

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25年5月3日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22247017

研究課題名（和文） Rac 活性化を担う CDM ファミリー分子群の生体機能とその制御機構

研究課題名（英文） Signaling and functions of CDM family proteins that acts as Rac GEFs

研究代表者

福井 宣規（FUKUI YOSHINORI）

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：60243961

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Rac 活性化を担う CDM ファミリー分子の機能や制御機構につき、解析を行った。その結果、1) DOCK1 が血管内皮細胞において CXCR4 の下流で機能し、心血管形成に重要な役割を演じること、2) DOCK2 が NK 細胞の細胞障害活性を制御すること、3) DOCK5 が破骨細胞の機能発現に重要であること、4) DOCK1 が PDGF 刺激による dorsal ruffle 形成に必要であること、5) DOCK5 と異なり、DOCK1 や DOCK2 はホスファチジン酸と会合すること等、重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have analyzed signaling and functions of CDM family proteins that are known to act as Rac GEFs. We obtained several important conclusions as follows:

- 1) DOCK1 acts downstream of CXCR4 in endothelial cells and plays an important role in cardiovascular development.
- 2) DOCK2 regulates NK cell-mediated cytotoxicity.
- 3) DOCK5 plays an important role in osteoclast functions.
- 4) DOCK1 is required for PDGF-induced dorsal ruffle formation.
- 5) Unlike DOCK5, DOCK1 and DOCK2 bind to phosphatidic acid.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 2011年度 | 9,700,000 | 2,910,000 | 12,610,000 |
| 2012年度 | 16,100,000 | 4,830,000 | 20,930,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 33,100,000 | 9,930,000 | 43,030,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

CDM ファミリーは線虫から哺乳類に至るまで保存された分子群で、低分子量Gタンパク質の上流で機能することで細胞骨格の制御に関わっている。申請者は、免疫系特異的に発

現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、ノックアウト (KO) マウスを作製することで、DOCK2 がリンパ球や好中球において重要な役割を演じていることを明らかにした。しかしながら、DOCK2 の発現が全ての造血細

胞に認められることを考えると、DOCK2 欠損の影響が一部の細胞に限定しているのはむしろ不思議であった。この観点から、DOCK2 欠損の影響が認められない骨髓系樹状細胞やマクロファージといった造血細胞を対象に CDM ファミリー分子群の発現解析を行ったところ、これらの細胞では DOCK2 に加えて、別の Rac 活性化分子である DOCK1 や DOCK5 が発現していることを見いだした。DOCK1 は非リンパ球系細胞に発現する分子であり、細胞株を用いた解析より細胞運動、アポトーシス細胞の貪食、神経突起形成を制御することが報告されているが、その生理的機能は明らかではない。また、DOCK5 は破骨細胞の分化に伴って発現が上昇する分子であるが、その機能的意義は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、DOCK1、DOCK2、DOCK5 という Rac 活性化を担う CDM ファミリー分子に焦点を当て、その遺伝子改変マウスを駆使して、「生命高次複雑系の構築や恒常性維持、機能発現におけるこれら分子の役割」を明らかにすると共に、その構造、シグナルネットワーク、細胞内動態に関する包括的な解析を行うことで、「各種受容体から Rac 活性化に至るシグナル伝達経路」を解明することを目的とする。このため、具体的には以下の項目に関して、研究を進めた。

- 1) 心血管形成における DOCK1 の役割
- 2) 破骨細胞の分化・活性化における DOCK2/DOCK5 の役割
- 3) NK 細胞の機能における DOCK2/DOCK5 の役割
- 4) 胸腺の構築における DOCK1/DOCK5 の役割
- 5) 生体の恒常性維持における DOCK1/DOCK2/DOCK5 の役割
- 6) ラッフル膜形成における DOCK1/DOCK5 の役割

3. 研究の方法

1) 心血管形成における DOCK1 の役割

KO マウスから AV canal 部分を単離し、コラーゲンゲル上で3次元培養することで、内皮細胞の形質転換 (EMT) や浸潤能を、野生型マウスのそれと比較した。また、血管形成における DOCK1 の役割を明らかにするため、PCAM-1 や α -smooth muscle actin に対する抗体にて免疫染色を行い、血管の発達や走行、ブランピング等につき、比較解析した。さらに、マウス胎児から PECAM-1 抗体とマグネティックビーズを用いて血管内皮細胞を単離し、その増殖や遊走に関与するとされる様々

なりガンド (VEGF、CXCL12、スフィンゴシン 1 リン酸等) を作用させ、細胞の遊走能やマトリゲルへの浸潤能、およびラッフル膜形成の進展速度に関して、野生型マウスと比較した。

