

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890154

研究課題名(和文)ファゴソーム形成、成熟過程における細胞内情報伝達と形態変化の相互的解析

研究課題名(英文) mutual analysis of intracellular signaling and morphological change in phagosome formation and maturation

研究代表者

川合 克久 (kawai, katsuhisa)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80534510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：ファゴサイトーシスは、生体防御や発生において非常に重要である。本研究課題では、多色蛍光ライブセルイメージング解析等を用い、Fc-gamma受容体依存性なファゴサイトーシスに特異的にRab35が寄与していることを見出した。Rab35は、ファゴサイトーシスの初期および後期の2面的に関与していた。さらに、後期過程であるファゴソーム成熟における物質輸送にRab35およびそのエフェクター分子であるMICAL-L1が寄与することを明らかにした。これらの結果は、Fc-gamma依存性ファゴサイトーシスにおける受容体のリサイクリングあるいは抗原提示にRab35/MICAL-L1が関与することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Phagocytosis has a crucial role in immune defense and development. In this study, using multicolor living cell imaging, it is found that Rab35 is involved in Fc-gamma receptor mediated phagocytosis. Rab35 is localized in phagocytic cup and maturing phagosome. In maturing phagosome, Rab35 and its effector molecule, MICAL-L1 are budding from phagosome as tubular structures. These results suggest that Rab35/ MICAL-L1 play roles in receptor recycling or antigen presentation in Fc-gamma mediated phagocytosis.

研究分野：組織解剖学、細胞生物学

科研費の分科・細目：解剖学一般

キーワード：ファゴサイトーシス Rabタンパク質 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ等の食細胞は、病原菌や外来異物といった非自己因子の貪食による除去と、それに続く、貪食異物の分解、主要組織適合性因子への抗原提示を介して、生体防御において非常に重要な役割を果たしている。また、自己因子であるアポトーシス細胞の貪食にも関わっており、生体恒常性の維持や発生学的観点からも非常に重要な役割を果たしている。

現在までに、貪食ターゲットの性状の違いにより、異なる受容体を介した細胞内情報伝達機構が惹起される事が報告されている。これにより、形態的、機能的に異なるファゴソームの形成や成熟、それに伴う、貪食ターゲットの分解、抗原提示への移行が制御されてい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。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果、独自のイメージング解析技術を生かし、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、成熟過程における細胞内情報伝達の活性化と細胞形態変化の相関関係の解明を目指す。特に、ファゴソーム形成、成熟過程において重要な細胞内小胞輸送やアクチン骨格調節に焦点をあて、これらの事象において重要な役割を果たす低分子量 GTPase を中心に解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と遺伝子導入

細胞: RAW264 マクロファージ (理研細胞バンク) を、10%ウシ胎児血清を加えたダルベッコ変法イーグル培地にて 37 °C、5% CO₂ 環境下で培養した。RAW264 細胞への遺伝子導入には、neon nucleofection system (Life technologies 社)により核内へ plasmid DNA を導入した。細胞は、25 mm 径円形カバースリップ上に培養し、遺伝子導入後 12-24 時間後、カバースリップを Attofluor cell chamber (Life technologies 社)に組み入れ、Ringer's buffer (155 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 2 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, 0.5 mg/mL bovine serum albumin and 10 mM HEPES at pH7.2)を 0.5-1.0 mL 入れライブセルイメージに用いた。

(2) ファゴサイトーシス実験

様々な受容体を介したファゴサイトーシスの実験モデルとして以下の実験を行った。IgG コートしたラテックスビーズおよび IgG オプソニン化した赤血球 (Fc-gamma 受容体依存的ファゴサイトーシス)、未処理のビーズ (アポトーシス細胞のファゴサイトーシス)、C3 オプソニン化したザイモザン (補体受容体依存的ファゴサイトーシス)を貪食ターゲットとして使用した。

(3) 蛍光顕微鏡観察

蛍光タンパク質を融合した遺伝子産物を共

焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss 社) において観察を行った。特に、37 °C で細胞を生きたままの状態を経時的に観察するタイムラプス観察を重点的に用いた。

4. 研究成果

(1) 様々な貪食モデルにおける Rab35 の局在解析

これまでに Rab35 が Fc-gamma 受容体依存的なファゴサイトーシスにおいて機能していることを明らかにしていたが (Y. Egami *et al*, 2011)、Rab35 が他の貪食メカニズムにおいて関与するのかどうかをその局在性を調べることにより検討した。緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合した Rab35 を RAW264 細胞に発現させ、様々な貪食ターゲットの取り込みにおける Rab35 の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、Fc-gamma 受容体依存的および C3 受容体依存的取り込みでは、ファゴサイトカップにおける Rab35 の集積が観察されたのに対し、アポトーシス細胞の取り込みモデルであるコートしていないラテックスビーズの取り込みでは、ファゴサイトカップへの Rab35 の集積は見られなかった (図 1, 白色矢尻端)。また、Fc-gamma 受容体依存的取り込みでは、細胞内に取り込まれたファゴソーム上においても Rab35 の強い局在が観察されたが、アポトーシス細胞の取り込みモデルでは、そのような集積は見られなかった (図 1, 黄色矢尻端)。以上のことから、Rab35 は、特定のファゴサイトーシス (Fc-gamma 受容体および補体受容体を介したファゴサイトーシス) において積極的に取り込み初期 (カップ形成) および後期 (ファゴソーム成熟) に関与すると考えられた。

