

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K08468

研究課題名(和文) 多角的解析法により明らかにするTBCタンパク質を介した細胞性免疫制御機構

研究課題名(英文) Regulation of cellular immune system: a role of a TBC protein in phagosome formation

研究代表者

江上 洋平 (Youhei, Egami)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：80432780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ等の免疫系貪食細胞で活発に認められるphagocytosisは、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endocytosis現象である。本課題では、ライブセルイメージング解析、遺伝子ノックアウト、蛋白質の過剰発現解析等により、低分子量GTPaseの制御因子の一つであるTBC1D10蛋白が、IgGによりオプソニン化された異物を取り込むFcγレセプター介在性phagocytosisの重要な調節因子であることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TBC蛋白質は低分子量GTPaseを不活性化するGAPである。本研究課題により、野生型のTBC1D10のみならず、GAP活性欠損型TBC1D10の過剰発現でも貪食が抑制されることが明らかとなった。また、TBC1D10の結合蛋白として新たに同定したARF-like GTPasesをマクロファージに過剰発現させると貪食が抑制されることが明らかとなった。以上の知見は、TBC1D10は従来の定説である低分子量GTPaseの不活性化を介したシグナリングに加えて、全く新しい作用メカニズムによる貪食制御機能をもつことを示唆するものであり、学術的に極めて意義深いパラダイムである。

研究成果の概要(英文)：Phagocytosis is an important endocytic pathway that enables cells to eliminate pathogens and contribute to immunoprotection and the maintenance of tissue homeostasis. In this study, we found that TBC1D10 is involved in FcγR-mediated phagocytosis in macrophages. Live-cell imaging analysis revealed that TBC1D10 is transiently recruited to F-actin-rich phagocytic membranes during phagosome formation. Yeast two hybrid screening and immunoprecipitation assay showed that TBC1D10 is interacted with ARF-like GTPases. Moreover, the expression of ARF-like GTPases suppressed phagocytosis of IgG-opsonized erythrocytes. These data suggest that TBC1D10 is an important modulator 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 TBC1D10 蛍光ライブセルイメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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、マクロピノサイトーシスは、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。これら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、サルモネラ菌や HIV、エボラウイルスなどの病原体の感染経路としても利用される。近年、私たちは Rab35 や Rab27 の不活性化因子 GTPase-Activating Protein(GAP) として知られる TBC1D10 が、ファゴゾーム形成時に形質膜へ劇的にリクルートされる所見を見出した。TBC1D10 は、自身が有する GAP 活性により活性化型の Rab35 や Rab27 を不活性化型へと変換する制御蛋白質であり、これまでにオリゴデンドロサイトにおけるエクソソームの分泌や膵腺房細胞におけるエクソサイトーシスへの関与が報告されている。しかしながら、当蛋白質の非自己抗原取り込みへの関与は現在、全く知られていない。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、顕微形態学・生化学・分子生物学を基盤とする解析により、TBC1D10蛋白質のキャラクタライゼーション(形質膜局在化領域や貪食抑制領域の特定など)や貪食抑制機能を担う下流エフェクター分子の同定と機能解析による新規シグナル伝達経路の解明を通して、細胞性免疫機構維持の制御性アダプター蛋白質としてTBC1D10の新たな役割を提起することを目指す。ファゴゾーム形成は、細胞骨格と膜輸送が密接に連携し劇的な形態変化をもって行われるプロセスである。TBC1D10はこの過程を制御する重要な機能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形成・閉鎖時におけるTBC1D10の詳細な細胞内局在や、形質膜へのリクルートのメカニズムは明らかではない。さらに、当蛋白質を足場としたGAP活性に依存しない膜-細胞骨格制御シグナリングは、他の研究領域を含めて全く知られていない。そこで本研究課題では、まず、多色蛍光ライブセルイメージング解析によりTBC1D10と各種貪食マーカーとの時空間的な相関関係を明らかにする。次に、TBC1D10の様々な変異体の過剰発現実験や光遺伝学的ツールを含む顕微形態学的観察による細胞内局在解析、ファゴゾーム形成能の定量化により、ファゴサイトーシス過程における当因子の形質膜局在化領域と貪食抑制領域の特定を行う。さらに、TBC1D10をBaitとするYeast two hybrid法、或いはTBC1D10リコンビナントを用いた共免疫沈降・質量分析スクリーニングによりTBC1D10の結合蛋白質の同定を目指す。得られた結合蛋白質を多角的手法で機能解析することにより、TBC1D10を介した新規シグナル伝達経路、当蛋白質の生物学的意義、TBC1D10の制御異常が引き起こす細胞性免疫機構破綻の分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養と遺伝子導入