2) 破骨細胞の分化・活性化における DOCK2/DOCK5 の役割

骨髓細胞から MCSF と RANKL を用いて破骨細胞を誘導し、細胞の機能や形態を、野生型および KO マウス間で比較した。

3) NK 細胞の機能における DOCK2/DOCK5 の役割

NK 細胞の細胞障害活性を、種々の腫瘍細胞株を用いて解析すると共に、NKG2D といった受容体や F-アクチンの局在 (NK シナプス形成)、Rac 活性化、シグナル分子のリン酸化につき、細胞生物学的および生化学的手法を用いて解析した。また、NK 細胞と腫瘍細胞を共培養し、溶解性顆粒の移動を解析した。

4) 胸腺の構築における DOCK1/DOCK5 の役割

コンディショナル KO マウスを FoxN1-Cre マウスと交配することで、胸腺上皮細胞特異的に DOCK1 と DOCK5 の発現を欠くダブル KO マウス (FoxN1-Cre DKO) を樹立し、胸腺の構築や T 細胞の分化を、野生型マウスと比較した。

5) ラッフル膜形成における DOCK1/DOCK5 の役割

KO マウスから繊維芽細胞 (MEF) を単離し、PDGF 刺激によるラッフル膜形成につき比較検討すると共に、DOCK1 や DOCK5 の挙動を解析した。また、その局在制御に重要なドメインとその会合分子の探索を行った。

4. 研究成果

1) 心血管形成における DOCK1 の役割

コンディショナル KO マウスを用いて、DOCK1 の生理的機能を解析した。その結果、すべての細胞系譜で DOCK1 を欠損させたマウスは全例、心室中隔欠損 (VSD) と両大血管右室起始症 (DORV) を呈し、全身の浮腫を伴い胎生後期に死亡することを見いだした。同様の所見は、Tie Cre マウスを用いて、DOCK1 の発現を血管内皮細胞特異的に欠損させた場合も認められた。また、DOCK1 欠損マウス胎児では midgut における血管形成にも異常が生じていた。これらの表現型はケモカイン受容体 CXCR4 の欠損マウスのそれと類似していることから、DOCK1 KO マウスから血管内皮細胞を単離し、CXCL12 で刺激したところ、Rac 活性化およびラッフル膜形成が顕著に障害されていた。以上より、DOCK1 が血管内皮細胞において CXCR4 の下流で機能する Rac 活性化の

マスター分子であり、心血管形成に重要な役割を演じることを明らかにした。

2) 破骨細胞の分化・活性化における DOCK2/DOCK5 の役割

破骨細胞の形態や多核化、骨吸収能につき解析した結果、DOCK5 KO マウスではこれらの機能が障害されていることを見いだした。また、この機能発現に重要な DOCK5 のドメインを同定するため、アデノウイルスを用いて、破骨細胞に、欠失変異 DOCK5 を発現させる実験系を構築した。

3) NK 細胞の機能における DOCK2/DOCK5 の役割

DOCK5 の単独欠損では、NK 細胞の機能に全く影響を与えなかったが、DOCK2 欠損により、細胞障害活性が顕著に障害されることを見いだし、そのメカニズムを解明した (under revision for publication)。また、細胞膜上での Rac の発現量が限られている生理的な状況下では、lobe A を介した DOCK2 の 2 量体形成が、Rac 活性化や細胞運動に重要であることを実証した。

4) 胸腺の構築における DOCK1/DOCK5 の役割

FoxN1-Cre DKO を樹立したが、胸腺の構築や T 細胞分化に大きな defect は生じなかった。

5) 生体の恒常性維持における DOCK1/DOCK2/DOCK5 の役割

LysM-Cre TKO を樹立し、貪食、遊走、インフラマソームの活性化につき、機能的および生化学的に解析した結果、いくつかの異常を見いだし、そのメカニズムにつき、現在引き続き解析を進めている。

6) ラッフル膜形成における DOCK1/DOCK5 の役割

DOCK1/DOCK5 欠損 MEF を用いて、PDGF 刺激による Rac の活性化やラッフル膜形成につき解析した。その結果、Rac の活性化及び peripheral ruffle 形成が DOCK1 と DOCK5 により協調的に制御されているのに対し、DOCK1 単独欠損により dorsal ruffle 形成が障害されることを見出した。DOCK1 は DOCK5 と異なり、C 末の polybasic amino acid cluster を介して phosphatidic acid (PA) と結合し、dorsal ruffle 膜へ局在した。また、PA 産生を触媒する酵素である phospholipase D (PLD) の活性化を遺伝学的及び薬理的にブロックしたところ、dorsal ruffle の形成は顕著に抑制された。以上より、PDGF 受容体の下流で PLD が活性化し、PA の

