

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570201

研究課題名（和文）好中球の細胞運動における GBF1 の役割

研究課題名（英文）Roles of GBF1 in cell migration of neutrophil

研究代表者

真崎 雄一（MAZAKI YUICHI）

熊本大学・大学院先端機構・特任助教

研究者番号：60311304

研究成果の概要（和文）：好中球は、病原体が侵入してくると、感染部位へ素早く移動することが知られている。しかし、その分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、好中球の細胞運動の分子メカニズムを明らかにするために、これまで我々が解析してきた細胞内輸送に関わる分子 GBF1 について、細胞運動の際、どのように活性化されるのか、また、細胞運動において、どのような役割を果たしているのか調べた。その結果、GBF1 は、PI(3, 4, 5)P₃ によって活性化されること、さらに、細胞運動時の ARF1 や GIT2 の細胞内局在に関わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It is known that neutrophils rapidly migrate into the infection sites of invading pathogens, although the molecular mechanism remains largely unknown. In this study, to resolve the molecular mechanism of cell migration in neutrophil, we examined the activation mechanism and roles of GBF1, intercellular trafficking associated protein, in cell migration. We found that GBF1 is activated by PI(3, 4, 5)P₃, and that GBF1 is involved in subcellular localization of ARF1 and GIT2 during cell migration.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動、極性形成

1. 研究開始当初の背景

細胞運動は、発生過程や免疫応答などの正常な生命活動だけでなく、癌の浸潤・転移過程など様々な病気の場面でも観察され、その分子メカニズムを明らかにすることは、これらの現象を理解するうえで、極めて重要だと考えられる。

好中球は、感染部に最初に集まり、病原体の排除を行う免疫細胞であり、その移動速度は極めて速い。また、誘引物質に対する感受能力も極めて高く、これらの点で、好中球は、細胞運動の分子メカニズムを解析するうえで非常に適した細胞である。誘引物質が、好中球の細胞

膜にある G タンパク質結合型レセプターに結合すると、細胞の内部では、ゴルジ体をはじめとする細胞小器官が再配置すると共に、それまで細胞全体に広がっていた p21-activated kinase 1 (PAK1)、Rac1、RhoA などの様々な分子が、細胞の前端部か後方部かのいずれか一方に局在し、前後の極性を形成する。この局在は、好中球が運動するうえで、極めて重要であり、我々をはじめ複数のグループが、細胞運動に異常が見られる細胞では、これらのタンパク質の局在に異常が見られることを報告している。さらに、RhoA を含む複数のタンパク質で、その活性化型変異タンパク質を強制発現させると、細胞運動に異常が観察されることも報告されている。このようなことから、細胞運動に関わる分子が、単に活性化すれば良いのではなく、活性化し、それぞれの分子が正しく局在することが、好中球が正常に細胞運動を行ううえで重要であると考えられる。

最近、我々は、1) 好中球及び好中球様細胞に分化させた HL-60 細胞 (以下、好中球様細胞) を細胞内輸送に関わる ADP-ribosylation factor (ARF) の guanine nucleotide exchange factor (GEF) の阻害剤の一つである Brefeldin A で処理すると、その細胞運動が著しく低下すること。2) Golgi-specific BFA resistance factor 1 (GBF1) の発現を small interfering RNA (siRNA) によって抑えると、好中球様細胞の細胞運動が低下すること。3) 誘引物質の一つである fMLP (*N*-formyl-Met-Leu-Phe) で刺激を与えると、GBF1 の局在が、ゴルジ体から細胞先端部に変わること。4) GBF1 は、fMLP で刺激をした際に起こる ARF の活性化に関与していることを見出している。しかし、これまでのところ、細胞が運動する際、GBF1 が、どのように活性化されるのか、また、GBF1 が、細胞内輸送を介して、どのように細胞運動に関わっているかについては、不明である。

2. 研究の目的

上記のような研究背景から、本研究では、細胞が運動する際、GBF1 が、どのように活性化されるのか、また GBF1 が、どのように細胞運動に関わっているのかを分子レベルで明らかにすることで、細胞運動の分子メカニズムの解明に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 細胞が運動する際、GBF1 が、どのように活性化されるのか。(2) GBF1

が、どのように細胞運動に関わっているのかを明らかにする。そこで、材料を得ることが容易で、遺伝子操作も容易なヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60 細胞) にジメチルスルフォキシド (DMSO) を加え、好中球様細胞に分化させた細胞を用いて、実験を行った。具体的な方法は以下の通りである。