RAW264 細胞は、10% FBS(Fetal bovine serum)を含む DMEM 培地を用いて培養した(37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下)。遺伝子導入は Neon Transfection System (Invitrogen)を用いて行った。遺伝子導入細胞は、25mm 径の丸型カバーガラス上で 16~48 時間培養した。

#### (2) 蛍光顕微鏡観察

蛍光融合蛋白を遺伝子導入した細胞の培養液は、顕微鏡観察前に Ringer's buffer(155 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 0.5 mg/ml BSA)に置き換えた。ライブセルイメージングを含む蛍光顕微鏡観察は、LSM700 (Carl Zeiss)を用いた。

#### (3) TBC1D10 蛋白の欠失変異体の作成

TBC1D10 の様々な欠失変異体の発現ベクターは、PCR 法と遺伝子組み換えにより作成した。

#### (4) Yeast two hybrid スクリーニング

Yeast two hybrid は Matchmaker Gold 酵母ツーハイブリッドシステム (Clontech) を用いて行なった。スクリーニング用のライブラリーは、Mate&Plate Library-Universal Mouse (Clontech) を利用した。

#### (5) ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティングは文献 (Egami Y, Kawai K, Araki N. J Cell Sci.

2017;130(24):4168-4179.) と同様の方法で行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) TBC1D10 蛋白内の形質膜局在化領域と貪食抑制ドメインの決定

ファゴゾーム形成時における TBC1D10 蛋白内の形質膜局在化領域や貪食抑制に重要なドメインは不明である。そこで、全長 798aa の TBC1D10 の様々な欠失変異体発現ベクターを構築した。具体的には、他の TBC 蛋白とアミノ酸配列の相同性がない TBC1D10 にユニークな領域 (1-227aa)、TBC ドメインを含んだ領域 (228-631aa)、TBC1D10 の C 末端領域 (632-798aa)、さらにこれらの領域の組み合わせからなる 1-631aa、228-798aa の GFP 融合欠失変異体 (野生型、並びに Rab GTPase に対する GAP 活性変異体) を作成し、これらの細胞内局在をコンフォーカル観察した。その結果、TBC ドメインを含んだ 228-631aa の領域が形質膜への局在に重要であることが明らかとなった。また、この GFP 融合欠失変異体は形質膜に加えて核への局在化を示したが、TBC1D10 の 1-227aa の領域付与により、核への移行が消失し、形質膜と細胞質へ局在を変化させることがわかった (1-227aa の領域は核外移行シグナルを有するものと考えられる)。次に、これらの変異体をマクロファージに過剰発現させ、貪食活性の定量化を行ったところ、TBC1D10 蛋白の 228-631aa の領域が低分子量 GTPase に対する GAP 活性非依存的に貪食抑制を示すことがわかった。以上の結果は、TBC1D10 の TBC ドメイン領域近傍がファゴサイティックメンブレンへの局在化と貪食抑制に重要であることを示唆するものである。

(2) TBC1D10 (228-631aa) を bait とした結合タンパク質の Yeast two hybrid スクリーニング  
TBC1D10 の 228-631aa の領域を用いて TBC1D10 結合タンパク質の Yeast two hybrid スクリーニングを行った。均一化処理されたマウス cDNA ライブラリーを対象に探索を行ったところ、約 80 の TBC1D10 結合タンパク質候補を得た。

#### (3) TBC1D10 結合タンパク質の機能解析

Yeast two hybrid スクリーニングにより得られた TBC1D10 の結合蛋白質候補について、培養細胞を用いた免疫沈降実験による結合偽陽性クローンの排除と真の結合蛋白質の同定を行った。その結果、低分子量 GTPase である ARF 類似蛋白質を TBC1D10 の新規結合蛋白質として同定した。この蛋白質は哺乳類では 3 種類のアイソフォーム (A, C, D) が知られていることから、これらのマウス cDNA をクローニングし、RAW264 細胞を用いて TBC1D10 との細胞内局在をコンフォーカル顕微鏡により比較検討した。その結果、アイソフォーム C が TBC1D10 と最もよく共局在を示し、次いでアイソフォーム A, D の順で TBC 蛋白と細胞内局在が一致することが明らかとなった。次に、アイソフォーム C に対する特異的な抗体を用いて、RAW264 細胞を含めた様々な培養細胞株における蛋白質の発現量を比較したところ、アイソフォーム C は上皮系細胞において高いレベルの発現が認められる一方で、マクロファージ系細胞において、極めて発現量が低いことが判明した。アイソフォーム A, C, D をそれぞれ RAW264 マクロファージに過剰発現させると、アイソフォーム C とアイソフォーム A において、著しいラフリングの亢進が認められた。また、このラフリングの亢進は、GTP 結合型変異ミュータントを用いた発現機能解析から、GTP 依存的であることが明らかとなった。他の低分子量 GTPase である Rac1 を RAW264 細胞に過剰発現させると、細胞表面のラフリングが促進されることが知られていることから、アイソフォーム A とアイソフォーム C は Rac1 シグナリング経路の活性化に関与しているものと思われる。次に、アイソフォーム A、

