

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 17日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790321

研究課題名（和文） 細胞極性蛋白質複合体による白血球の遊走方向決定機構

研究課題名（英文） Regulation of directionality of chemotaxing leukocyte
by the polarity protein complex

研究代表者

鎌倉 幸子（SACHIKO KAMAKURA）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80398081

研究成果の概要（和文）：

体内に微生物が侵入すると、白血球の一種である好中球が、微生物の侵入部位（あるいは炎症部位）へ素早く遊走して貪食・殺菌を行う。この細胞の遊走過程を「ケモタキシス（走化性）」と呼ぶ。正しくケモタキシスするためには「方向の決定」と「運動性の亢進」が必要であるが、「遊走方向」を制御する機構については不明な点が多い。本研究では、好中球の遊走方向の制御に関わる蛋白質を見出し、その作用機構について解明した。

研究成果の概要（英文）：

Cell movement directed by a gradient of a diffusible chemoattractant is known as chemotaxis, which plays a vital role in immune responses. Neutrophilic leukocytes, crucial for host defense, move toward the source of chemoattractants, which are derived from invading microbes and/or produced by infected hosts, thereby arriving correctly at sites of infection to kill pathogens. Successful chemotaxis requires not only increased motility but also sustained directionality. In this study, we analyzed molecular mechanisms for the directionality control.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	560,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	950,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

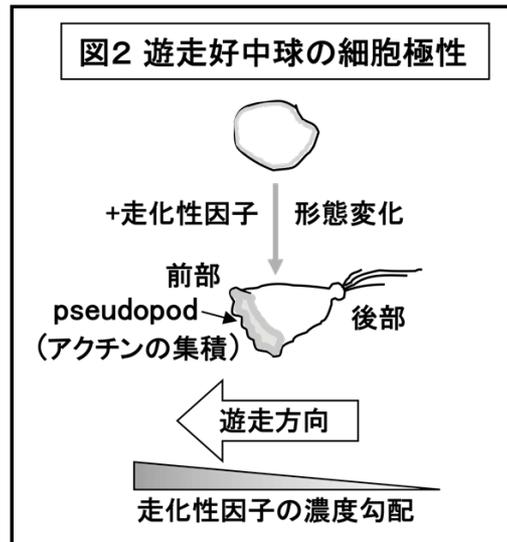
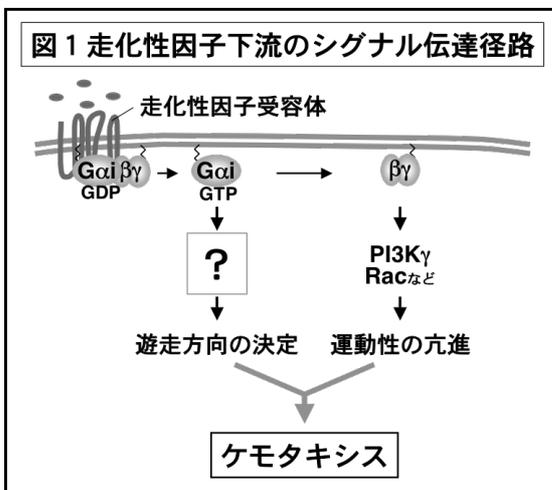
科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：細胞・白血球・ケモタキシス

1. 研究開始当初の背景

好中球は、私たちの体を循環する白血球のおよそ 60%を占める細胞であり、その機能は、体内に侵入した細菌や真菌などの微生物を、貪食して殺菌することである。私たちの体は常に外界からの微生物の侵入にさらされており、好中球が10分の1に減少すると生きていくことができない。このように生体防御に必須の役割を担う好中球だが、その機能を発揮するためには、ケモタキシス(chemotaxis: 走化性)により微生物の侵入部位へ素早く到達することが必要不可欠である。ケモタキシスの過程で好中球は、感染部位から拡散してくる走化性因子を、細胞表面の受容体で受け取るが、この走化性因子の濃度差が細胞の端と端でわずか5%以下であっても、濃度勾配として感知することができる。この微妙な濃度勾配を、好中球はシグナルの偏りとして細胞内で増幅し、進むべき「方向」を定め、最終的にターゲットの微生物に確実にたどり着く。このように、好中球のケモタキシスは、巧妙に統制された生命現象である。

近年、ケモタキシスの「方向」を制御するメカニズムのモデルが提唱されつつあるが、まだ未解明な部分が多い(図1参照)。走化性因子の受容体は、すべてが7回膜貫通型であり、そのすべてがG蛋白質(α 、 β 、 γ の3つのサブユニットから成る)の中のGiと共役している。リガンドとの結合によりG $\beta\gamma$ サブユニットがリリースされ、その下流で活性化するPI3K γ やRhoファミリーの低分子量G蛋白質などが運動性や方向の制御



に重要と考えられている。G $\beta\gamma$ の下流経路がよく解析されている一方で、G α サブユニットの役割については不明である。走化性因子の受容体のすべてがGaiと共役している意義についても分かっていない。

