

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790188

研究課題名(和文) ファゴゾーム形成分子 Rab35 を介した細胞骨格と膜輸送の協調メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of Rab35 GTPase: insight into cytoskeletal remodeling and membrane trafficking during phagocytosis

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

研究成果の概要(和文)：

マクロファージ等の貪食細胞で認められるファゴサイトーシスは、細胞骨格と膜輸送が巧妙に制御される複雑な細胞内プロセスである。この過程を調節するキーファクターの同定と機能解析は、感染症などにおける創薬ターゲットを見つける上でも重要な位置づけにある。本研究課題では、Rab35 が貪食制御の重要因子であることを突き止めた。膜輸送の調節蛋白質として知られる Rab35 が、貪食過程における骨格制御にも関与するという知見は、極めてインパクトのある新規パラダイムである。

研究成果の概要(英文)：

Phagosome formation and subsequent maturation are complex sequences of events that involve actin cytoskeleton remodeling and membrane trafficking. In this study, we found that the Ras-related protein Rab35 is involved in the early stage of Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. Our data indicate that Rab35 regulates actin-dependent phagosome formation by recruiting ACAP2, which might control actin remodeling and membrane traffic through ARF6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：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、Rab35、エフェクター分子、細胞骨格、膜輸送、ACAP2、ARF6、蛍光ライブセルイメージング

1. 研究開始当初の背景

ファゴサイトーシスおよびマクロピノサイトーシスは共にマクロファージ等の活発な貪食細胞によくみられるエンドサイトーシス現象であり、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。ファゴサイトーシスは、貪食細胞が生体に侵入した細菌などの大きな粒子をファゴゾームという小胞膜で包み細胞内に取り込んで、さらにライソゾームとの融合により分解・処理する過程である。

一方、マクロパイノサイトーシスは、直径 $0.2\mu\text{m}$ 以上のパイノソームによる非選択的な液相性の取り込み・分解処理過程をさす。研究代表者らはこれまでに、細胞内小胞輸送を司る分子の一つである Rab GTPase の解析を行ってきた。Rab family 低分子量 G 蛋白質は哺乳類では約 60 種類以上のメンバーからなり、個々のメンバーが細胞内の特定の膜系に局在し、細胞内小胞輸送を制御していると考えられている。これまでにファゴサイトーシス・マクロパイノサイトーシス両経路において、Rab5、Rab7、Rab34 などのいくつかの Rab GTPase が細胞内小胞輸送とその融合過程に関与することが示されているが、未だ不明の点も多く両経路の全体像を理解するには至っていない。以上のような背景のもと、研究代表者らはファゴサイトーシス・マクロパイノサイトーシス経路に関与する Rab GTPase の探索を進め、Rab35、Rab20、Rab21 などの分子候補を得た。この中でも、Rab35 はファゴゾーム形成初期にアクチン依存性のファゴサイティックカップに集積し、内在性 Rab35 を RNAi 法によりノックダウンすると食食が著しく低下することが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

ファゴゾーム形成は、細胞骨格と膜輸送が密接に連携したプロセスである。Rab35 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、膜-細胞骨格間でシグナルを伝える直下のエフェクター分子は他の研究領域を含めてほとんど明らかではない。そこで、本研究課題では、ファゴゾーム形成に関わる Rab35 の下流エフェクター分子を同定すると共に、顕微形態学的切り口でその機能を明らかにし、膜輸送と細胞骨格の協調を調節するアダプター分子として、Rab35 の新たな位置づけを図ることをその目的とした。

3. 研究の方法

(1) Yeast two hybrid 法による Rab35 結合蛋白質の同定

Rab35 の直接的な下流エフェクター分子は不明である。そこで Rab35 と相互作用する分子を Yeast two hybrid 法によりスクリーニングした。まず、Bait となる Rab35 の発現 Vector を構築し、マウスのライブラリーを用いてスクリーニングした。こうして得られたクローンは、再度、結合実験を行った後、全長をクローニングし、マクロファージにおける細胞内局在について検討を行った。

(2) ファゴゾーム形成に関わる調節因子の探索と機能解析

Rab35 との関連が予想される様々な調節因子をクローニングし、蛍光ライブセル観察をすることにより、ファゴゾーム形成に関わる分子の探索と機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) Yeast two hybrid 法による Rab35 結合蛋白質の同定

蛋白質の同定

Rab35 を Bait にした Yeast two hybrid スクリーニングを行った結果、PTPS (6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase) を Rab35 の新規結合蛋白質として同定した。PTPS は、ファゴサイトーシス過程への関与が全く報告されていないことから、マクロファージにおける当因子の機能解析を進めている。

