

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Fc $\gamma$ 受容体を介した貪食作用のミオシン II による制御機構の解明**

氏 名 山内 翔太

### <序論>

細菌やウイルスといった病原微生物などの異物が体内に侵入すると、これを排除するためにさまざまな生体防御反応が誘導される。中でも食細胞 (= professional phagocyte) と称されるマクロファージなどの免疫細胞が、異物を細胞内へ取り込み、分解する作用は、その重要な一角を占める。特に直径 0.5 $\mu\text{m}$  を超える異物の取り込みは貪食 (= ファゴサイトーシス) と呼ばれており、食細胞は貪食作用を引き起こすために種々の受容体を発現している。これらの受容体は、異物に付着した血清由来タンパク質と結合するものと、異物の表面分子と結合するものの二種類に分けられる。前者を代表する受容体としては、免疫グロブリン G (IgG) に結合する Fc $\gamma$ 受容体がある。IgG に覆われた異物が食細胞と接触すると、Fc $\gamma$ 受容体は IgG の Fc 領域に結合し、集積する。その後、細胞膜が異物の一部を包み込みように伸展し、カップのような形状 (ファゴサイティックカップ) をとる。それに前後して受容体シグナルが活性化されることで、局所的なアクチン重合が惹起される。この新たに形成されたアクチンフィラメント (F-アクチン) が押し出す形でファゴサイティックカップが異物の表面に沿ってさらに伸展し、最終的にその全体を取り囲む。ファゴサイティックカップの閉塞に伴い、異物は細胞内に取り込まれ、分解される。

Fc $\gamma$ 受容体によるシグナル伝達は、 $\gamma$ 鎖 (FcR $\gamma$ ) のリン酸化によって開始される。FcR $\gamma$

は ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) と呼ばれる配列を細胞質領域に有しており、Src ファミリータンパク質がこの配列内の二つのチロシン残基をリン酸化する。このチロシン残基が、チロシンキナーゼ Syk の二つの SH2 ドメインと特異的に結合することで、Syk の活性化が誘導される。これまで、ノックアウトマウスなどの解析により、Fc $\gamma$ 受容体を介した貪食作用には Syk が不可欠であることが明らかにされている。免疫細胞の Src ファミリーキナーゼの活性制御では CD45 などの受容体型フォスファターゼが重要な役割を果たすことが知られている。

ミオシン II は、アクチンフィラメントを架橋し収縮作用を担うモータータンパク質で、細胞の分裂や遊走、また接着といった様々な機能に深く関わっている。古くからファゴサイティックカップにミオシン II が局在していることは知られているが、これらのミオシン II は軽鎖がリン酸化された活性型であること、この活性を阻害すると貪食の効率が低下することが近年になり報告されている。このように、ミオシン II の Fc $\gamma$ 受容体を介した貪食作用への関与は明らかにされているものの、その制御機構はわかっていない。そこで本研究ではこの機構の解明を試みた。

## <方法・結果>

はじめに RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞 (以下 RAW 細胞) の貪食作用にミオシン II が関与していることを確認するため、blebbistatin (ミオシン II ATPase 活性阻害剤) または ML-7 (ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤) 存在下で、IgG でオプソニン化したビーズ (以下 IgG ビーズ) の取り込みを比較した。予想通り、

これらの阻害剤で貪食作用は顕著に抑制された (図1)。

ファゴサイティックカップの伸展の駆動力は、主にアクチン重合により供給される。そこで次に、貪食時の F-アクチン動態を可視化するため、イノシトールトリリン酸3キナーゼA の F-アクチン結合領域 (アミノ酸9-40)

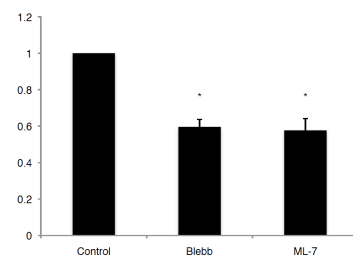
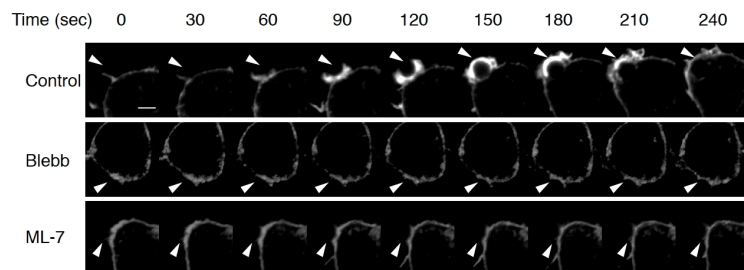


