

貪食細胞がアポトーシス細胞を取り込んで消化するようすを画像化

松田 道行

死んだ細胞やがん細胞などを飲み込んで掃除する貪食細胞（マクロファージ）の貪食作用については、関与する分子が明らかになりつつあるが、まだ謎が多い。京都大学大学院生命科学研究科の松田道行教授らのグループは、蛍光イメージングの手法によって、Rab5 という細胞にあるタンパク質が貪食作用のかぎとなることを明らかにした。Nature 2008 年 5 月 8 日号に掲載された、この研究の内容と意義を松田道行教授に聞いた。

貪食細胞の動きのかぎになるタンパク質を観察

Nature Digest — Nature オンラインにある論文の Supplementary Video では、貪食細胞がアポトーシス細胞を取り込むようすがよくわかります。この研究に至るまでの背景を教えてください。

松田 — この研究では、Rab5 という G タンパク質の活性を分子イメージングで見えています。Rab5 は細胞内にある G タンパク質で、細胞小胞輸送で重要な役割を果たしています¹。特に、細胞外から来た細胞増殖因子が受容体ごとに取り込まれるときやアポトーシス細胞を貪食細胞が飲み込むときに働くことがわかっています²。いずれの現象においても細胞内で小胞間の融合を開始させるスイッチの役割をしており、Rab5 の異常はある種の神経疾患などと関連があるとも考えられています。

私たちはこの Rab5 のオン・オフを見るプローブを開発し、マウスの貪食細胞がアポトーシス細胞を取り込む際の Rab5 活性の変化のようすをライブイメージングしました³。貪食細胞の細胞膜は、アポトーシス細胞などのエサを捕まえるときには細胞膜直下のアクチン骨格の重合に誘導されて、手を伸ばすように盛り上がってエサを取り込み、細胞内で食胞を形成します。この食胞は微小管に沿って輸送され、リソソームと

融合して、リソソームがもつ加水分解酵素によって消化されます。しかし、この貪食過程で、それらを制御する分子群がどのようなタイミングで働くかはわかっていませんでした。

貪食細胞にアポトーシス細胞のようなエサを入れても、そのエサが培養した貪食細胞に届くまでにはタイムラグがあり、よしんばすぐに届いたとしても一斉に食べ始めるわけではありません。そのため、貪食細胞の動きに重要な分子を特定しても、それが働くタイミングを生化学的に調べるのはむずかしかったのです。そこで、我々の研究が役立ちました。

ND — 具体的にはどのような技術を使っているのでしょうか？

松田 — イメージングの技術としては、2つの蛍光タンパク質を用いる FRET (fluorescence resonance energy transfer: 蛍光共鳴エネルギー移動)*を使っています。医学研究科博士課程在籍中の北野正寛君が Rab5 の活性を調べるプローブを 100 種類以上作り、その中から有望なプローブを選び出しました。ところが、これを使って細胞増殖因子が小胞に取り込まれる過程を観察したのですが、小胞があまりに小さいために光っている Rab5 を見分けることができなかったのです。そこで、5~10μm と通常の小胞の 100 倍程度の大きさである貪食細胞の食胞を見ることにしました。当時

Kitano M. et al. Nature 453, 241-245 (2008)

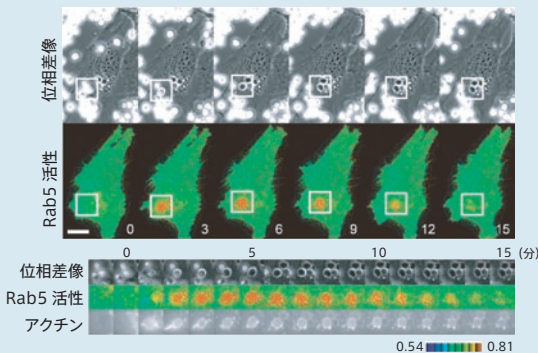


図1 アクチン骨格の消失と同時に活性化する Rab5。貪食細胞がアポトーシス細胞を取り込むところを位相差顕微鏡で観察し、そこに光学顕微鏡による蛍光イメージングを重ねると、アクチン骨格がアポトーシス細胞を包み込んだ瞬間(図の0分)の直後から Rab5 が活性化することがわかった。