(1) GBF1 の活性化機構

fMLP の刺激によって GBF1 が活性化するためには、G タンパク質結合型レセプターから、そのシグナルが GBF1 へ伝わる必要がある。好中球の細胞運動において、G タンパク質結合型レセプターから細胞内に存在する分子への伝達様式として、PAK や PI3K γ のように G タンパク質のサブユニットである G $\beta\gamma$ サブユニットと複合体を形成することによって活性化される場合と、Akt のように活性化されたホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ γ (PI3K γ) によって産生されたホスファチジルイノシトール 3, 4, 5 トリリン酸 (PI(3, 4, 5)P₃) などが結合することによって活性化される場合の 2 つが報告されている。これまでに、我々の研究の結果から、GBF1 は、G $\beta\gamma$ と複合体を形成しないこと。PI3K γ の阻害剤 AS-604850 で、ARF1 の活性化が抑えられることが明らかになっている。そこで、GBF1 と PI(3, 4, 5)P₃ との関係を以下のような方法で、さらに詳細に解析した。

- ① 好中球様細胞を 5 μ M の PI3K γ の阻害剤 AS-604850 で 37°C、30 分間処理し、その後、細胞運動時の GBF1 の局在の変化を調べた。
- ② 好中球様細胞の PI3K γ の触媒サブユニットである p110 γ の発現を siRNA で抑え、その後、fMLP の刺激による ARF1 の活性化状態及び細胞運動時の GBF1 の局在の変化を調べた。
- ③ 様々なイノシトールリン脂質が結合しているニトロセルロース膜を GST と GBF1 の一部の領域 (885-1370 aa) との融合タンパク質 (GST-GBF1 BP3K) を用いて、検出した。
- ④ PI(3, 4, 5)P₃ のビーズに GST-GBF1 BP3K を加え、複合体を形成するか調べた。

⑤ 好中球様細胞に GBF1 の siRNA とアミノ酸は変化しないものの GBF1 の siRNA とは反応しない GBF1 変異体と Enhanced green fluorescence protein (EGFP) との融合タンパク質(EGFP-GBF1 res wt)あるいは、同じく、アミノ酸は変化しないものの GBF1 の siRNA とは反応せず、さらに PI(3, 4, 5)P₃ と GBF1 との結合領域を欠損した変異体と EGFP との融合タンパク質(EGFP-GBF1 res ΔBP3K)を遺伝子導入し、その後、fMLP の刺激による ARF1 の活性化状態及び細胞運動時の GBF1 の局在の変化を調べた。

(2) GBF1 の細胞運動における役割

活性化された GBF1 が、どのように細胞運動に関わっているのか GBF1 の基質である ARF1 及び ARF1 の GTPase-activating protein (GAP)である G protein-coupled receptor kinase inter-actor 2 (GIT2)に着目して、以下の方法で解析した。

- ① 好中球様細胞の GBF1 の発現を siRNA によって抑え、その後、fMLP の刺激による ARF1 及び GIT2 の細胞内局在の変化を調べた。
- ② 好中球様細胞を 5 μM の AS-604850 で 37°C、30 分間処理し、その後、fMLP の刺激による ARF1 及び GIT2 の細胞内局在の変化を調べた。
- ③ 好中球様細胞に GBF1 の siRNA と GFP-GBF1 ΔBP3K を遺伝子導入し、その後、fMLP の刺激による ARF1 の局在の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) GBF1 の活性化機構

① PI3Kγ の GBF1 の活性化及び細胞前端部への局在に果たす役割

これまでに我々は、PI3Kγ の阻害剤 AS-604850 で好中球様細胞を処理すると、fMLP 刺激による ARF1 の活性化が著しく低下することを明らかにしている。そこで、PI3Kγ の阻害剤 AS-604850 で好中球様細胞を処理すると、GBF1 の局在にも変化が見られるのか検討した。その結果、予想通り、細胞前端部での GBF1 の局在は著しく低下することが明らかとなった[図 1]。

さらに、PI3Kγ の阻害剤の結果を裏付けるために、PI3Kγ の触媒サブユニットである p110γ の発現を siRNA で抑え、fMLP で刺激した際の好中球様細胞の ARF1 活性化を調べた。fMLP 刺激による ARF1 の活性化は、PI3Kγ 阻害剤 AS-

