

学位論文審査の結果の要旨

令和 2 年 1 月 23 日

審査委員	主 査	上野 正樹 印		
	副主査	山本 融 (山本)		
	副主査	門脇 則光 (門脇)		
願 出 者	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			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)	

[要 旨]

【背景と目的】

Rac1 は、アクチン細胞骨格を制御することで葉状仮足の伸展などの細胞運動を司っている。また、生体防御の最前線で重要な Fcγ レセプター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 スイッチの ON/OFF の意義は解明されていない。本研究は、Rac1 変異体発現細胞のファゴサイトーシスを多角的に解析するとともに Rac1 活性の光制御によりファゴソーム形成を再現することで、Rac1 スイッチの ON と OFF それぞれの役割を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

蛍光タンパク質融合野生型 Rac1, 不活性型 Rac1, 活性型 Rac1 変異体を発現させた RAW264 マクロファージ様細胞において 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ソ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。Rac1 の活性化状態を可視化するには FRET イメージングを用いた。さらに、オプトジェネティクスによる Rac1 活性の顕微鏡下光制御を行った。

【結果】

定量解析により不活性型と同様に、活性型 Rac1 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、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 を包み込むようなカップ形成は観察されなかった。免疫蛍光観察では、ミオシン軽鎖のリン酸化が活性型 Rac1 発現で減少していることが分かった。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 周辺に仮足を伸ばす作用を示し、Rac1 不活性化は伸ばした仮足を輪状に収縮させることで IgG-Es をカップに捕捉し

ファゴゾーム内へ取り込むことが示された。FRET イメージングでもこれに一致する Rac1 活性化が確認された。

【考察と結論】

ファゴゾーム形成では、まず Rac1 の活性化が PAK 1 を活性化し、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 MLCK を抑制し myosin 軽鎖のリン酸化は起こらない。伸長した仮足の基部から Rac1 が不活性化することで MLCK が活性化し 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。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、ファゴゾーム完成に至る“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ゾーム内に取り込み消化分解するうえで重要なメカニズムであると考えられる。

令和2年1月23日に行われた学位論文審査委員会においては、RAW264細胞の特性や細胞間での普遍性、Rac1を制御する機構、マクロパイノサイトーシスの場合との相違点などについて多数の質問が行われたが、それぞれに対し適切な回答が得られた。

本研究は、ファゴゾーム形成過程を様々な技法により多角的に解析し、その結果から新しいファゴゾーム形成の分子基盤モデルを確立したものであり、学術的価値が高い。よって、委員会の合議により博士（医学）の学位論文に十分値するものと判定した。

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

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。