図1. Fc $\gamma$ Rを介した貪食にはミオシンII活性が必要である



矢印はビーズの位置, bar=3 $\mu$ m

図2. 貪食時のF-アクチンの集積にはミオシンII活性が必要である

と蛍光タンパク質tdTomatoの融合タンパク質 (F-Tractin-tdTomato) をRAW細胞に発現させ、共焦点顕微鏡で観察した。阻害剤無処理の細胞では、ビーズの接触位置でファゴサイティックカップが形成されるのに続き、F-アクチンの集積とそれに伴うファゴサイティックカップの伸展がみられた (図2、上段、90秒後)。この伸展の途中からファゴサイティックカップの底において、F-アクチンが離散し始めた (150秒後)。ビーズが細胞内に取り込まれた後は、F-アクチンの集積は検出されなかった (240秒後)。これに対し、ミオシンIIの阻害剤で処理した細胞では浅いファゴサイティックカップは形成されるが、F-actinの集積が抑制されていた (図2、中段・下段)。

Sykがアクチン重合を引き起こす過程へのミオシンIIの関与を検討した。Fcγ受容体IIAの細胞内ドメインをSykと置換したキメラタンパク質 (FcγRIIA-Syk) を内在性のFcγ受容体を持たないCOS-7細胞に発現させることで、IgGビーズの細胞内への取り込みを誘導させたときのミオシンIIの役割について解析した。F-アクチンの集積を蛍光色素で標識したファロイジンによる染色で調べたところ、阻害剤の有無にかかわらず、ビーズの周辺にはF-アクチンが集積することが示された (図3 A)。

一方、Sykのキナーゼ活性欠損変異体のキメラタンパク質 (FcγRIIA-Syk-K402R) を発現させた細胞では、キメラタンパク質はビーズの接触位置に集積するものの、F-アクチンの集積を伴わなかった (図3 B)。以上の結果から、Sykはキナーゼ活性依存的にF-アクチンの集積を促進すること、このF-アクチンの集積はミオシンIIに依存しないことが示された。

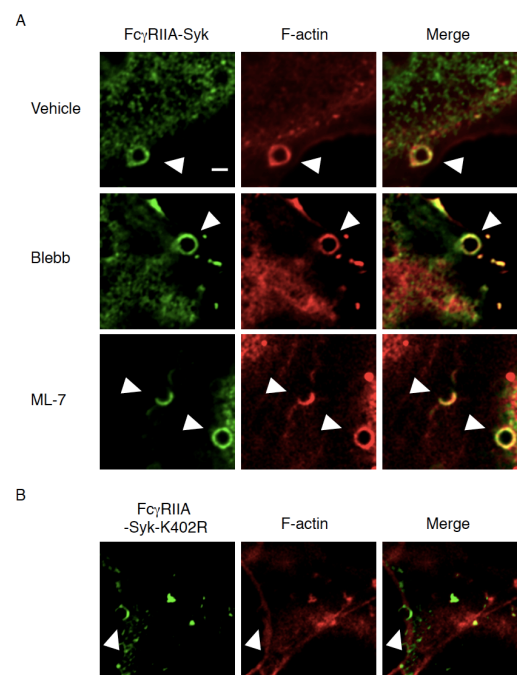


図3. SykによるF-アクチンの集積はミオシンII活性を要求しない

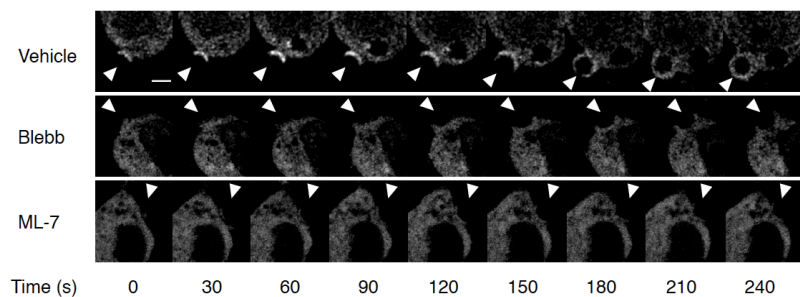


図4. Sykのファゴサイティックカップへの集積にはミオシンII活性が必要である

そこで、Sykのファゴサイティックカップへの集積に対するミオシンIIの関与を調べた。RAW細胞に、Syk-tdTomatoを発現させ、Sykの動態を可視化した。阻害剤無処理の細胞では、Sykはビーズの接触位置に集積し（～60秒後）、ファゴサイティックカップの閉塞に先立って離散し始めた（図4、上段）。このようなSykの集積はミオシンII阻害剤の存在下では抑制されていた（図4、中段・下段）。またSykとFcR $\gamma$ の会合を免疫沈降法により調べた結果、IgGビーズの刺激依存的にSykとFcR $\gamma$ は会合したが、この会合はミオシンII阻害剤により抑制された

（図5 A）。FcR $\gamma$ とSykの会合には、FcR $\gamma$ のITAMのチロシンリン酸化が必要である。このチロシンリン酸化に対するミオシンIIの関与を調べた。IgGビーズでFcR $\gamma$ のITAMのリン酸化は誘導されるが、これはミオシンIIの阻害剤で顕著に抑制されることが示され、ミオシンIIの活性が必要であることがわかった（図5 B）。

