Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

# Rab27a Negatively Regulates Phagocytosis by Prolongation of the Actin-coating Stage around Phagosomes

横山, 邦雄

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2011-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5204
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005204

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 横山　邦雄 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） |
| 学　位　記　番　号 | 博い第 5204 号 |
| 学位授与の　要　件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 学位授与の　日　付 | 平成 23 年 3 月 25 日 |

【 学位論文題目 】

Rab27a Negatively Regulates Phagocytosis by Prolongation of the Actin-coating Stage around Phagosomes(F-アクチン崩壊プロセスの調節を介した Rab27a による食作用制御機構の解析)

審　査　委　員

主　査　　教　授　中村　俊一

教　授　匂坂　敏朗

教　授　古瀬　幹夫

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

# Rab27a Negatively Regulates Phagocytosis by Prolongation of the Actin-coating Stage around Phagosomes

F-アクチン崩壊プロセスの調節を介したRab27aによる食作用制御機構の解析

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
食道胃腸外科学
（指導教員：黒田大介　准教授）

横　山　　邦　雄

Rab27aは、低分子量G蛋白質の中でもRab-familyに属し、メラノサイトやT細胞における分泌顆粒の放出にかかわっている。Rab27aの変異は、Griscelli症候群type2の原因となり、血球貪食症候群という調節不能なマクロファージの活性化を誘導する事が知られている。しかしながら、貪食におけるRab27aの役割はまだ明らかにされていない。本研究では、病原体の貪食モデルとして、マクロファージ用に分化したヒト白血病細胞株HL60細胞と補体活性化成分C3biによりオプソナイズされたSaccharomyces cerevisiaeの死菌（C3bi-ザイモザン）を用いて、Rab27aの食作用における機能について検討した。

その結果、Rab27aが、マクロファージにおいて、ファゴゾームの形成過程でおこる、F-アクチンの再構築、とりわけ崩壊のプロセスを調節することにより補体依存性の食作用を抑制的に制御していることを見いだした。

まず、ウエスタン(またはイムノ）ブロット法により、HL60細胞、マクロファージ様に分化したHL60細胞、ヒト末梢血より分離した単球においてRab27aが発現していることを確認した（Fig.1A)。次に、マクロファージ様に分化したHL60細胞とC3bi-ザイモザンを用いて、補体依存性の貪食が起こっている際のRab27aの細胞内局在を解析した。Rab27aはC3bi-ザイモザンを囲むファゴゾームの周りに集積しており、補体依存性貪食の初期段階と関連していることが示唆された(Fig.1B)　。

貪食におけるRab27aの役割を解明するため、レンチウイルスシステムを用いてHL60細胞にshRNA-Rab27aを導入し、Rab27aノックダウン細胞（shRNA-Rab27a/HL）を作製した。shRNA-Rab27aの導入により、HL60細胞におけるRab27aの発現量は大幅に減少した（clone1で80%、clone2で82%減少)。また、Rab27aノックダウンの効果を確認するため、shRNA-Rab27a/HL細胞へ、　Flag-タグ付きRab27aを再導入した（Fig.1C)。さらに、フローサイトメトリーにより、補体レセプター3、(CR3）の細胞表面の発現量が、分化後のHL60細胞、shRNA-Rab27a/HL細胞、rescue-shRNA-Rab27a/HL細胞において変化していない事を確認した。

そこで、蛍光ラベルしたザイモサンを用いて貪食活性におけるRab27aの影響を検討した。shRNA-Rab27aの導入によりC3bi-ザイモサンの貪食は亢進し、さらにrescue-Rab27aの導入により、貪食活性は元に戻った（Fig.2A, Fig.2B)。これらの結果により、Rab27aがマクロファージ様に分化したHL60細胞の補体依存性貪食を抑制していることが示唆された。

Rab27aのノックダウンが食作用を亢進する機構を明らかにするため、食作用におけるF-アクチンの再構築機構に着目した。蛍光顕微鏡を用い、HL60細胞の補体依存性貪食過程におけるF-アクチンの変化を経時的に追跡した。具体的には、補体依存性貪食の開始10分後、細胞と結合していないC3bi-ザイモサンを除去して、細胞培養を継続し、一定時間の経過後に、F-アクチンの集積状況を解析した。除去直後では、F-アクチンがザイモサン接触部位に集積している様子が検出された。(Fig.3A a)　除去後、10分、20分という時間経過とともに、ザイモサンの周りをF-アクチンが半球状に囲った構造（アクチンカップ）(Fig.3A b)や、球状に

