

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬学）	氏名	瀬川 智裕
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
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			
論文審査担当者			
主査	教授 森岡 徳光	印	
審査委員	教授 古武 弥一郎		
審査委員	准教授 細井 徹		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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しうるリン酸化、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。当該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。その中で瀬川が担当したのは、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。以下に実験結果を示す。</p>			
<p>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。</p> <p>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。</p>			
<p>2. shInpp5e では食胞の $PI(3)P$ が減少する。</p> <p>$PI(3, 4, 5)P_3$ 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</p>			

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)P₃→PI(3,4)P₂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。

以上の結果より、本論文は食食と食胞成熟に於ける PIPs 脱リン酸化酵素の新たな役割を解明したものと評価できる。

よって審査委員会委員全員は本論文が著者に博士（薬学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬学）	氏名	瀬川 智裕
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
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			
論文審査担当者			
主査	教授	森岡 徳光	印
審査委員	教授	古武 弥一郎	
審査委員	准教授	細井 徹	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月14日の第38回広島大学研究科発表会（薬学系）及び平成31年2月4日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. イノシトールリン脂質の食食過程における役割は、マクロファージ以外の食細胞にも共通であるか 2. 蛍光プローブの特異性は保証されているか 3. イノシトールリン脂質の相対量の変化を可視化しているが、絶対量の変化についてはどうか 4. イノシトールリン脂質のリン酸化の違いが食胞動態を変化させる理由 5. イノシトールリン脂質代謝酵素の組織分布および細胞内局在 6. イノシトールリン脂質代謝酵素の病態への関わり <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			