Fc $\gamma$ 受容体の集積がFcR $\gamma$ のリン酸化に必要であると考えられていることから、FcR $\gamma$ の細胞内分布を免疫蛍光で調べた。ミオシンII阻害剤の有無に関係なく、FcR $\gamma$ はIgGビーズとの接触位置に集積していた（図6）。

貪食受容体 Dectin-1 シグナルの活性化には CD45 などの受容体型フォスファターゼが標的粒子の接触位置から排除されることが必要である。Fc $\gamma$  受容体シグナルの活性化においても CD45 が同様に排除される可能性を検討した。CD45 の細胞内局在を免疫蛍光により調べたところ、CD45 は細胞膜上

にほぼ一様に発現していたが、IgG ビーズの接触位置からは排除されていた（図 7）。また、この場所にはチロシンリン酸化タンパク質が集積していることが確認された。この結果は Fc $\gamma$  受容体を介した貪食時にも、標的粒子の接触位置からの CD45 の排除が、受容体シグナルの活性化に必要である可能性を示唆している。

この CD45 の排除に対するミオシン II の寄与を免疫蛍光により調べた。阻害剤無処理の細胞ではビーズの接触位置に FcR $\gamma$  が集積し、CD45 は排除されていた（図 7）。これに対し、blebbistatin あるいは ML-7 で処理した細胞では FcR $\gamma$  はビーズの接触位置

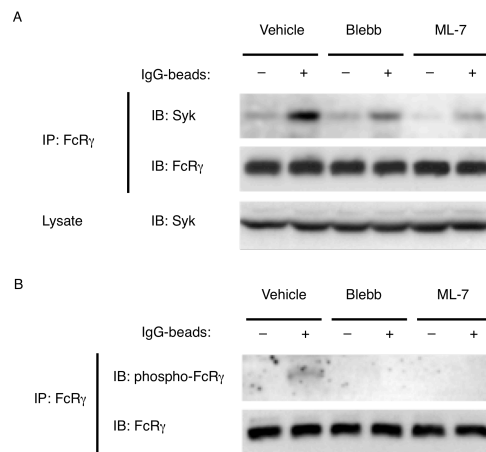


図5. Fc $\gamma$ 受容体シグナルの活性化にはミオシンII活性が必要である

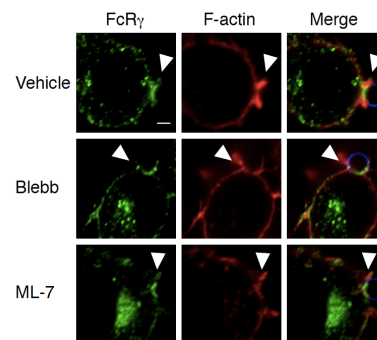


図6. Fc $\gamma$ 受容体のファゴサイティックカップへの集積はミオシンII活性を要求しない

に集積するものの、CD45は排除されずに留まっていた。これらの結果はCD45のビーズの接触位置からの排除はミオシンII活性に依存することを示している。

本研究ではミオシンIIがFcR $\gamma$ のリン酸化を促進することで、Sykのファゴサイティックカップへの集積とその下流で起こるF-アクチンの集積に寄与することが示された。また、標的粒子の接触位置へのFc $\gamma$ 受容体の集積はミオシンII活性非依存的に起こるが、受容体型フォスファターゼであるCD45の排除はミオシンII活性に依存することが分かった。これらの結果はミオシンIIによるFc $\gamma$ 受容体とCD45の隔離がFcR $\gamma$ のリン酸化と標的粒子の取り込みに必要であることを示すと考えられる。

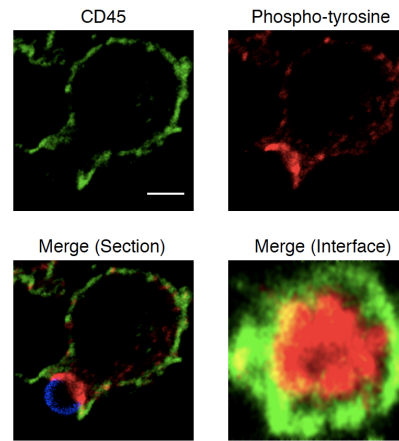


図7. Fc $\gamma$ 受容体を介した貪食では標的粒子の接触位置からCD45が排除される

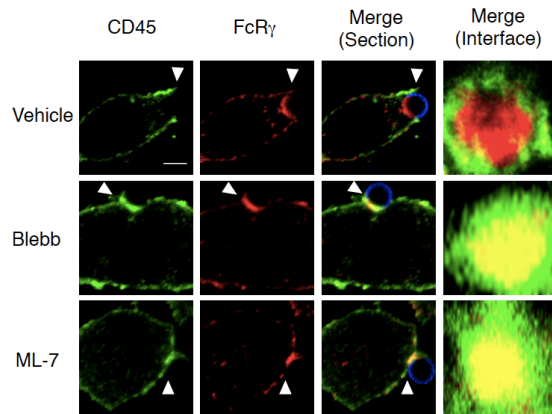


図8. CD45の排除にはミオシンII活性が必要である