囲った構造であるアクチンコート(Fig3A c)が増加した。時に球形のアクチンコートが斑点状に不均一になっている様子が観察された（Fig.3A d)。完全に取り込まれた phagosome の周りでは、F-アクチンは既に崩壊しており認められなかった。(Fig.3A e)。貪食過程におけるアクチン再構築への Rab27a ノックダウンの効果を評価するため、ザイモサン粒子の周りの F-アクチン構造を、アクチン再構築の段階により 5 カテゴリーに分類し、HL60 細胞と shRNA-Rab27a/HL 細胞で比較検討した。shRNA-Rab27a/HL 細胞では、F-アクチンは急速に崩壊（または分解）し、F-アクチンにより囲まれている時間が短くなり、その結果、ザイモサンは効果的に取り込まれた。加えて、斑点状の F-アクチンの出現率は HL60 細胞に比較して有意に高かった（Fig.3B)。 これらの結果より、Rab27a ノックダウン細胞においては、F-アクチンの再構築、とりわけ、重合後の崩壊の促進が貪食の著明な増加を引き起こしていることが示唆された。

また、F-アクチンは貪食におけるファゴゾームとリソソームの融合にも重要な役割を担うため、ファゴゾームとリソソームが融合する速度への Rab27a ノックダウンの効果をリソソーム膜のマーカーであるリソソーム関連膜蛋白(Lamp-1)を指標に評価した（Fig.4)。リソソームとファゴゾームの融合の割合は、洗浄後 1 時間では Rab27a ノックダウン細胞において HL60 細胞より有意に高かったが、洗浄後 2 時間では有意差を認めなかった。Rab27a ノックダウン細胞における 1 時間後の急速な融合については、急速な F-アクチンの崩壊によるファゴゾーム形成プロセスの促進を反映している可能性がある。

さらに、Rab27a が食作用において、F-アクチンの崩壊時期を調節する分子機構を解明するため、補体依存性貪食における Rab27a の下流伝達分子について検討した。F-アクチンの動態はアクチン結合タンパク質により調節され、かつ、アクチン結合タンパク質の多くがホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸(PIP2)によって調節されていることが知られている。そこで、アクチン結合タンパク質一つであり、すでに食作用への関与が報告されている Coronin1A に注目した。ウエスタン(またはイムノ）ブロット法により HL60 細胞と Rab27a ノックダウン細胞における Coronin1A の発現レベルを確認した（Fig.5A)。次に、補体依存性食作用における Coronin1A の細胞内局在変化を F-アクチンと比較しつつ解析検討した (Fig.5B)。洗浄 10 分後では、ザイモサンは F-アクチンのみに包まれているか(a)、または Coronin1A と F-アクチン両方で線状に包まれていた(b)。洗浄 30 分後では、ザイモサン周りの Coronin1A と F-アクチンの斑点状の共局在が増加(c)、さらに細胞内の phagosome では、ザイモサンの周りには Coronin1A も F-アクチンも観察されなかった(d)。これらの結果より、phagosome が形成される際に、F-アクチンの集積と重合によるアクチンコートが先に起こり、引き続いて Coronin1A が集積し、最終的にファゴゾームが形成されて細胞内に取り込まれる段階で F-アクチンが消失するプロセスが示唆された。

Rab27a が Coronin1A の集積に関与しているかどうかを評価するため、ザイモサン周囲の Coronin1A と Rab27a の共局在パターンを 5 段階に分類した（Fig.5C)。 Rab27A のノックダウンにより、洗浄 10 分後の Coronin1A と F-アクチンの斑点状の共局在パターンが増加し、洗浄 30 分後の取り込みが著明に増加していた。これらの結果より、Rab27A ノックダウン細胞における Coronin1A の急速な集積が、急速な F-アクチンの崩壊を誘導し、その結果、貪食を加速させると考えた。

最後に、phagosome 形成と Coronin1A の集積における Rab27a-GTPase 活性の効果を調べるため、Flag-rescue-Rab27a(wild-type)、Flag-Rab27a-T23N(GDP-bound form)、Flag-Rab27a-Q78L(GTP-bound form)を一過性に Rab27a ノックダウン細胞に導入した。shRNA-Rab27a/HL 細胞に比較して、wild-type Rab27a と Rab27a-Q78L を導入した細胞において貪食は減弱し、逆に、Rab27a-T23N 表現細胞では貪食は通常、あるいはさらに強まり (Fig.5D left)、さらに phagosome 周囲の Coronin1A の集積も増強した。(Fig.5D right, Supplemental Figure1） 加えて、shRNA-Coronin1A の導入により、貪食におけるアクチンコーティングの段階が長くなることを確認した。(Supplemental Figure2） これらは、GTP-結合型 Rab27a から GDP-結合型 Rab27a への転換が Coronin1A による F-アクチンの分離を促進することを示唆している。

