

## 学位論文の内容の要旨

専攻	医学	部門 (平成27年度以前入学者のみ記入)	
学籍番号	16D702	氏名	池田 結香
論文題目	Rac1 switching at the right time and location is essential for Fcγ receptor-mediated phagosome formation		
(論文要旨)			
<p>・背景と目的 Gタンパク質分子スイッチである Rac1 は、アクチン細胞骨格の再構築を制御することで葉状仮足の伸展や細胞移動などの細胞運動を司っている。また、生体防御で重要な Fcγ 受容体介在性ファゴサイトーシスにおいても Rac1 は必須の制御因子であることは知られているが、その過程における Rac1 ON/OFF スイッチングの意義は解明されていない。そこで本研究は、Rac1 変異体発現マクロファージのファゴサイトーシスを多角的に解析するとともに Rac1 活性の光制御によるファゴゾーム形成の顕微マニピュレーションを行うことで、Rac1 スwitch の ON と OFF それぞれの役割を明らかにしファゴゾーム形成の分子機構を解明することを目的とする。</p>			
<p>・方法 蛍光タンパク質融合野生型 Rac1, 不活性型 Rac1-T17N, 活性型 Rac1-Q61L 変異体を発現させた RAW264 マクロファージを用い、IgG オプソニン化赤血球 (IgG-Es) を食食ターゲットとした定量アッセイ、ライブセイメージングによる動画解析、F-actin の蛍光染色、抗リン酸化ミオシン軽鎖抗体での免疫蛍光法、走査電顕による微細構造観察などを行いファゴゾーム形成過程における Rac1 の活性化・不活性化のもたらす影響を解析した。さらに、photoactivatable Rac1 を発現させた RAW264 細胞を用い、我々が開発したオプトジェネティクス蛍光顕微鏡で Rac1 活性の光制御を行いながらファゴゾーム形成の顕微鏡下マニピュレーションを行った。また Rac1 の活性化状態を可視化するために、FRET イメージングを行った。</p>			
<p>・結果 IgG-Es の定量解析により不活性型 Rac1-T17N と同様に、活性型 Rac1-Q61L の発現も、IgG-Es の取り込みを阻害することが分かった。活性型 Rac1 発現細胞のライブイメージングや走査電子顕微鏡観察では、細胞表面に結合した IgG-Es の周りに葉状仮足の形成は認めるものの IgG-Es を包み込むようなファゴサイティックカップ形成は観察されなかった。免疫蛍光顕微鏡観察では、カップ形成時みられるミオシン軽鎖のリン酸化が活性型 Rac1 発現で減少しており Rac1 活性化はミオシン II の抑制によりカップ形成を阻害することが示唆された。またオプトジェネティクスによる Rac1 活性の可逆的光制御により、Rac1 活性化は IgG-Es の周辺に仮足を伸ばす作用を示し、Rac1 の不活性化は伸ばした仮足を myosin II で輪状に収縮させることで IgG-Es をファゴサイティックカップに捕捉しファゴゾーム内へ取り込むことが示された。FRET イメージングによる Rac1 活性化状態の観察でもこれに一致する所見が得られた。</p>			

・考察

これまで、不活性型 Rac1 変異体発現や Rac1 ノックダウンでファゴサイトーシスが抑制されることから Rac1 の活性化が必要であることが知られていたが、今回の結果から、Rac1 活性化のみならず不活性化も重要な意義を持つことが明らかになった。我々の所見は、マクロファージがファゴサイトーシスを完遂するには、まず Rac1 の活性化がアクチン重合による仮足伸展のために必要とされ、さらにそれに続く Rac1 不活性化がミオシン II の収縮によるカップ形成に必要であることを示している。Rac1 の活性化は、エフェクター分子 PAK1 の活性化により WAVE から Arp2/3 を介してアクチン重合を引き起こし、仮足の先端部を伸展させると考えられる。しかしその部位では、Rac1/PAK1 活性化が RhoA を抑制するため MLCK によるミオシン軽鎖のリン酸化は起こらない。伸長した仮足ではその基部から Rac1 が不活性化し MLCK 活性化により myosin II が輪状収縮を起こして食食ターゲットを掴むファゴサイティックカップを形成する。カップが十分に伸長すると PI3K 依存性カップ閉鎖によりファゴソーム形成が完遂すると考えられる。これらの観点に基づき、Rac1 の ON/OFF が正確なタイミングと場所で起こることで仮足伸展からカップ形成、ファゴソーム完成にいたる“Rac1 スイッチング時空間制御モデル”を提唱した。このモデルは、細胞外液中にある食食ターゲット粒子を確実に捕捉し、粒子のみを選択的にファゴソーム内に取り込んで消化・分解するうえで重要であると考えられる。

掲載誌名	Journal of Cell Science	第130巻, 第15号
(公表予定) 掲載年月	2017年 8月	出版社(等)名 The Company of Biologists
Peer Review	<input checked="" type="radio"/> 有	<input type="radio"/> 無

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。