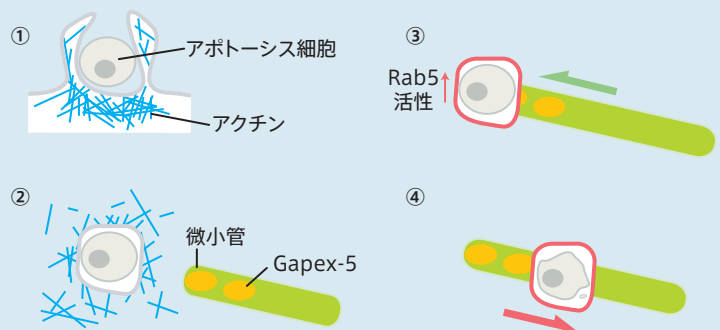


図2 貪食作用における Rab5 活性制御のシナリオ

- ① 食細胞の表面にアクチン骨格が伸び、アポトーシス細胞を取り囲む。
- ② アポトーシス細胞が取り込まれて食胞になり、アクチン骨格が壊れる。微小管が食胞に近づく。
- ③ 食胞に微小管がくっつき、微小管の先端にある Gapex-5 が Rab5 を活性化する。
- ④ 食胞が微小管に沿って動きながら成熟し、やがてリソソームと融合して崩壊する。

京都大学大学院 松田道行



松田道行（まつだ・みちゆき）／京都大学大学院生命科学研究所生体制御学教授、医学研究科病態生物学医学教授（兼任）。医学博士。1958年、鹿児島県生まれ。1983年、東京大学医学部卒業。1987年、東京大学大学院医学研究科を修了後、1988～90年に米国ロックフェラー大学留学。帰国後、国立予防衛生研究所、国立国際医療センターに勤務。2001年に大阪大学微生物研究所に移り、2006年から現職。

東京大学医学部在学中より、長い潜伏期を経て発症するスローウイルス感染症を病理学教室で研究。解剖検体の6割以上ががん患者であったことや代表的なスローウイルスであるJCウイルスがハムスターにがんを

引き起こしたことから、しだいに細胞がん化のメカニズムに興味をもつ。ロックフェラー大学では、がん遺伝子 *src* の発見者である花房秀三郎教授の下で、がん遺伝子を研究した。1990年には細胞増殖因子による細胞増殖においては、SH2ドメインがチロシン酸化依存性にタンパク質へ結合することを発見し、細胞増殖の情報伝達はタンパク質間の相互作用が鍵を握ることを突き止めた。がん遺伝子産物をはじめとする細胞増殖シグナル分子が、細胞内で情報を伝えるようすを時間的空間的に明らかにするために、生きている細胞での分子の機能イメージングに注力している。また、複雑な細胞の情報伝達をシミュレーションできる仮想空間の開発も進めている。

は、大阪大学微生物研究所におり、医学系研究科の長田重一教授（現・京都大学医学研究科教授）の協力を得て、アポトーシスを誘導した胸腺細胞を貪食細胞がどのように食べ、そのときに Rab5 がどうなるかを観察しました。すると、アポトーシス細胞を取り込むと周囲のアクチン骨格はすぐに消え、その直後に Rab5 が活性化し、20 分くらいすると活性がなくなりました（図 1）。また、Rab5 の変異体を入れて Rab5 の活性化を抑制するとアポトーシス細胞の消化が邪魔されることもわかりました。このことから、Rab5 は貪食細胞が不要な細胞を消化するときのかぎであることが明らかになったのです。

