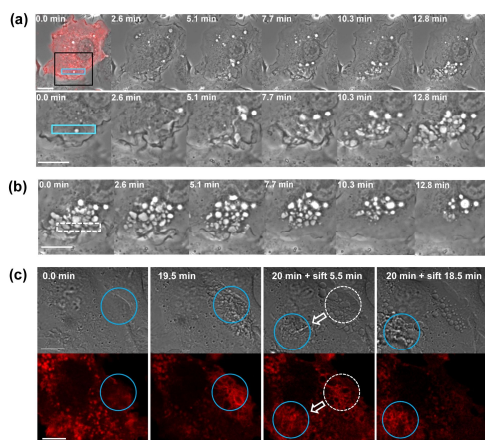


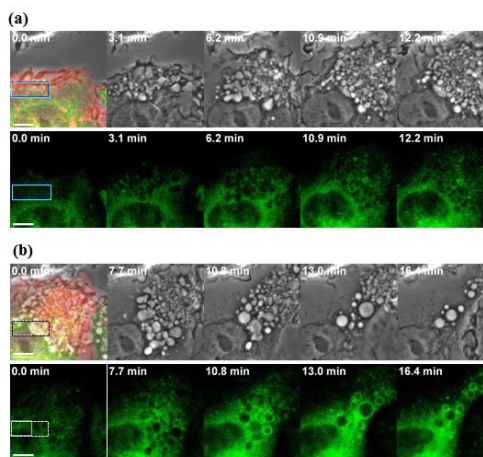
Fig.1 PA-Rac1 の光制御によるマクロパイノサイトーシス過程の制御。(a)照射中(b)照射中止後(c)照射部位を移動。(論文 より)

mCherry 融合 PA-Rac1 を発現させた細胞を顕微鏡下で確認し、その細胞の一部を青色レーザーで照射すると、その領域付近で著しい細胞表面ラッピングが起こり、多数のマクロパイノゾーム前駆構造が形成された (Fig.1a)。照射部位にはアクチンの集積や PI(4,5)P₂ の産生など初期マクロパイノサイトーシス過程のマーカも確認された。しかし、PI3P, Rab21 等マクロパイノゾーム成熟にかかわる分子のリクルートは見られなかった。青色レーザー照射を止めると、ラッピングはおさまり、マクロパイノゾーム様構造の幾らかは Rab21 陽性のマクロパイノゾームとして細胞中央へ向かって移動しはじめた (Fig.2)。

しかし、青色レーザーの長期継続照射では、マクロパイノゾーム前駆構造は細胞外に開口したままで、その領域内で留まり時間経過に伴い増加し続けた。このことは、Rac1 の活性化はラッピングとマクロパイノゾーム前駆構造の形成に必要でマクロパイノゾームの閉鎖と成熟過程への移行には、Rac1 の一

時的な活性化に続く不活性化が必要であることを示唆している。

従来、分子スイッチの役割は、ON の状態になることの意義ばかりに着目されてきたが、この研究により ON から OFF への状態変化が



有する能動的な意義が証明された。主な研究成果は、原著論文として Scientific Reports (2013) に発表したほか、Frontiers in Physiology(2014) に総説論文を掲載している。

Fig.2 Rac1 の持続的活性化時(a)では Rab21 の局在化は起こらず、不活性化後 (b) にマクロパイノゾーム形成と Rab21 のリクルートが見られる。(論文 より)

IgG オブソニン化粒子状異物の取り込みである Fc レセプター介在性ファゴサイトーシス過程の形態、分子制御は、マクロパイノサイトーシスと類似する点が多い。そこで、PA-Rac1 光制御システムを応用し、Fc レセプター介在性のファゴサイトーシス (IgG オブソニン化赤血球の取り込み) の過程での Rac1 の ON、OFF の役割を解析し、マクロパイノサイトーシスの場合と比較検討を行った。IgG オブソニン化赤血球を取り囲むファゴサイティックカップの形成のための偽足進展には Rac1 の活性化 (ON) が必要であるが、IgG オブソニン化赤血球を掴んで絞り上げながら細胞内に取り込むカップ収縮運動には Rac1 の不活性化 (OFF) が必要であるという所見を得た。Rac1 分子の ON 状態から OFF 状態への遷移は、マクロパイノサイトーシス、ファゴサイトーシスの両過程で必須であるが、そのタイミングや方向など時間空間的な制御の仕方は異なっていることが示唆された。この研究成果は、いくつかの学会で発表を行ったが、現在も研究は継続中である。

また、マクロファージ以外の細胞では、前立腺がん PC3 細胞のラメリポディア形成、細胞移動における Rac1 分子スイッチの ON、OFF それぞれの役割と PI3K の関連を PA-Rac1 光制御で解析し、Rac1 活性化によって生じるラメリポディア形成運動には、PI3K 依存性で水平方向の伸展と PI3K 非依存性で上下運動す