結論として、我々は、Rab27a が補体依存性の食作用において、Coronin1A による F-アクチンの崩壊プロセスを調節することにより、ファゴゾーム形成過程におけるアクチンコートの段階を延長して、食作用を抑制的に制御している事を見いだした。本研究は、Griscelli 症候群 type2 で認められる貪食亢進機構、さらに臍帯血移植などによる後天的な血球貪食の亢進機構の解明に寄与するものである。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|---|---|---|---|
| 受付番号 | 甲 第2171号 | 氏　名 | 横山邦雄 |
| 論文題目<br>Title of Dissertation | F-アクチン崩壊プロセスの調節を介したRab27aによる食作用制御機構の解析<br><br>Rab27a Negatively Regulates Phagocytosis by Prolongation of the Actin-coating Stage around Phagosomes | | |
| 審査委員<br>Examiner | 主　査 Chief Examiner 中村俊一<br>副　査 Vice-examiner 古瀬幹夫<br>副　査 Vice-examiner 匂坂敏朗 | | |

（要旨は1，000字～2，000字程度）

Rab27aは、低分子量G蛋白質の中でもRab-familyに属し、メラノサイトやT細胞における分泌顆粒の放出にかかわっている。Rab27aの変異は、Griscelli症候群type2の原因となることが知られている。本研究では、病原体の貪食モデルとして、マクロファージ様に分化したヒト白血病細胞株HL60細胞と補体活性化成分C3biによりオプソナイズされた出芽酵母の死菌（C3bi-ザイモザン）を用いて、Rab27aの食作用における機能について検討した。

マクロファージ様に分化したHL60細胞に於いて、補体依存性の貪食が起こっている際のRab27aの細胞内局在を解析したところ、Rab27aはC3bi-ザイモザンを囲むファゴソームの周りに集積しており、補体依存性貪食の初期段階と関連していることが示唆された。更に、shRNA-Rab27aの導入によりC3bi-ザイモサンの貪食は亢進し、さらにrescue-Rab27aの導入により、貪食活性は元に戻った。これらの結果により、Rab27aがマクロファージ様に分化したHL60細胞の補体依存性貪食を抑制していることが示唆された。また、補体依存性貪食の開始10分後、細胞と結合していないC3bi-ザイモサンを除去して、細胞培養を継続し、一定時間の経過後に、F-アクチンの集積状況を解析したところ、F-アクチンがザイモサン接触部位に集積している様子が検出された。また、Rab27aノックダウン細胞においては、F-アクチンの再構築、とりわけ、重合後の崩壊の促進が貪食の著明な増加を引き起こしていることが示唆された。

次に、アクチン結合タンパク質一つであり、すでに食作用への関与が報告されているCoronin1Aに注目し、イムノブロット法に

よりHL60細胞とRab27aノックダウン細胞におけるCoronin1Aの発現レベルを調べた結果、phagosomeが形成される際に、F-アクチンの集積と重合によるアクチンコートが先に起こり、引き続いてCoronin1Aが集積し、最終的にファゴゾームが形成されて細胞内に取り込まれる段階でF-アクチンが消失するプロセスが示唆された。これらの結果より、Rab27Aノックダウン細胞におけるCoronin1Aの急速な集積が、急速なF-アクチンの崩壊を誘導し、その結果、貪食を加速させると考えた。

最後に、shRNA-Rab27a/HL細胞に比較して、wild-type Rab27aとRab27a-Q78Lを導入した細胞において貪食は減弱し、逆に、Rab27a-T23N表現細胞では貪食は通常、あるいはさらに強まり (Fig.5D left)、さらにphagosome周囲のCoronin1Aの集積も増強した。結論として、申請者らは、Rab27aが補体依存性の食作用において、Coronin1AによるF-アクチンの崩壊プロセスを調節することにより、ファゴゾーム形成過程におけるアクチンコートの段階を延長して、食作用を抑制的に制御している事を見いだした。

本研究は、Rab27aが、マクロファージにおいて、ファゴゾームの形成過程でおこる、F-アクチンの崩壊のプロセスを調節することにより補体依存性の食作用を抑制的に制御していることを見いだしたものであり、貪食機構解明に重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。