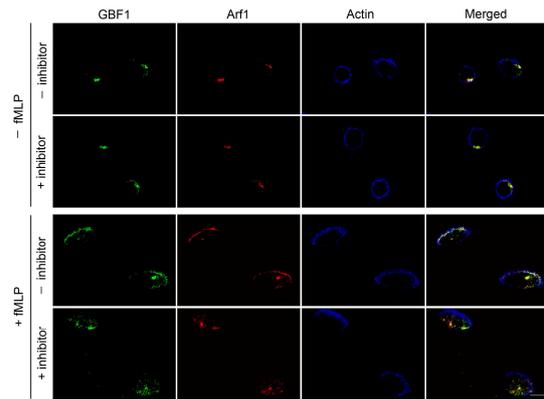


図 1 GBF1 及び ARF1 の細胞内局在における PI3Kγ 阻害剤の影響

604850 で処理した時と同様、著しく抑えられていることが分かった。さらに、この細胞では、細胞運動時の GBF1 は細胞前端部への局在も著しく低下していた。これまでに siRNA によって GBF1 の発現を抑えた好中球様細胞では、fMLP 刺激による ARF1 の活性化が著しく抑えられることが明らかになっていることから、これらの結果は、PI3Kγ によって産生されて PI(3, 4, 5)P₃ が、fMLP 刺激による GBF1 の活性化及び細胞前端部への局在に深く関与していることが示唆している。

② GBF1 のイノシトールリン脂質への結合

①の研究結果から、GBF1 の活性化及び細胞前端部への局在に PI(3, 4, 5)P₃ が関与することが示唆されたため、次に、GBF1 の PI(3, 4, 5)P₃ への結合を検討した。

GBF1 には、Cytohesin のような Sec7 ドメインの C 末端側から少し離れた部分にイノシトールリン脂質に結合できるドメインは存在しないが、この領域に相当する GBF1 の領域には、イノシトールリン脂質と結合できる可能性の高い疎水性アミノ酸と塩基性アミノ酸のクラスターが存在している。そこで、この領域と GST との融合タンパク質(GST-GBF1 BP3K)を作成し、イノシトールリン脂質への結合を検討した。その結果、GST-GBF1 BP3K は、PI(3, 4, 5)P₃ に強く結合し、PI(3, 5)P₂ にも結合することが明らかとなった[図 2]。さらに、PI(3, 4, 5)P₃ のビーズに GST-GBF1 BP3K を加え、複合体の形成を調べた場合にも、GBF1 BP3K と PI(3, 4, 5)P₃ との結合が確認された。

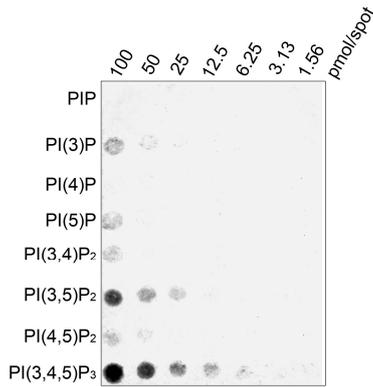


図2 GBF1のイノシトールリン脂質への結合

③PI(3, 4, 5)P₃のGBF1の活性化及び細胞前端部への局在に果たす役割

GBF1とPI(3, 4, 5)P₃との結合が確認されたので、次に、好中球様細胞にGBF1のsiRNAとアミノ酸は変化しないもののGBF1のsiRNAとは反応しないGBF1変異体とEGFPとの融合タンパク質(EGFP-GBF1 res wt)あるいは、同じく、GBF1のsiRNAとアミノ酸は変化しないもののGBF1のsiRNAとは反応せず、さらにPI(3, 4, 5)P₃との結合領域を欠損した変異体とEGFPとの融合タンパク質(EGFP-GBF1 res ΔBP3K)を好中球様細胞に遺伝子導入し、fMLPの刺激によるARF1の活性化状態を調べた。その結果、GBF1のsiRNAを遺伝子導入しても、BP3Kが存在する変異体(EGFP-GBF1 res wt)を同時に導入した場合には、ARF1の活性化が見られるが、BP3Kが欠損した変異体(EGFP-GBF1 res ΔBP3K)を同時に導入した場合には、ARF1の活性化がほとんど見られなかった[図3]。