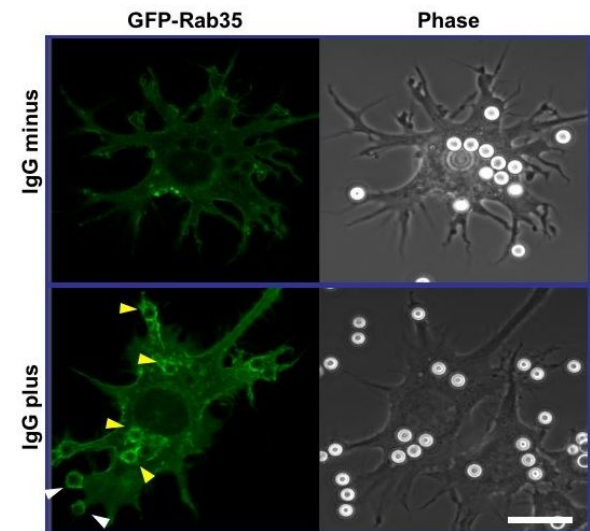


図 1. ビーズ取り込みにおける GFP-Rab35 の局在、上段: アポトーシス細胞貪食モデル、下段: Fc-gamma 受容体依存的貪食モデル、白色矢尻端: カップ形成時における Rab35 の集積。黄色矢尻端: ファゴソーム成熟時での Rab35 の集積、scale bar=10 μm

(2) Rab35 の取り込みへの影響

Rab35 が、取り込みの初期で貪食ターゲット依存的に関与していることを示すため、Rab35 を阻害した場合の貪食ターゲットごとの取り込みに対する影響について調べた。野生型の Rab35(GFP-Rab35-wt)およびドミナントネガティブ型の Rab35(GFP-Rab35-S22N)を発現した RAW264 細胞における、IgG コートしたビーズ(Fc-gamma 受容体)および未処理のビーズ(アポトーシス細胞モデル)に対する取り込みの量を比較した。その結果、IgG コートしたビーズの取り込みは、ドミナントネガティブ型の Rab35 を発現した細胞では抑制された(図 2, 青色棒グラフ)。一方、未処理のビーズの取り込みは、ドミナントネガティブ型の Rab35 発現によって影響を受けなかった(図 2, 赤色棒グラフ)。このことから、Rab35 はアポトーシス細胞の取り込みモデルにおいて、機能していないことが明らかとなった。

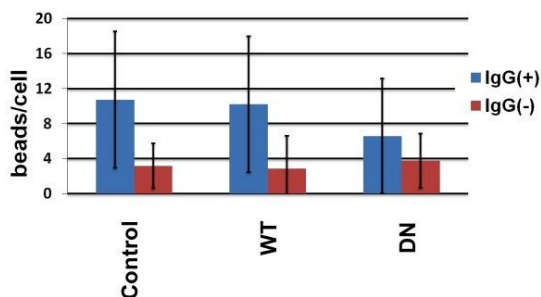


図 2. Rab35 ドミナントネガティブ変異体発現の貪食に対する影響、GFP-Rab35-wt あるいは GFP-Rab35-S22N 発現させた RAW264 細胞に IgG コートしたビーズあるいは未処理のビーズを加えた。

(3) Rab35 のファゴソーム成熟過程での局在

上記でしめしたように(1)、Rab35 は、Fc-gamma 受容体依存적取り込みにおいてカップ形成だけでなくファゴソームの成熟にも強く局在する。この成熟過程における Rab35 の挙動を詳しく解析するため、Rab35 のファゴソーム周辺での局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いたタイムラプス解析を行った。その結果、全てのファゴソーム上に Rab35 が分布しているのではなく、一部のファゴソームにのみ Rab35 が局在することが明らかとなった。しかしながら、この局在性の違いが何によるものなのかは不明である。また、Rab35 は、ファゴソーム上で一様に分布しているのではなくドット状の偏りを示した。さらに、ファゴソーム周辺の Rab35 のドット状の偏りの動きについて時間分解能を上げて解析を行ったところ、Rab35 が、ファゴソームの周囲から、ドット状あるいは管状の構造物として移動(出芽)していることが明らかとなった(図 3, 白色矢尻端)。Rab35 のファゴソームからの移動の方向は、主に、細胞の中央付近に向かっていった。これまでに

