



Title	Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation
Author(s)	北野, 正寛
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49808
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

		【17】			
氏 名		北	野	正	寛
博士の専攻分野の名称		博 士（医 学）			
学 位 記 番 号		第 2 2 4 5 7 号			
学 位 授 与 年 月 日		平 成 20 年 9 月 25 日			
学 位 授 与 の 要 件		学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻			
学 位 論 文 名		Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation (Rab5 活性のイメージングにより同定されたファゴソーム成熟に必須の制御因子)			
論 文 審 査 委 員		(主査) 教 授 高倉 伸幸 (副査) 教 授 岡田 雅人 教 授 米田 悦啓			

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

生体内では、不要になった細胞や発癌シグナルが入った細胞はアポトーシスによって除去される。アポトーシスを起こした細胞は、まず、マクロファージ等によって速やかに食食され、細胞内のファゴソームと呼ばれる巨大小胞に封じ込められる。このファゴソームはついで分解酵素を含有するリソソームと融合し、その結果、死細胞は消化される（ファゴソームの成熟）。この一連の流れは生体内の恒常性を保つ上で必須であり、多くの研究がなされている。しかし、アポトーシスの誘導過程が詳細に解明されつつあるのに比較し、アポトーシス細胞の食食過程には、未だ不明の点が多い。

本研究で対象とする Rab5 は、細胞内小胞輸送を制御する Rab ファミリー低分子量G蛋白質群の一員であり、GDP 結合型の不活性化状態と GTP 結合型の活性化状態をもつバイナリスイッチとして知られている。これまでに長田重一教授らのグループにより、機能不全型の Rab5 が食食細胞にてファゴソームの成熟を阻害することから、Rab5 がアポトーシス細胞の食食に必要なことは明らかにされていた。しかし、

ファゴソームが成熟する過程における「どこかの段階」で Rab5 が重要な役割を果たしていることはわかるものの、食食というダイナミックな過程において、Rab5 が「いつ、どこで」活性化や不活性化を受けるのか、また、その活性変化を制御する分子メカニズムは何なのかという疑問に対する答えは依然として不明であった。そこで本研究では蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理に基づくバイオセンサー、Raichu-Rab5 を作製し、食食過程における Rab5 の活性変化を生きた食食細胞内でビデオ画像化するという世界初の試みを行った。

〔 方法ならびに成績 〕

まず、Rab5 の活性変化を生細胞内でモニターするバイオセンサー、Raichu-Rab5 を、PCR 法を用いた遺伝子組み換えにより作製した。この分子は、黄色蛍光蛋白質 (YFP)、EEA1 蛋白の Rab5 結合ドメイン (RBD)、シアン蛍光蛋白質 (CFP)、Rab5 の4つの蛋白質を直鎖状につなげたものである。このバイオセンサーは Rab5 が活性化状態となると、分子内構造変化により CFP と YFP が近接して FRET を引き起こし、その結果 CFP を励起した際に発せられる蛍光がシアン色から黄色へとシフトするように設計されている。

この Raichu-Rab5 をマクロファージあるいは線維芽細胞内に導入し、胸腺アポトーシス細胞の食食過程における Rab5 の活性変化をタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、アポトーシス細胞がファゴソームに取り込まれたのちに、Rab5 の活性がファゴソーム膜上で一過的に上昇する様子がビデオ画像化できた。この Rab5 活性の時間変化は観察するファゴソームごとに様々であり、約3割のファゴソームにおいては、Rab5 の突発的な活性化と不活性化が繰り返される「点滅現象」が観察された。一方、申請者らは長田教授らとの共同研究で、アクチン繊維がファゴソーム膜周囲に一過的に集積と解離を行うことを観察していた。そこで、アクチン繊維と Rab5 活性とを同時に可視化したところ、Rab5 の活性化は、集積したアクチン繊維がファゴソームから解離していくのに引き続いて起きることを見出した。さらに種々の阻害剤を用いた実験の過程で、ノコダゾールによる微小管の脱重合が、ファゴソームにおける Rab5 活性化が阻害することを発見した。逆に、パクリタキセル処理による微小管の脱重合阻害では、Rab5 活性化は観察されるが、活性の点滅現象が消失した。このことから、微小管上に存在する活性化因子 (GEF) が Rab5 の活性制御を担っているのではないかと考え、様々な Rab5 活性化因子の量を RNA 干渉にて減少させたところ、その中の一つ Gapex-5 がファゴソームにおける Rab5 の活性化を制御すること、および、Gapex-5 が微小管結合蛋白 EB1 と会合し、それにより微小管上へ運ばれることを発見した。

〔 総括 〕

以上の結果から示唆される食食過程の分子メカニズムは以下の通りである。(1) 一過的に集積したアクチン繊維が解離する。(2) これにより微小管が食食部位に接近できるようになる。(3) 微小管上の Gapex-5 がファゴソーム上のRab5を活性化する。(4) Rab5 の活性化がファゴソームの成熟を誘導する。このモデルでは、重合・カタストロフを繰り返してダイナミックに伸縮する微小管とファゴソームとの断続的な結合・解離が Rab5 活性の点滅現象を引き起こすと考えられ、微小管脱重合阻害時にこの点滅現象が見られないという現象がよく理解できる。さらにこの過程において Rab5 の活性化は Gapex-5 が担うという事実も明らかとなり、Rab5 の活性変化を世界で初めて可視化するという技術的進歩が、これまで謎に包まれていた食食過程の分子メカニズムの一端を明らかにしたといえよう。

論文審査の結果の要旨

当該論文では、蛍光共鳴エネルギー移動の原理を用いた新規バイオセンサーが開発され、死細胞の食食過程において重要な役割を果たす低分子量G蛋白質Rab5の、食食部位における活性変化が世界で初めてライブ画像化された。その結果、死細胞が取り込まれた直後に食食部位においてRab5の一過的な活性化がおこり、それに引き続き死細胞の消化が起こるという一連の流れが明らかとなった。このバイオセンサーによるRab5活性変化の可視化技術を、RNA干渉法によるスクリーニングに組み込んだ実験により、食食の進行に必須のRab5活性化因子Gapex-5が同定された。さらにGapex-5と微小管との相互作用が見出され、死細胞食食過程は微小管のダイナミクスにより制御されていることが明らかとなった。身体の恒常性を維持する上で死細胞の食食作用は必須であり、そのメカニズムの一端を解明した当該論文が医学生物学の進歩に与えた影響は大きいと言える。以上より、当該論文を学位に値するものと認める。