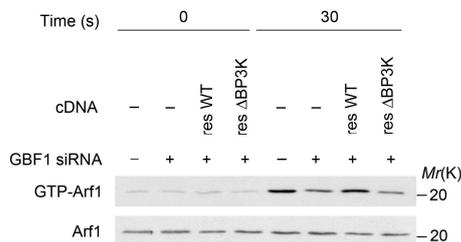


図3 BP3K領域のARF1の活性化における役割

さらに、fMLPで刺激しても、EGFP-GBF1 res ΔBP3Kのシグナルは、細胞前端部で、ほとん

ど見られなかった。これらの結果は、PI(3, 4, 5)P₃が、GBF1のBP3K領域に結合することで、GBF1の活性化及び細胞前端部への局在を引き起こしていることを強く示唆している。

(2) GBF1の細胞運動における役割

これまでの実験結果から、GBF1が好中球様細胞の細胞運動に関わっていることが明らかになっている。そこで、本研究では、どのような分子メカニズムで、GBF1が好中球様細胞の細胞運動に関わっているのか明らかにすることとした。

まず、好中球様細胞のGBF1の発現をsiRNAによって抑え、その後、fMLPの刺激によるARF1、GIT2の細胞内局在の変化を調べた。その結果、GBF1の発現を抑えなかった場合と比べ、ARF1及びGIT2の細胞前端部への局在が減少していた。さらに、(1)の実験で、PI3Kγによって産生されたPI(3, 4, 5)P₃が、GBF1のBP3K領域に結合することで、GBF1の活性化及び細胞前端部への局在を引き起こしていることが示唆されたので、PI3Kγ及びGBF1のBP3K領域のARF1、GIT2の局在に対する影響を調べた。予想の通りPI3Kγの阻害剤AS-604850で処理するとARF1、GIT2の細胞前端部の局在は著しく低下し[図1]、また、BP3Kが欠損した変異体(EGFP-GBF1 res ΔBP3K)でも、ARF1の細胞前端部への局在が減少した。

以上の結果から、我々は、以下のような細胞運動の分子メカニズムを考えている。まず、fMLPがそのレセプターに結合すると、Giタンパク質のαサブユニットとβγサブユニットに分かれる。次に、βγサブユニットがPI3Kγに結合することで活性化する。活性化されたPI3Kγは、PI(3, 4, 5)P₃を産生し、それによってGBF1が、その部分へ局在するようになると共に活性化する。さらに、活性化されたGBF1によってARF1が活性化され、局在するようになる。GIT2は、ARFのGAPであるため、活性化されたARF1に結合し、GIT2も局在するようになる。また、GIT2は、細胞骨格の制御に関わるPIXやPAKと複合体を形成することから、これらの分子の細胞内局在にも関与する。このように、GBF1は、好中球の細胞運動において、様々な分子の細胞内局在に関わっていると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究

者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Mazaki, Y., Nishimura, Y., Sabe, H.
GBF1 bears a novel phosphatidyl
inositol-phosphate binding module,
BP3K, to link PI3K activity with Arf1
activation involved in GPCR-mediated
neutrophil chemotaxis and superoxide
production. *Mol. Biol. Cell.* 2012、査
読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 真崎雄一、The Homology Downstream of
Sec7 domain of GBF1 binds to
phosphatidyl inositol phosphates to
link GPCR signaling with Arf activation
necessary for chemotaxis and superoxide
production、第 63 回日本細胞生物学会大
会、2011 年 6 月 29 日、北海道大学 (札幌)
- ② 真崎雄一、GBF1 is responsible for
neutrophil chemotaxis by regulating
Arf1 and Rac1、第 14 回 International
Congress of Immunology、2010 年 8 月 24
日、神戸コンベンションセンター(神戸国
際展示場)
- ③ 真崎雄一、Translocation and activation
of a Golgi-localizing ArfGEF via
PI3K . . . links GPCR stimulation with
directional migration in neutrophils、
第 62 回日本細胞生物学会大会、2010 年 5
月 19 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ④ 真崎雄一、Both GBF1 and PI3-kinase .
are essential for Arf1 activation
necessary for neutrophil directional
migration、第 29 回日本免疫学会総会、
2009 年 12 月 2 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ⑤ 真崎雄一、Roles of GBF1 in neutrophil
chemotaxis、第 61 回日本細胞生物学会大
会、2009 年 6 月 6 日、名古屋国際会議場
(名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真崎 雄一 (MAZAKI YUICHI)
熊本大学・大学院先導機構・特任助教
研究者番号：60311304

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：