

Title	OPPOSITE EFFECTS OF RHO FAMILY GTPASES ON ENGULFMENT OF APOPTOTIC CELLS BY MACROPHAGES
Author(s)	仲矢, 道雄
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46298
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	仲 矢 道 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20086 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	OPPOSITE EFFECTS OF RHO FAMILY GTPASES ON ENGLUFMENT OF APOPTOTIC CELLS BY MACROPHAGES (マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食における RHO ファミリータンパク質の効果)
論文審査委員	(主査) 教授 長田 重一 (副査) 教授 高井 義美 教授 松田 道行

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

生体内でアポトーシスをおこした細胞はマクロファージなどの貪食細胞によって速やかに貪食、処理される。貪食細胞は生きた細胞は貪食せず、死細胞のみを特異的に貪食することから、貪食の過程においては死細胞側から自身の貪食を促すようないわゆる“eat-me”シグナルが提示され、そのシグナルを貪食細胞が受け取って貪食が実行されると考えられている。しかしながら、そのようなシグナル、あるいはそのシグナルを受け取るレセプター、その下流の分子の実体は依然として未知の部分が多い。そこで本研究では貪食能の亢進を指標にした発現スクリーニング法によってアポトーシス細胞の貪食に関与する分子を同定し、その役割を解析することを目的とした。

[方法ならびに成績]

まず、マウス BAM3 マクロファージから作製した cDNA library をレトロウイルスベクターに挿入した後、cDNA library のプラスミドプール (約 50 plasmids/pool) を 700 pool 作成した。その後、パッケージング細胞を用いてそれぞれのウイルスを産生させ、それらを NIH3T3 細胞に感染させ、その感染 NIH3T3 細胞に蛍光標識したアポトーシス細胞を加えて一定時間貪食させた。貪食されなかったアポトーシス細胞を十分洗浄した後、蛍光の取り込みを FACS を用いて定量した。蛍光の取り込みを増加させるような DNA pool を選別し、それら pool を 2nd, 3rd screening でさらに規模を小さくしていくことにより最終的に貪食を亢進させるような clone を同定した。そのうち 2 つの clone はそれぞれ Rab5 と RhoG の全長を含んでいた。そこで、Rab5、RhoG および、他の代表的な Rho family 分子 (Rac1、Cdc42、RhoA) を NIH3T3 細胞、および骨髄由来マクロファージに発現させ、それら分子のアポトース細胞貪食における役割を検討した。その結果、これら 2 種類の貪食細胞において Rac1 を過剰発現させると Rab5、RhoG の場合と同様に貪食が顕著に亢進した。これに対し、RhoA を発現させると貪食能は減少したが、Cdc42 を発現させても貪食能に変化は認められなかった。次に上記 5 分子の dominant negative form を貪食細胞に発現させ、それらの貪食に対する効果を調べた。その結果、Rac1 および Rab5 の dominant negative form を発現させると貪食能はほぼ完全に抑制され、貪食に Rac1、Rab5 が必須であることが示された。また、RhoG の dominant negative form の発現も

食食能を3割以上阻害し、食食を正に制御することが明らかになった。一方、RhoAの dominant negative form を発現させると食食能は亢進し、RhoAは食食を負に制御していると考えられた。

MFG-E8はアポトーシス細胞表面に露出される有力な“eat-me”シグナル、フォスファチジルセリンと食食細胞上のインテグリン分子との橋渡しをして食食を促進する分子である。一方、RhoGは神経の伸展や細胞の運動などにおいてインテグリンの下流に存在し、Rac1の活性を制御することが報告されている。そこで、RhoGおよびRac1がMFG-E8-インテグリンを介した食食の経路に関与する可能性を検討した。インテグリンを発現させたNIH3T3細胞にMFG-E8存在下でアポトーシス細胞を食食させると食食能はMFG-E8非存在下の場合に比べ約5倍上昇する。しかしその細胞にRhoGの dominant negative form を発現させて食食を行わせると、その食食能は劇的に減少しほぼMFG-E8非存在下の場合のそれと同程度になった。また、Rac1の dominant negative form を発現させると食食能はほぼ完全に抑制された。以上の結果より、RhoGおよびRac1はMFG-E8-インテグリン依存的食食経路に関与している可能性が示唆された。

[総 括]

アポトーシス細胞の食食に関与する分子を同定するためにレトロウイルスを用いた発現スクリーニング系を構築し、2種の低分子量Gタンパク質、Rab5、RhoGが食食に関与する事を見出した。また、他の低分子量Gタンパク質(Rac1、Cdc42、RhoA)の食食における役割についても解析し、Rac1、RhoG、Rab5が食食を正に、RhoAが食食を負に制御する事を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

マクロファージなどによるアポトーシス細胞の効率的な食食は生体の恒常性を保つ上で重要である。申請者はアポトーシス細胞の食食に関わる分子を同定するためにレトロウイルスを用いた発現スクリーニングを行った。その結果、RhoGとRab5の2種類の低分子量Gタンパク質が食食を促進することを見出した。RhoGはRho familyに属する分子であることから申請者はRab5、RhoGのみならずRho familyに属する分子で、RhoGに構造が類似したRho familyの代表的分子、Rac1、Cdc42、RhoAに関してもアポトーシス細胞の食食における役割を検討した。その結果、食食能を持つNIH3T3細胞、およびマクロファージの両方の細胞において、同じRho familyに属する分子であってもRac1、RhoGはアポトーシス細胞の食食を正に、逆にRhoAは食食を負に抑制することを見出した。さらにRab5も食食を正に制御する事を明らかにした。以上、本研究は、アポトーシス細胞の食食時に低分子量Gタンパク質が協調的に働く事の重要性を示しており学位論文に値する。