産生を介して DOCK1 の局在をコントロールすることで、dorsal ruffle 形成を選択的に制御していることが明らかとなった。さらに、DOCK1 による Rac 活性化をブロックできる低分子化合物を開発し、これを用いて乳がん細胞の浸潤が抑制されることを実証した。

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 14 件)

1. Laurin M, Huber J, Pelletier A, Houalla T, Park M, Fukui Y, Haibe-Kains B, Muller WJ, Côté JF: Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2013 in press (査読有)
2. Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y, Côté JF, Fukui Y: Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. **J. Biol. Chem.**, 288: 8092-8100, 2013 (査読有) (DOI:10.1074/jbc.M112.410423)
3. Cimino PJ, Yang Y, Li X, Hemingway JF, Cherne MK, Khademi SB, Fukui Y, Montine KS, Montine TJ, Keene CD: Ablation of the microglial protein DOCK2 reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **Exp. Mol. Pathol.**, 94:366-371, 2013 (査読有) (DOI:10.1016/j.yexmp. 2013.01.002.)
4. Terasawa M, Uruno T, Mori S, Kukimoto-Niino M, Nishikimi A, Sanematsu F, Tanaka Y, Yokoyama S, Fukui Y: Dimerization of DOCK2 is essential for DOCK2-mediated Rac activation and lymphocyte migration. **PLoS ONE** 7:e46277, 2012 (査読有) (DOI:10.1371/journal.pone.0046277)
5. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Pieczyk M, Habiro K, Katakai T, Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M,

- Nishizaki T, Shirouzu M, Duan X, Uruno T, Nishikimi A, Sanematsu F, Yokoyama S, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y: DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. **Blood**, 119: 4451-4461, 2012 (査読有) (DOI:10.1182/blood-2012-01-407098)
6. Nishikimi A, Uruno T, Duan X, Cao Q, Okamura Y, Saitoh T, Saito N, Sakaoka S, Du Y, Suenaga A, Kukimoto-Niino M, Miyano K, Gotoh K, Okabe T, Sanematsu F, Tanaka Y, Sumimoto H, Honma T, Yokoyama S, Nagano T, Kohda D, Kanai M, Fukui Y: Blockade of inflammatory responses by a small-molecule inhibitor of the Rac activator DOCK2. **Chem. Biol.**, 19:488-497, 2012 (査読有) (DOI:10.1016 /j. chembiol. 2012. 03. 008)
 7. Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M, Mishima-Tsumagari C, Akasaka R, Ohsawa N, Sekine S, Ito T, Tochio N, Koshiha S, Kigawa T, Terada T, Shirouzu M, Nishikimi A, Uruno T, Katakai T, Kinashi T, Kohda D, Fukui Y, Yokoyama S: Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELM01 from their autoinhibited forms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 109:3305-3310, 2012 (査読有) (DOI:10.1073/pnas.1113512109)
 8. Ippagunta SK, Subbarao Malireddi RK, Shaw PJ, Neal GA, Walle LV, Green DR, Fukui Y, Lamkanfi M, Kanneganti T-D: The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization. **Nat. Immunol.**, 12:1010-1018, 2011 (査読有) (DOI:10.1038/ni.2095)
 9. Sanematsu F, Hirashima M, Laurin M, Takii R, Nishikimi A, Kitajima K, Ding G, Noda M, Murata Y, Tanaka Y, Masuko S, Suda T, Meno C, Côté JF, Nagasawa T, Fukui Y: DOCK180 is a Rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4. **Circ. Res.**, 107:1102-1105, 2010 (査読有) (DOI:10.1161/CIRCRESAHA.110.223388)
 10. Boscacci RT, Pfeiffer F, Gollmer K, Sevilla AC, Martin AM, Soriano SF, Natale D, Henrickson SE, Andrian UH, Fukui Y, Mellado M, Deutsch U, Engelhardt B, Stein JV: Comprehensive analysis of lymph node stroma-expressed Ig superfamily members reveals redundant and non-redundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing. **Blood**, 116: 915-925, 2010 (査読有) (DOI:10.1182/blood-2009-11-254334)
 11. Kumar V, Scandella E, Danuser R, Onder L, Nitschke M, Fukui Y, Halin C, Ludewig B, Stein JV: Global lymphoid tissue remodeling during a viral infection is orchestrated by a B cell-lymphotoxin-dependent pathway. **Blood**, 115: 4725-4733, 2010 (査読有) (DOI:10.1182/blood-2009-10-250118)
 12. Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Maeda N, Ishikawa T, Hoshino K, Uruno T, Cao Q, Higashi S, Kawaguchi Y, Enjoji M, Takayanagi R, Kaisho T, Yoshikai Y, Fukui Y: Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. **J. Exp. Med.**, 207: 721-730, 2010 (査読有) (DOI:10.1084/jem.20091776)
- [学会発表] (計 38 件)
1. Fukui Y
Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease.
Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore、2013年3月4日-5日、Singapore (Singapore)

