

# 論文内容要旨

マクロファージの食胞成熟における  
イノシトールリン脂質脱リン酸化酵素の役割

主指導教員：小澤 孝一郎 教授  
(医歯薬保健学研究科 治療薬効学)  
副指導教員：高野 幹久 教授  
(医歯薬保健学研究科 医療薬剤学)  
副指導教員：櫛木 薫 准教授  
(医歯薬保健学研究科 生理化学)

瀬川 智裕  
(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【序論】

イノシトールリン脂質群(PIPs)は他のリン脂質に比較して量的に少なく、代謝回転が速い。そのため、細胞膜の構築材料として以外の機能をもつことが古くから指摘されていた。PIPsの親水基は大きく複雑で負電荷を有するイノシトールである。このイノシトールの3位、4位、5位の水酸基が可逆的にリン酸化修飾されることで、PIPsには8種類が存在し、リン酸化酵素と脱リン酸化酵素によって相互に変換される。PIPsはそれぞれに特異的な標的タンパク質と結合し、その活性や細胞内局在を制御することで様々な細胞機能を制御している。

マクロファージは菌、異物、自己の死細胞や変性物質を貪食し消化することで生命の恒常性の維持に貢献する。また、取り込まれた異物の一部を抗原提示することで獲得免疫に繋げる。異物は細胞膜の伸展によって捕えられ、続いて膜の閉鎖によって食胞に封入される。食胞内はエンドソームとの融合によって次第に酸性化され、最終的に食胞とリソソームが融合するとリソソーム酵素によって異物の消化が完了する。このプロセスは食胞成熟と呼ばれ、標的を取り囲む膜上のイノシトールリン脂質(PIs)の交代によって進行すると考えられる。しかし、こうした反応に寄与するリン酸化、脱リン酸化酵素の詳細は不明である。その理由の一つとして、貪食の進行に伴う時空間的变化を導く酵素反応は試験管内酵素活性の測定だけでは説明できないことが挙げられる。また、一般的に血球細胞は遺伝子導入効率が低いことが知られており、分子生物学的手法の適用が困難である。

私の研究室では貪食活性が高いマクロファージ系培養細胞株 Raw264.7 細胞に対して、エレクトロポレーション法を基にした極めて効率的な遺伝子導入方法を開発した。この手法を用いて、各 PIPs に特異的な結合タンパク質を利用した蛍光プローブを Raw264.7 細胞に遺伝子導入することで、貪食時の食胞上の PIPs 変動を可視化することに成功した。さらに、PIPs 代謝酵素を欠損した細胞を網羅的に作製し、独自のセルバンクを構築することで、マクロファージの機能調節における PIPs 代謝酵素の役割を解明してきた。その中で私が担当したのは、主として 5 位脱リン酸化酵素の機能である。最初の論文では Inpp5e というあまり報告のなかった酵素についての新たな知見を公表した。第二の論文では、抑制性の  $Fc\gamma R(Fc\gamma RIIb)$  の下流で機能する SHIP という 5 位脱リン酸化酵素が、4 位脱リン酸化酵素 Inpp4a との連続的脱リン酸によって食胞の  $PtdIns(3,4,5)P_3$  を  $PtdIns(3)P$  へと代謝し、結果として食胞成熟を促進することを明らかにした。

## 【結果・考察】

1. Inpp5e は食胞で  $PI(3,4,5)P_3$  を増加させ、貪食を活性化する。

マクロファージがサイズの大きい異物を貪食する時、細胞膜の伸展が必須である。これは膜の  $PI(4,5)P_2$  がアクチン重合を促進することで実現される。この  $PI(4,5)P_2$  が  $PI(3)$  キナーゼによって  $PI(3,4,5)P_3$  へとリン酸化されると、アクチン重合は収束して異物を囲むカップが閉鎖する。従って、 $PI(3,4,5)P_3$  の集積は貪食を活性化する。Inpp5e は  $PI(3,4,5)P_3$  の 5 位脱リン酸化酵素の一つなので、これをノックダウンした細胞 (shInpp5e) ではコント

ロールと比べて貪食の増加が観察された。この時、食胞上では  $PI(3,4,5)P_3$  が増加し、 $PI(3,4)P_2$  の産生が抑制された。

2. **shInpp5e** では食胞の  $PI(3)P$  が減少する。

$PI(3,4,5)P_3$  は食胞上で連続的に脱リン酸化され、 $PI(3,4)P_2$  を経て  $PI(3)P$  へと変化する。**shInpp5e** では食胞の  $PI(3)P$  が極端に減少していた。しかし、**shInpp5e** と同程度に  $PI(3,4,5)P_3 \rightarrow PI(3,4)P_2$  が減っているはずの **shSHIP1** では  $PI(3)P$  の減少はほとんど認められなかった。

3. **shInpp5e** 細胞では低分子 GTP 結合タンパク質、**Rab5** の食胞へのリクルートが減少する。食胞で  $PI$  から  $PI(3)P$  を産生する酵素がある。ClassIII  $PI3$  キナーゼ (**Vps34**) である。**Vps34** は低分子量 G タンパク質 **Rab5** と会合し、それによって活性化される。**shInpp5e** ではこの **Rab5** の食胞へのリクルートが驚くほど少なくなっていた。一方、**shSHIP1** では **Rab5** のリクルートはコントロール細胞とほぼ同じだった。従って、**Inpp5e** には **Rab5** を食胞へ来させることで  $PI(3)P$  を蓄積させる役割があり、これは他の 5 位を脱リン酸化にはないユニークな機能であることが判明した。