C、Dの過剰発現による、Fcレセプター介在性ファゴサイトーシスへの影響について検討した。RAW264細胞にアイソフォームA、C、DのGTP結合型、野生型を発現させ、IgGコートされた赤血球の取り込みを、顕微鏡下でカウントすることにより定量化したところ、アイソフォームA、C、DのGTP結合型の過剰発現により貪食が抑制されることが明らかとなった。したがって、TBC1D10はARF-like GTPasesのシグナリング経路を介してファゴゾーム形成を抑制している可能性が推定される。

#### (4) 低分子量GTPaseの機能解析

Yeast two hybridスクリーニングと並行して、本研究課題と細胞内情報伝達系に関連のある低分子量Gタンパク質の幾つかをクローニングし、各因子の貪食過程における局在動態をライブセル観察した。その中でもRho family memberに属するRhoCはFcR介在性ファゴサイトーシス過程において、一過性に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。このファゴサイティックカップへの集積はRhoCと相同性が高いRhoAでは認められず、RhoCに特異的であったことから、当因子の機能解析を進めたところ、内在性RhoCは貪食ターゲットの取り込みに重要であり、アクチン繊維形成タンパク質mDia1を介してファゴゾーム形成を調節していることが明らかとなった。以上の成果は2017年のJournal of Cell Science誌に掲載された。更に、Ras family memberに属するM-Rasの貪食過程における局在・機能解析も行った（2018年のMicroscopy誌に掲載）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Egami Y, Kawai K, Araki N	4. 巻 130
2. 論文標題 RhoC regulates the actin remodeling required for phagosome formation during Fc R-mediated phagocytosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of cell science	6. 最初と最後の頁 4168-4179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.202739	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 Egami Y, Araki N	4. 巻 67
2. 論文標題 Transient recruitment of M-Ras GTPase to phagocytic cups in RAW264 macrophages during Fc R-mediated phagocytosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 68-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfx131	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 -
1. 著者名 Kawai Katsuhisa, Egami Youhei, Nishigaki Arata, Araki Nobukazu	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 HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	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 Park Eugene Won, Kawai Katsuhisa, Egami Youhei, Araki Nobukazu	4. 巻 155
2. 論文標題 A novel DENND1B-localized structure found at the basal side of adherent cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 9～18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-020-01935-0	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8件（うち招待講演 2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（山口県宇部市）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江上洋平、川合克久、荒木伸一
2. 発表標題 TBC1D10Bはマクロファージにおける貪食抑制因子である
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅克也、江上洋平、川合克久、松田知栄、嘉納萌、Lytnev Vitalii、林由起子、荒木伸一
2. 発表標題 骨格筋線維膜修復に必要なMICAL1とアクチン脱重合
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江上洋平、川合克久、荒木伸一
2. 発表標題 Fc レセプター介在性ファゴサイトーシス過程におけるRit1 GTPaseの機能解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江上洋平、川合克久、荒木伸一
2. 発表標題 Rit1 GTPaseはFc レセプター介在性のファゴゾーム形成を制御する
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川合克久、江上洋平、荒木伸一
2. 発表標題 RAW264細胞内におけるRab35の局在化機構の解析
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川合克久、江上洋平、荒木伸一
2. 発表標題 新規マクロパイノサイトーシス関連経路の形態と分子基盤
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三宅克也、荒木伸一、川合克久、江上洋平
2. 発表標題 Rab23およびRab34の骨格筋線維膜修復時の動態
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017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  (Araki Nobukazu)  (10202748)	香川大学・医学部・教授   (16201)	
研究 分担者	川合 克久  (Kawai Katsuhisa)  (80534510)	香川大学・医学部・助教   (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
---------	---------