るラッピング運動の2つの過程があることを明らかにした。これは、がんの浸潤、転移の分子機構の解明に重要な所見であり、PLOS ONE(2014)に論文として掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

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) in press. 査読有

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.* 5, article 374 (2014) doi: 10.3389/fphys.2014.00374 査読有

Maekawa, M., Terasaka, S., Mochizuki, Y., Kawai, K., Ikeda, Y., Araki, N., Skolnik, E. Y., Taguchi, T., and Arai, H.: Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E978-987 (2014). doi:10.1073/pnas.1311029111. 査読有

Kato, T., Kawai, K., Egami, Y., Kahehi, Y., Araki, N.: Rac1-dependent lamellipodial motility in prostate cancer PC-3 cells revealed by optogenetic control of Rac1 activity. *PLOS ONE*, 9, e97749 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0097749. 査読有

Araki, N., Ikeda, Y., 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* 63, 255-260 (2014) doi: 10.1093/jmicro/dfu003 査読有

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

〔学会発表〕(計15件)

Araki, N.: Optogenetic analysis of spatiotemporal regulation of macropinocytosis

and phagocytosis through Rac1 switching in macrophages. (シンポジウム講演) 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合同大会 2015年3月21-23日, 神戸国際会議場、兵庫県神戸市

Ikeda, Y., Kawai, K., Araki, N.: Molecular mechanism of phagosome formation by Rac1 switching control both in space and time. (優秀演題賞) 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合同大会, 2015年3月21-23日, 神戸国際会議場、兵庫県神戸市

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

江上 洋平、川合 克久、荒木 伸一: Zymosan 貪食過程における Rit1 GTPase のライプセルイメージング. 第119回日本解剖学会総会全国学術集会 2014年3月27-29日, 自治医科大学、栃木県下野市

川合 克久、江上 洋平、荒木 伸一: ファゴゾーム成熟過程における Rab35 の役割. 第119回日本解剖学会総会全国学術集会 2014年3月27-29日, 自治医科大学、栃木県下野市

加藤 琢磨、川合 克久、江上 洋平、荒木 伸一、笈 善行: 前立腺がん細胞移動 (migration) における低分子量 GTPase Rac1 を介した制御機構の optogenetics 解析. 第23回泌尿器科分子・細胞研究会 2014年3月14-15日, ホテルメトロポリタン山形 山形県山形市

荒木 伸一、池田 結香、加藤 琢磨、川合 克久、江上 洋平、三宅 克也: 水銀アーク光源蛍光顕微鏡をベースとした photo-manipulation システムの構築. 日本解剖学会第68回中国・四国支部学術集会 2013年10月19-20日, 鳥取大学、鳥取県米子市

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回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2013年9月27-28日, 航空開会、東京都港区

荒木 伸一、川合 克久、藤井 誠、江上 洋平: Rac1 光制御により生細胞のマクロパイノサイトーシス過程を顕微鏡で操作する.

日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会 2013 年
5 月 20-22 日、ホテル阪急エキスポパーク、
大阪府吹田市

藤井 誠, 荒木 伸一: Photo-activatable Rac1
を用いてマクロパイノサイトーシスの形
成・成熟過程を制御する. 第 35 回日本分子生
物学会年会、2012 年 12 月 11 -14 日、福岡国
際会議場、福岡県福岡市

藤井 誠, 荒木 伸一: 光制御 Rac1 を用いた
マクロパイノサイトーシス過程における
Rac1 活性の役割解明 第 65 回薬理学会西南
部会、2012 年 11 月 23 日、熊本大学薬学部、
熊本県熊本市

藤井 誠, 荒木 伸一: Photo-activatable Rac1
を用いたマクロパイノサイトーシスの光制
御 第 6 回トランスポーター研究会九州部会、
2012 年 9 月 1 日、福岡県歯科医師会館、福岡
県福岡市

Araki, N., Fujii, M., Kawai, K., Egami, Y.:
Control of macropinocytosis by photo-
manipulation of Rac1 (Workshop lecture). 14th
International Congress of Histochemistry and
Cytochemistry、2012 年 8 月 26-29 日、京都国
際会館、京都府京都市

荒木 伸一, 藤井 誠: Photo-activatable Rac1
を用いたマクロパイノサイトーシス過程の
光制御 (シンポジウム講演) 第 117 回日本解
剖学会全国学術集会、2012 年 3 月 26-28 日
山梨大学甲府キャンパス、山梨県甲府市

荒木 伸一, 藤井 誠, 江上 洋平, 三宅 克
也: 低分子量 G タンパク質 Rac1 活性の光制
御により分子スイッチの真の役割を解析す
る (シンポジウム講演). 日本顕微鏡学会 第
67 回学術講演会、2011 年 5 月 16-18 日、福岡
国際会議場、福岡県福岡市

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

川合 克久 (KAWAI Katsuhisa)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 80534510

(3) 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

(4) 研究分担者

三宅 克也 (MIYAKE Katsuya)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号: 30219745

(5) 研究分担者

藤井 誠 (FUJII Makoto)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 30398086