取り込まれたアポトーシス細胞が消化されるまでの過程も明らかに

ND — 飲み込んだアポトーシス細胞の処理に Rab5 はどのようにかかっていたのでしょうか。

松田 — 中に取り込まれたアポトーシス細胞が消化されるようすを酸性になると赤く光る pH センサーを加えて観察してみました。すると、Rab5 の活性が下がった後に赤くなる、つまり食胞が酸性になってアポトーシス細胞の消化が始まることわかりました。Rab5 の活性と食胞の pH は関係するという論文が出ており、それを画像で見ることができたわけです。

この食胞の消化の過程で、どのような Rab5 活性化因子が関与しているかも調べました。FRET イメージングを行うと黄色の光が点滅して見え、Rab5 は活性と不活性を繰り返しているのがわかります。その理由は、伸び縮みする性質をもつ微小管が伸びたときは、この上にある活性化因子が Rab5 にくっついて Rab5 が活性化され、微小管が短くなったときには活性化因子が離れて Rab5 の活性が落ちるのではないかと推測しました。試しに微小管の分解を止める薬を加えると Rab5 活性の点滅がなくなり、微小管をバラバラにする薬を入れると Rab5 はまったく活性化されませんでした。やはり微小管の伸縮と Rab5 の活性は関係していることがわかったのです。

ND — この結果が、食胞が消化される過程での Rab5 活性化因子の役割の発見につながったのですね。

松田 — ゲノムプロジェクトで Rab5 の活性化因子の種類や数は概ね明らかになっており、その因子を作り出す遺伝子を RNAi（RNA 干渉）の技術で 1 つずつ阻害して実験を繰り返したところ、Gapex-5 という因子が関係することがわかりました。そして、予想通り、Gapex-5 は微小管の先に乗って

たのです（図 2）。この研究から、アクチン骨格や食胞、微小管と Rab5 や Rab5 活性化因子 Gapex-5 の一連の働きが推測できるようになりました。今後、Rab5 や貪食細胞が関与する病気の原因究明や薬の開発にも使えるかもしれません。

分子イメージングを生かし、細胞の情報伝達をシミュレーションしたい

ND — これからはどのような研究をされるのでしょうか。

松田 — 食胞の内部が酸性になった後、Rab5 が別の G タンパク質 Rab7 に置き換わるという説を検証し、換わるのであれば、どのタイミングかを調べたいと考えています。そのため、Rab7 を見るプローブを作っています。また、当初からの目標である、細胞がん化メカニズムについても研究しています。例えば、がん遺伝子産物ががんの浸潤にいつどこで働くかについて、プローブを入れたり、2 光子レーザー顕微鏡を使ったりして、生きた組織、生きたマウスなどでイメージングを行っています。

私の夢は、こうした実験から集めたデータをパラメータ化してコンピューターに入れ、がん遺伝子の情報伝達のシミュレーションをすることです。完成すれば、抗がん剤の候補分子のスクリーニングや効果の予測にも使え、患者さんひとりひとりに応じたテーラーメイド医療につながります。抗がん剤は現在組み合わせる使用が主流ですが、そのためには単独の臨床試験と組み合わせによる臨床試験の両方が必須で、相当な数の患者さんの協力と膨大な時間が必要になります。このようなシミュレーションが小動物による前臨床試験のかわりになるくらいになればと。定年までの 15 年以内に完成させたいと考えています。

ND — ありがとうございます。 ■

聞き手は小島あゆみ（サイエンスライター）。

* FRET (fluorescence resonance energy transfer : 蛍光共鳴エネルギー移動) 光学顕微鏡では識別できないナノメートルレベルの距離を蛍光強度の変化で測定する方法。2 種類の蛍光タンパク質を含むプローブを目的物質に付け、片方の蛍光タンパク質に光を当てると、2 つの蛍光タンパク質の距離が近いときには、もう一方の蛍光タンパク質に光エネルギーが移動して光り、2 つの蛍光の量比が変わるのが見える。

1. Zerial, M. & McBride, H. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117 (2001)
2. Nakaya, M. et al. *J. Biol. Chem.* **281**, 8836-8842 (2006)
3. Kitano M. et al. *Nature* **453**, 241-245 (2008)