(2) ファゴゾーム形成に関わる調節因子の探索と機能解析

神経細胞において Rab35 依存性の突起伸展を制御する因子として、ACAP2 が報告された。ACAP2 は ARF6 を不活性化させる GAP (GTPase-activating protein) であることから、ファゴサイトーシス過程において小胞輸送とアクチン細胞骨格再構成を担う ARF6 に対して、この GAP が活性調節を行っている可能性が考えられた。そこで、当制御因子についてオプソニン化赤血球食食過程における局在解析を行った。RAW264 マクロファージに GFP-ACAP2 を発現させ、ライブセル観察を行ったところ、ACAP2 はファゴサイトーシスに伴うカップ形成時において、一過性に形質膜へとリクルートされることが明らかとなった (図 1)。

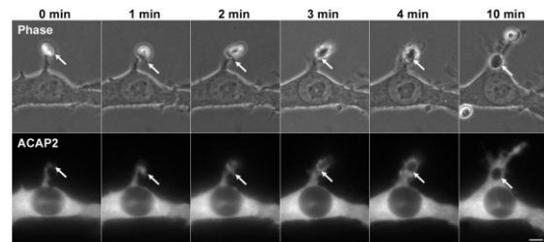


図 1 食食過程における ACAP2 の局在

さらに、Rab35 の GTP 結合型 (Rab35-Q67L) を共発現させたマクロファージにおいて、ACAP2 の食食カップへの著しい集積 (図 2) と食食抑制が認められた (図 3)。

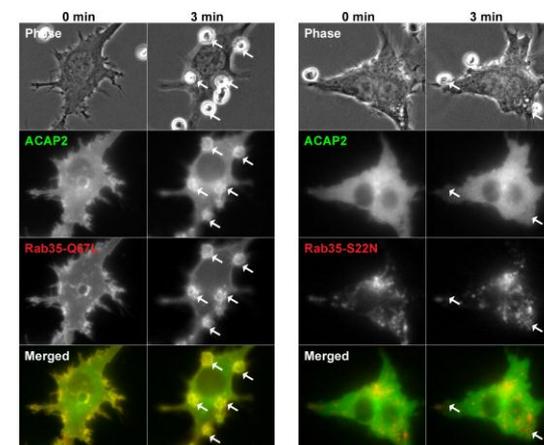


図 2 活性化型 Rab35 依存的に ACAP2 はファゴサイティックカップに集積する

次に、活性化型 Rab35 (Rab35-Q67L) と ACAP2 の共発現系で確認された食食抑制効果が ARF6 の活性調節を介したものであるかどうか検討した。ARF6 に対する GAP 活性を欠損した ACAP2 変異体 (ACAP2-RQ) を Rab35-Q67L と共に RAW264 マクロファージに過剰発現させ、食食活性を定量的に評価したところ、ACAP2 の野生型と Rab35-Q67L の共発現系で認められた相乗的な抑制効果が ACAP2-RQ-Rab35-Q67L 共発現系では消失することが明らかとなった (図 3)。

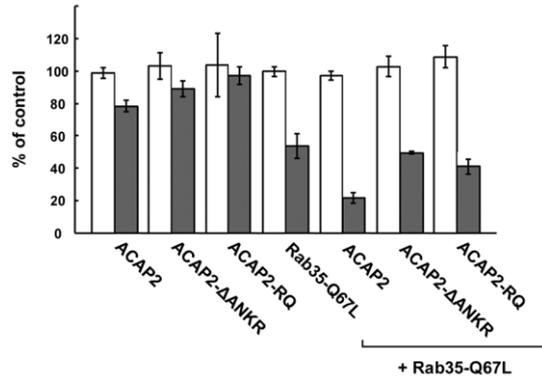


図 3 ACAP2 および Rab35 の過剰発現による食食ターゲットの捕捉 (グレー)、取り込み (白) への影響

このことから Rab35 は ACAP2 を膜にリクルートすることにより ARF6 の活性を低下させ、ファゴサイトーシスを制御している可能性が示唆された。次に、活性化 Rab35 の安定発現細胞株を樹立し、この細胞株における ARF6 の活性化状態を調べた。活性化 ARF6 に特異的に結合する GST-GGA3 蛋白質を用いて GST pull down assay を行ったところ、Rab35-Q67L 発現細胞において ARF6 の活性がコントロール (GFP 発現系) に比べて有意に低下していることが明らかとなった。また、Fc レセプター介在性ファゴサイトーシス過程において通常みられる ARF6 の活性化も抑制されていた (図 4)。