2. 研究の目的

好中球は、走化性因子の刺激を受けると、それをきっかけに細胞の形態が扇状に素早く変化する(図2参照)。広がった形態の前部は、盛んなアクチン重合により遊走の原動力を産み出し、後部は細胞体が収縮して移動を助ける。このような形態と機能の非対称性を、好中球の「細胞極性」と呼ぶ。「細胞極性」を濃度勾配に従って形成することで「遊走方向の決定」が起こると考えられる。その結果、好中球は、前部(pseudopod)を走化性因子の濃い方向へ安定に向け、進行方向を定めることが可能となる。本研究の目的は、「遊走方向の決定」機構を役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

① 走化性因子の濃度勾配に対する pseudopodの向きの観察

走化性因子の濃度勾配を作るために、Zigmond chamberを用いる。これは、2つの溝に挟まれたステージ上で好中球を遊走させるチャ

ンバーで、溝の片方に走化性因子を入れるとステージ上に濃度勾配が形成される。アクチンの集積を細胞染色により観察することで、KO マウスの好中球が正常な極性形成能を持つかどうか、濃度勾配の高い方向へ正しく pseudopod を向けるかどうか検討する。

② 遊走の軌跡の解析(直線性、移動速度の解析)

ケモタキシスする好中球のタイムラプス撮影を行い、イメージ解析ソフトを用いて細胞移動の軌跡をトレースし観察する。さらにそのデータを用いて、遊走の直線性(直線の移動距離÷総移動距離)や遊走速度(総移動距離÷時間)を算出する。「直線性」は細胞が濃度勾配に対して適切に進行方向を定めることができるかどうかを、「速度」は細胞の運動性を評価する指標となるので、WTとKO マウスの値を比較し、KO でケモタキシスの効率が低下していた原因を検討する。

③ 遊走過程では、ダイナミックに pseudopod の伸長と退縮を繰り返し細胞が移動することから、固定細胞での観察には限界がある。そこで GFP を融合させた蛋白質をそれぞれ好中球に発現させてタイムラプス撮影を行う。ごく微量の走化性因子を micropipette (先端が 1 μm 弱) を用いて細胞に与えると、細胞は micropipette の先端に向かってケモタキシスする。その際の GFP 融合蛋白質の局在の変化を撮影し観察する。

4. 研究成果

本研究では、走化性因子依存的に遊離した Gi の下流で機能する蛋白質キナーゼを見出した。このキナーゼは、ケモタキシスの際、走化性因子依存的に好中球の前方にリクルートされることが分かった。このキナーゼの働きを阻害した好中球は、走化性因子の濃度勾配下でランダムに遊走し、「遊走方向」の異常が観察された。一方で、遊走速度は全く損なわれていなかったことから、このキナーゼの働きを阻害しても「運動性の亢進」には影響が無いことが分かった。上記の

結果から、好中球のケモタキシスの際に、Gi の下流で「遊走方向」を特異的に制御するためのシグナル伝達経路があることが示唆された。さらに、このキナーゼが前方に集積するのに必要なアダプター蛋白質を見出し、そのノックアウトマウスを作製した。このノックアウトマウス由来の好中球は、キナーゼの前方への集積が起らず、細胞質に均一に局在した。さらに、遊走時に細胞極性が維持されず、「遊走方向」に異常をきたすこと等を明らかにした。

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 3 件)

1, Yuzawa S, Kamakura S, Iwakiri Y, Hayase J, Sumimoto H.

Structural basis for interaction between the conserved cell polarity proteins Inscuteable and Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN).

Proc Natl Acad Sci U S A, 108, 19210-19215 (2011) 査読有り

2, Takemoto D, Kamakura S, Saikia S, Becker Y, Wrenn R, Tanaka A, Sumimoto H, Scott B.

Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex.

Proc Natl Acad Sci U S A, 108, 2861-2866 (2011) 査読有り

3, Minakami R, Maehara Y, Kamakura S, Kumano O, Miyano K, and Sumimoto H. Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils.

Genes Cells, 15, 409-423 (2010) 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1, 早瀬純也, 鎌倉幸子, 岩切優子, 山口佳洋, 伊崎智子, 伊藤隆司, 住本英樹
「新規 Par6 結合タンパク質による上皮細胞極性の制御機構」
第34回日本分子生物学会年会
2011年12月16日 パシフィコ横浜

2, 岩切優子, 鎌倉幸子, 住本英樹
「新規 NuMA 結合タンパク質による分裂期染色体の整列調節機構」
第34回日本分子生物学会年会
2011年12月16日 パシフィコ横浜

3, 湯澤聡, 鎌倉幸子, 岩切優子, 早瀬純也, 住本英樹
「細胞極性関連タンパク質 Inscuteable と LGN との複合体の X 線結晶構造解析」
第34回日本分子生物学会年会
2011年12月14日 パシフィコ横浜

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌倉 幸子 (SACHIKO KAMAKURA)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 80398081