もいくつかの Rab タンパク質(Rab7、Rab8)が管状の膜構造を作ることが知られているが、Rab35 も同様の管状の構造物を作っていると考えられる。ファゴソームの成熟過程では、エンドソームやリソソームなど多くの膜構造物との融合および出芽を介した相互作用があると考えられているがその詳細は明らかになっていない。Rab35 が局在する管状の構造物もファゴソーム成熟過程の重要な段階に寄与していることが予想される。

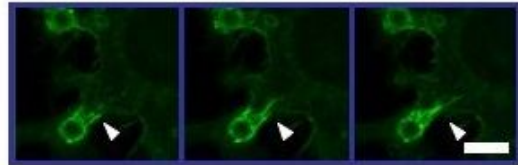


図 3. GFP-Rab35 のタイムラプス観察、ファゴソーム上に集積した GFP-Rab35 の挙動について 10 秒間隔で画像を取得(左から順に配置)、白色矢尻端は Rab35 の管状構造を示している。scale bar=10 μm

(4) Rab35 のエフェクター分子の局在

Rab35 は、他の低分子量 G タンパク質と同様に、GTP 結合型と GDP 結合型を行き来することで分子スイッチとして機能している。活性型である GTP 結合型の Rab35 を結合するエフェクター分子としてこれまでに報告されている MICAL1 および MICAL-L1 についてファゴサイトーシスへの関与について調べた。RAW264 細胞に赤色蛍光タンパク質融合 Rab35 (RFP-Rab35) と GFP-MICAL1 あるいは GFP-MICAL-L1 を共発現させ、ファゴソーム周辺の局在について解析を行った。その結果、GFP-MICAL1 は、ファゴソーム上に局在しなかった。一方、GFP-MICAL-L1 は、ファゴソームに局在が観察され、Rab35 と一致していた。さらに、GFP-MICAL-L1 は、Rab35 の管状の構造物と同様の移動を示した。

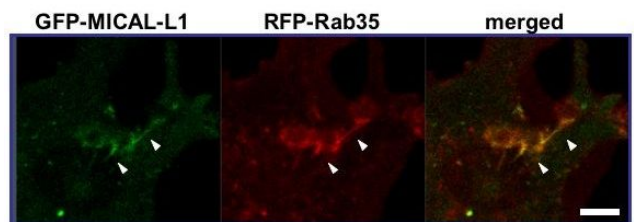


図 4. Rab35 と MICAL-1 の局在の比較、ファゴソームにおいて Rab35 (RFP) および MICAL-L1(GFP) は、共局在し、ファゴソームから管状の構造物として移動している(白色矢尻端)。scale bar=5 μm

(5) まとめ

近年、様々な受容体を介したファゴサイトーシスにおいて、それぞれ異なる分子機構が存在することが見出されてきている。本研究成果によって、新たに Fc-gamma 受容体および

補体受容体を介したファゴサイトーシス特異的に、Rab35 が寄与していることが明らかとなった。また、Rab35 がファゴソーム成熟時において、Rab35 のエフェクター分子の一つである MICAL-L1 と協同的に管状の構造物を介した物質の移動に関わることが示唆された。これらの結果は、受容体のリサイクリングあるいは抗原提示などファゴサイトーシス後期におこる事象の分子機構の解明につながることを期待される。

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 2 件)

Makoto Fujii, Katsuhisa Kawai, Youhei Egami & Nobukazu Araki, Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation、Scientific Report、査読有り 3 巻、(2013)、2385、doi: 10.1038/srep02385

Nobukazu Araki, Yuka Ikeda, Takuma Kato, Katsuhisa Kawai, Youhei Egami, Katsuya Miyake, Nobuhide Tsurumaki, and Mitsunari Yamaguchi, Development of an automated fluorescence microscopy system for photomanipulation of genetically encoded photoactivatable proteins (optogenetics) in live cells、Microscopy、査読有り、63 巻 (2014)、1093、doi: 10.1093/jmicro/dfu003

[学会発表](計 2 件)

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、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013, 3, 28 ~2013, 3, 30、サンポートホール高松・香川国際会議場(香川県)

川合 克久, 江上 洋平, 荒木 伸一、ファゴソ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, 3, 27 ~2014, 3, 29、自治医科大学(栃木県)、

[その他]

ホームページ等

香川大学医学部組織細胞生物学: URL:
<http://www.kms.ac.jp/%7Eanatomy2/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川合 克久 (Kawai Katsuhisa)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 80534510

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

荒木 伸一 (Araki Nobukazu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号: 10202748

三宅 克也 (Miyake Katusya)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号: 30219745

江上 洋平 (Egami Youhei)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 80432780