

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 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890144

研究課題名（和文） 異なる貪食ターゲットによって惹起されるファゴソーム形成過程の相違点の解明

研究課題名（英文） Elucidation of target-specific mechanisms of phagosome formation through distinct receptors.

 研究代表者 藤井 誠 (MAKOTO FUJII)
 福岡大学・医学部・講師
 研究者番号：30398086

研究成果の概要（和文）：

マクロファージ等の食細胞による病原菌や外来異物の貪食は、生体防御の観点から非常に重要である。本研究では、異なる貪食ターゲットによって惹起される貪食過程とそれに係わるシグナル分子の機能相関の解明を行い、細胞内小胞輸送に関与する Rab35 が、TLR2 や FcR を介した貪食過程で重要な役割を果たしていることを明らかにした。この結果は、感染症や自己免疫疾患などの免疫異常の分子機構の解明、これらに対する治療法、創薬の開発に結びつく事が期待され、非常に重要である。

研究成果の概要（英文）：

Phagocytosis of pathogen and extracellular particles by macrophages is an important for immune system. In this study, we investigated the relationship between phagosome formation and signaling pathway using different phagocytotic targets. We found that Rab35, one of the small GTPase which involved in intracellular membrane trafficking, had pivotal role in TLR2 and FcR mediated phagocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：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、ライブセルイメージング

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ等の食細胞による病原菌や外来異物の貪食は、貪食による病原菌の除去といった初期の生体防御のみならず、貪食異物の細胞内での分解、抗原提示を介して、より高度な免疫機構への橋渡し役を担っており、生体防御の観点から非常に重要な機構である。また近年、アポトーシス細胞の除去

にも関与している事が報告されており、生体恒常性の維持や発生的観点からも非常に重要である。

現在までに、貪食ターゲットの性状の違いにより異なる受容体が、貪食に関与している事が報告されており、異なる細胞内情報伝達を惹起し、異なる処理を受けると考えられているが、その分子機構の差異は、ほとんど解

明されていない。

国内外では、受容体からの情報伝達、免疫反応活性化機構については精力的に研究が進められているが、シグナル分子からファゴソーム形成への細胞微細構造変化、ファゴソームの成熟、ファゴソーム内容物の消化分解といった機能発現へと結びつけるデータは乏しい。

2. 研究の目的

ファゴサイトーシスは、ファゴソームの形成から成熟、分解に至る過程に大別することが出来る。この過程には、様々なシグナル分子や機械分子、また、それらの調節因子が関与している事が知られている。非自己の食食である FcR や TLR を介した食食では、ファゴソーム成熟・消化分解はゆっくりと進み、抗原提示経路、免疫反応活性化へは効率的に進むと予想され、自己の食食であるアポトーシス細胞処理では、逆にファゴソーム成熟・消化分解は速く、抗原提示経路、免疫反応活性化へは向かわないはずである。これらの分別処理や処理速度を制御するためには、食食ターゲット特異的制御シグナル、分子スイッチ、機械分子が働いていることが予想される。

本研究では、細胞内小胞輸送と細胞骨格の再構築においてスイッチ分子として働く低分子量 GTPase を中心に、多色蛍光ライブセルイメージング等を行い、異なる食食ターゲットによって惹起されるファゴソーム形成、成熟過程へのこれら分子の関与の有無や時空間的相関関係を明らかにする。これにより、異なる食食ターゲットによって惹起される特異的制御シグナル、分子スイッチ、機械分子を明らかにすると共に、ファゴソームの形成、成熟、分解に至る過程に与える影響を明らかにする。本研究により得られる成果は、様々な感染症や自己免疫疾患などの免疫異常の分子メカニズムの解明、さらには、これらに対する治療法や創薬の開発に結びつく事が期待される。

3. 研究の方法

細胞内小胞輸送に関与する低分子量 GTPase Rab35 の異なる食食ターゲットによって惹起される食食小胞形成、成熟への関与を明らかにするために、マクロファージ系培養細胞株 (RAW264 細胞) において、Rab35 をノックダウンした細胞を作製する。異なる食食ターゲットとして、酵母由来 Zymosan A (TLR2 介在性自然免疫モデル)、C3b オプソニン化 Zymosan A (CR 介在性モデル)、ポリスチレンビーズ (アポトーシス細胞の食食モデル)、IgG オプソニン化ポリスチレンビーズ (FcR 介在性モデル) を用い、Rab35 ノックダウンマクロファージ (Rab35 KD) における食食活性をコントロールと比較する。