2. Tanaka Y, Fukui Y
A novel strategy for treatment of immune-related disorders by using cytoskeleton regulating signals as targets.
JST-CREST International Symposium、2013年2月12日-13日、東京
3. Nishikimi A, Harada Y, Tanaka Y, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y
Dock8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. The 23rd CDB Meeting: Building multicellular systems from cellular cross-talk、2013年1月22日-23日、神戸
4. 福井宣規
免疫細胞の遊走・活性化における DOCKファミリー分子の役割とその制御
さきがけ 領域会議 特別講演、2013年1月6日-8日、大阪
5. Fukui Y
Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease.
Centennial Hashimoto Disease International Symposium、2012年12月2日-4日、福岡
6. 田中芳彦, 原田洋輔, 末次(埜)京子, 新野(柊元)睦子, 白水美香子, 横山茂之, 福井宣規
樹状細胞の3次元での動きを制御する Cdc42 活性化分子 DOCK8
第35回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、2012年12月11日-14日、福岡
7. Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y, Jean-Francois Côté, Fukui Y
Role of DOCK1 and its regulation during dorsal ruffle formation.
第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日-14日、福岡
8. Tanaka Y, Harada Y, Terasawa M, Nishikimi A, Kinashi T, Fukui Y
DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses.
第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5日-7日、神戸
9. 田中芳彦, 原田洋輔, 福井宣規
ヒト免疫不全症の責任分子 DOCK8 の生理的機能とその制御
Kyoto T cell Conference、2012年7月6日-7日、京都
10. 福井宣規
免疫系細胞高次機能を司る CDM ファリ一分子 DOCK2 -その分子基盤と創薬への応用-
平成23年度ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム、2012年3月12日、東京
11. 福井宣規
樹状細胞の遊走・活性化における DOCKファミリー分子の役割とその制御
第32回和漢医薬学総合研究所特別セミナー「和漢薬治療のターゲットとしての粘膜免疫機構」、2011年12月9日-10日、富山
12. 錦見昭彦, 田中芳彦, 福井宣規
免疫特異的なRac活性化因子DOCK2を標的とした免疫抑制剤の開発
第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月27日-29日、千葉
13. Fukui Y, Sanematsu F, Nishikimi A
Role of phospholipid in DOCK family protein-mediated cellular functions.
第10回日本生化学会 JBS バイオフロンティアシンポジウム、2011年11月15日-16日、福岡
14. Sanematsu F, Fukui Y
Control of cardiovascular development by the atypical Rac activator DOCK180.
The 6th International symposium of Institute Network、2011年6月9日-10日、東京
15. Fukui Y
Immune regulatory functions of DOCK2 in health and disease.
ESF-JSPS Frontier Science Conference

Series for Young Researchers、2011
年3月1日-6日、Amsterdam(Nederland)

16. Fukui Y
Immune regulatory functions of DOCK2
in health and disease.
The 7th Global COE International
Symposium、2011年2月10日-11日、
Singapore (Singapore)
17. Fukui Y
Regulation of leukocyte migration and
activation by the CDM family protein
DOCK2 -From the molecular basis to its
clinical application-
The 2010 Fall Conference of The Korean
Association of Immunologists、2010
年11月18日-19日、Seoul (Korea)
18. 福井宣規
細胞骨格制御シグナルを標的とした免疫
難病治療の新戦略
CREST「免疫機構」研究領域・第一回シ
ンポジウム、2010年10月27日、東京
19. Fukui Y
Signaling and function of the CDM
family protein DOCK2.
第8回日独シンポジウム「免疫応答の制
御と疾患」、2010年9月26日-29日、
Cuxhaven (Germany)

[図書] (計2件)

1. 實松史幸、福井宣規：心血管形成にお
ける DOCK180 の機能とその制御機構、感
染・炎症・免疫、42:326-329、2012
2. 田中芳彦、福井宣規：自然免疫システム
における DOCK2 の機能とその制御、細胞
工学、30：538-544、2011

[その他]

報道関連情報

1. 朝日新聞、「免疫制御の物質 特定」、平成
24年4月20日
2. 毎日新聞、「白血球炎症 抑える化合物」、
平成24年4月20日
3. 西日本新聞、「免疫異常 抑える化合物」、
平成24年4月20日
4. 読売新聞、「免疫異常 抑える物質発見」、
平成24年4月21日
5. 日本経済新聞、「白血球の活性化 制御す

る化合物」、平成24年4月23日

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 宣規 (FUKUI YOSHINORI)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：60243961

(2) 研究分担者

田中 芳彦 (TANAKA YOSHIHIKO)
九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：00398083

研究分担者

錦見 昭彦 (NISHIKIMI AKIHIKO)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：70404019