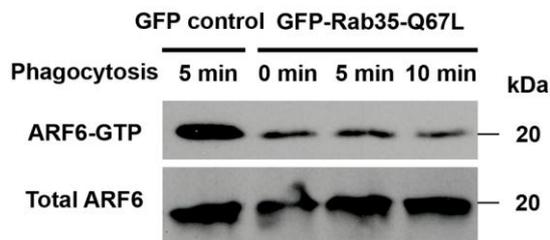


図 4 活性化型 Rab35 発現マクロファージにおける ARF6 の活性化状態

以上の結果を纏めると、Rab35 は ARF6 の GAP (GTPase Activating Protein) である

ACAP2 をファゴサイティックカップにリクルートすることにより、ファゴゾーム形成を巧妙に調節していることが明らかとなった (図 5)。

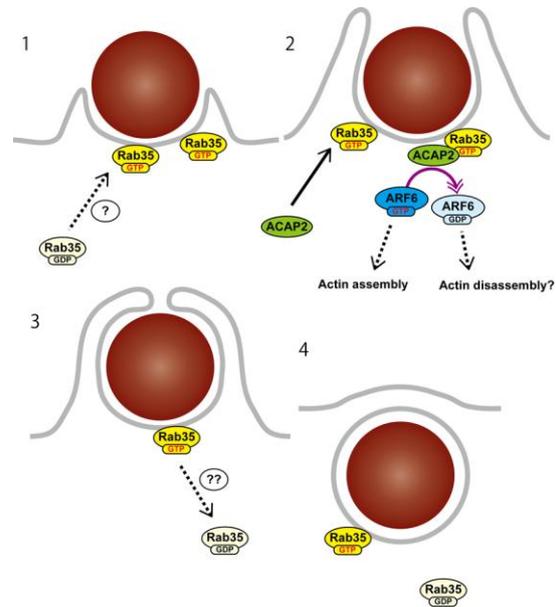


図 5 Summary

膜輸送のレギュレーターとして知られる Rab35 が、アクチン依存性のファゴサイティックカップ形成に関与するという知見は、食食メカニズムの研究領域において極めてインパクトのある新規パラダイムであり、国際学術誌 *J. Cell. Sci.* (November 1 2011) の In This Issue でハイライト論文にも選定された。

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 3 件)

- ① Egami Y, Araki N. Spatiotemporal Localization of Rab20 in Live RAW264 Macrophages during Macropinocytosis. *Acta Histochem Cytochem.* 査読有 45 (2012) 317-323
doi: 10.1267/ahc.12014.
- ② Egami Y, Araki N. Rab20 regulates phagosome maturation in RAW264 macrophages during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *PLoS One* 査読有 7 (2012) e35663
doi: 10.1371/journal.pone.0035663.
- ③ Egami Y, Fukuda M, Araki N. Rab35 regulates phagosome formation through recruitment of ACAP2 in macrophages during Fc gamma R-mediated phagocytosis. *J Cell Sci.* 査読有 124 (2011) 3557-3567

[学会発表] (計 8 件)

- ① 江上洋平: Rab35 およびその関連タンパク質による食食調節機構. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日, 香川県
- ② 石川有里恵: マクロファージにおけるファゴサイトーシスへの Rab35 の関与: 異なる食食ターゲットの取り込み機構での差異について. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日, 香川県
- ③ 荒木伸一: Control of Macropinocytosis by Photo-manipulation of Rac1 Activity. 14th international congress of histochemistry and cytochemistry. 2012 年 8 月 26 日~8 月 29 日, 京都府
- ④ 江上洋平: Involvement of Rab35 in phagosome formation through regulating ARF6 activity by ACAP2. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 27 日, 山梨県
- ⑤ 三宅克也: GaAsP 搭載型多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング: アネキシン小胞による細胞膜修復. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 26 日, 山梨県
- ⑥ 荒木伸一: Fc γ レセプター介在性食食を司る機械分子と制御シグナルの可視化. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 27 回学術集会および総会, 2011 年 5 月 14 日, 徳島県
- ⑦ 江上洋平: Rab35 は ACAP2 をリクルートすることによりファゴゾーム形成を制御する. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2011 年 3 月 30 日, 神奈川県
- ⑧ 三宅克也: 細胞膜損傷修復に関わる MICAL アクチン脱重合因子. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2011 年 3 月 30 日, 神奈川県

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