異なる食食ターゲットによって形成される食食小胞への Rab35 の局在を GFP-Rab35 発現細胞を用いて、ライブセルイメージングにより解析する。

4. 研究成果

(1) 異なる食食ターゲットとして、酵母由来 Zymosan A (TLR2 介在性自然免疫モデル)、C3b オプソニン化 Zymosan A (CR 介在性モデル)、ポリスチレンビーズ (アポトーシス細胞の食食モデル)、IgG オプソニン化ポリスチレンビーズ (FcR 介在性モデル) を用い、Rab35 ノックダウンマクロファージ (Rab35 KD) における食食活性をコントロールと比較した。Rab35 KD の食食活性は、C3b-Zymosan A、ポリスチレンビーズでは明らかな抑制が見られなかったのに対し、Zymosan A ではコントロールの 1/3 程度、IgG-ポリスチレンビーズでは 1/2 程度に抑制された。

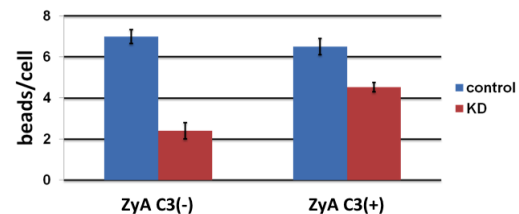


図 1 コントロールおよび Rab35 ノックダウン細胞において未処理の Zymosan A および C3 オプソニン化 Zymosan A を加え、細胞内に取り込まれた Zymosan A の個数を定量化した。

(2) これらの食食ターゲットによって形成される食食小胞への Rab35 の局在を GFP-Rab35 を用いて観察したところ、Zymosan A、C3b オプソニン化 Zymosan A、IgG オプソニン化ポリスチレンビーズでは、食食小胞への GFP-Rab35 の局在が見られたのに対し、ポリスチレンビーズでは局在が見られなかった。

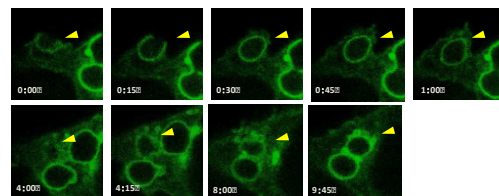


図 2 GFP-Rab35 を発現させた RAW264 細胞に C3 オプソニン化した Zymosan A を加え、共焦点レーザー顕微鏡を用いて食食過程における GFP-Rab35 の局在変化をライブセル観察した。GFP-Rab35 は、ファゴサイトカ

ップに局在し、その後一時的に減少したが、成熟期に再度ファゴソームに強い局在を示した。

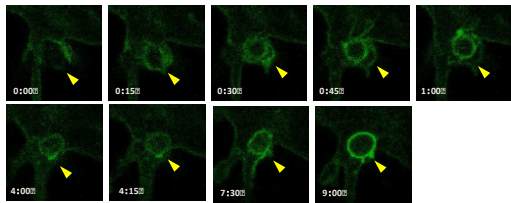


図3 図2と同様の実験を Zymosan A を食食ターゲットとして用いて行った。GFP-Rab35 は、食食の全過程においてファゴソームに局在した。

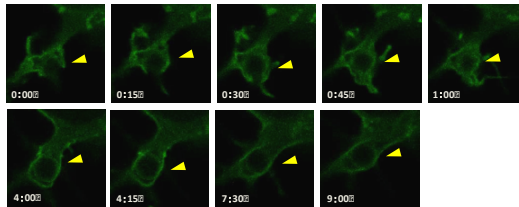


図4 図2と同様の実験を IgG コートしたポリスチレンビーズを食食ターゲットとして用いて行った。GFP-Rab35 は、ファゴサイトカップの形成時およびその後、一定期間はファゴソームに局在したが、その後、成熟期にかけて減少した。

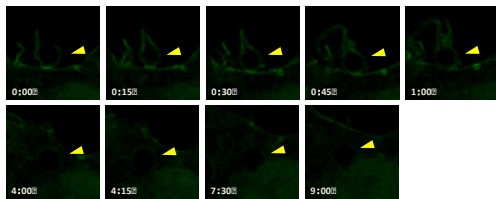


図5 図2と同様の実験を未処理のポリスチレンビーズを食食ターゲットとして用いて行った。未処理のポリスチレンビーズを食食ターゲットとして用いた場合、GFP-Rab35 は、食食の全過程において集積しなかった。

この様に、異なる食食ターゲットによって惹起される分子機構の差異を一つずつ明らかにすることは、様々な感染症や自己免疫疾患といった免疫異常の分子メカニズムの解明やこれらに対する治療法、創薬の開発に結びつく事が期待され、非常に重要である。

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 石川 有里恵, 川合 克久, 藤井 誠, 江上 洋平, 荒木 伸一
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、2013 年 3 月 28 日～30 日、香川
- ② 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 日～14 日、福岡
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ Araki, N., Fujii, M., Kawai, K. and Egami, Y.
Control of macropinocytosis by Photo-manipulation of Rac1
14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry、2012 年 8 月 26 日～29 日、京都
- ⑥ 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
第 117 回日本解剖学会全国学術集会、2012 年 3 月、山梨
- ⑦ 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
日本顕微鏡学会 第 67 回学術講演会、2011 年 5 月、福岡

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 藤井 誠 (MAKOTO FUJII)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：30398086

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし