

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16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：22790469

研究課題名（和文） DOCK2 および Rac を介した好中球貪食の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of neutrophil phagocytosis mediated by DOCK2 and Rac signaling

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

好中球の貪食における細胞骨格制御における DOCK2 の役割について検討した。その結果、好中球の貪食や飲作用に DOCK2 が不可欠であること、貪食の際に DOCK2 が食胞周囲に集積することを明らかにした。また、同じ CDM ファミリーに属する他の Rac 活性化因子や Cdc42 活性化因子を欠損した好中球についても同様に検討したところ、これら因子の貪食への影響は DOCK2 と比較してわずかなものであった。

研究成果の概要（英文）：

The role of DOCK2 in cytoskeleton rearrangement during neutrophil phagocytosis was investigated. It was found that DOCK2 plays an important role in phagocytosis and macropinocytosis. Real time imaging analysis has shown that DOCK2 accumulated around forming phagosome. I also examined the role of other CDM family proteins in neutrophil phagocytosis. However, these molecules had less effect on neutrophil phagocytosis than DOCK2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：好中球、貪食、細胞骨格、低分子量 G タンパク質

1. 研究開始当初の背景

好中球は、細菌などの感染源に向かって遊走し、貪食や活性酸素産生により、それらの除去にあたる、生体防御の最前線で働く白血球である。好中球の「遊走」「貪食」そして「活性酸素産生」といった高次機能の発現において、いずれの場合も低分子量 G タンパク

質 Rac の活性化が不可欠であることが知られている。活性化された Rac の下流で細胞骨格が再構成され、細胞の形態が変化することにより遊走や貪食が、また、NADPH オキシダーゼが活性化されることにより活性酸素を産生がそれぞれ促される。筆者は、好中球の遊走あるいは活性酸素産生において DOCK2 の活性ならびに細胞内動態が重要な

役割を果たしていることを解明してきた。

遊走や活性酸素産生のほか、食食作用に関しても **Rac** の関与が示唆されており、筆者の予備検討の結果、**Fcy** 受容体を介した好中球の食食にも **DOCK2** が関与していることを見いだしている。また、好中球には **DOCK2** のほか、同じ **CDM** ファミリーに属するグアニンヌクレオチド交換因子である **DOCKX** などが発現していることから、好中球における細胞骨格制御機構を解明するにあたって、**DOCK2** が他の **CDM** ファミリー分子と相互にどのような関係にあるのかを議論する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、好中球の食食作用に焦点をあて、**DOCK2** を中心として、食食や飲作用の分子機構を解明することを目的としている。これまでに、好中球の遊走における **DOCK2** の細胞内動態が、ホスファチジルイノシトール三リン酸やホスファチジン酸といったリン脂質により制御されていることが知られているので、食食におけるリン脂質の関与についても検討する。そして、**DOCKX** など他の **CDM** ファミリー分を含めて解析する上で、これまでに解明した遊走の分子機構と併せた形で再検討し、**CDM** ファミリータンパクを介したシグナルネットワークが、如何にして好中球の遊走、活性酸素産生、そして食食といった機能を統合的に制御しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 野生型および **DOCK2** 欠損マウスより好中球を単離し、蛍光標識した **Zymosan** やデキストリンの存在下で培養し、これらの食食や飲作用による取り込みをフローサイトメトリーにより定量して比較した。

(2) 好中球が異物を食食する過程における **DOCK2** の細胞内動態を観察するにあたり、**DOCK2-GFP** マウス (**DOCK2** の C 末端側に **GFP** を融合タンパク質として発現するようにしたノックインマウス) 由来の好中球が **Zymosan** を食食する様子をリアルタイムで観察した。具体的には、加温したチャンバー内に、好中球と **Zymosan** が入ったシャーレを置き、これを倒立蛍光顕微鏡上にセットし、冷却 **CCD** カメラを用いてタイムラプス撮影した。

(3) 走化性因子に応答した好中球の遊走において、ホスホリパーゼ **D** (**PLD**) により産生された **PA** により **DOCK2** の細胞内動態が制御され、先端端に集積することが明らかにな

っている。そこで、食食、特に食胞形成において同様の **PLD** を介した産生されたホスファチジン酸が関与しているか否かを検討するため、**PLD** 阻害剤である **FIPI** 存在下で **Zymosan** に対する食食能を検討した。

(4) **DOCK2** 欠損マウスと **DOCKX** 欠損マウスを交配し、**DOCK2** と **DOCKX** を同時に欠損したマウスを作製した。このマウス由来の好中球の食食能を、野生型あるいは **DOCK2** 欠損好中球と比較した。

(5) **Cdc42** の上流で機能する **CDM** ファミリー分子 **DOCKY** を欠損したマウスを、ジーンターゲットングの手法を用いて作製した。このマウスより好中球を採取し、**Zymosan** やデキストリンの食食や飲作用による取り込みを検討した。

(5) **DOCK2**、**DOCKX**、**DOCKY** を欠損した好中球の、走化性因子の濃度勾配に応答した遊走について、比較検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型および **DOCK2** 欠損マウス由来の好中球を用い、蛍光標識した **Zymosan** の食食ならびにデキストリンの飲作用を比較した。その結果、**DOCK2** 欠損好中球では、**Zymosan** に対する食食およびデキストリンに対する飲作用が顕著に低下していることが確認された。これらのことから、好中球の飲作用や食食に、**DOCK2** の働きが不可欠であることが示唆された。

(2) 好中球が **Zymosan** を食食する際の **DOCK2** の細胞内動態をリアルタイムで観察した。その結果、好中球が **Zymosan** を認識した後、これを取り囲むようにして形成された食胞の周囲に **DOCK2** が強く集積することが明らかになった (図 1)。このことならびに前項の結果から、**DOCK2** が食胞を形成する際の細胞形態変化に重要な役割を担っている、すなわち、食胞形成にあたって **DOCK2** ならびに **Rac** によるシグナルを介して細胞骨格の再構成を行っていることが示唆された。

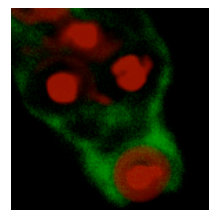


図 1 好中球の食食における **DOCK2** の局在。

DOCK2 の局在を緑、Zymosan を赤で示す。

(3) FIPI 存在下で、好中球による Zymosan の貪食を検討した結果、FIPI の濃度依存的に貪食能が抑制された。このことから、好中球貪食も遊走と同様に PLD を介して産生されたホスファチジン酸により制御されていることが示唆された。

(4) DOCK2 欠損マウスと DOCKX 欠損マウスを交配することにより DOCK2/DOCKX ダブルノックアウトマウスを作製し、このマウス由来の好中球と、野生型および DOCK2 欠損マウス由来の好中球との間で、Zymosan の貪食を比較した。その結果、DOCK2/DOCKX 欠損好中球の貪食能は、DOCK2 欠損好中球と比較してわずかに低下するものの、大きな差は認められなかった。このことから、好中球の貪食における Rac を介した細胞形態変化には、主に DOCK2 が寄与していることが示唆された。

(5) DOCKY 欠損マウスを作製し、このマウス由来の好中球の Zymosan に対する貪食、ならびにデキストリンに対する飲作用を検討した。その結果、DOCKY を欠損した好中球においても、貪食、飲作用ともに野生型マウス由来の好中球との間に差は認められなかった。このことから、好中球の貪食や飲作用において、DOCKY および Cdc42 を介したシグナル伝達はほとんど関与していないことが示された。

(6) 走化性因子の濃度勾配に応答した好中球の遊走について、野生型、DOCK2 欠損、DOCK2/DOCKX 欠損、ならびに DOCKY 欠損好中球を用いて比較検討した。その結果、DOCK2/DOCKX 欠損好中球では、DOCK2 欠損好中球と比較して遊走能がわずかに低下していた。一方、DOCKY 欠損好中球の遊走は、野生型好中球と同等であった。

以上のことから、好中球の貪食や遊走における細胞形態変化には、Rac を介したシグナルが不可欠であり、この際の Rac 活性化は主に DOCK2 によって担われていることが明らかになった。

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 Harada, Y., Tanaka, Y., Terasawa, M., Pieczyk, M., Habiro, K., Katakai, T., Hanawa-Suetsugu, K., Kukimoto-Niino, M., Nishizaki, T., Shirouzu, M., Duan, X.,

Urano, T., Nishikimi, A., Sanematsu, F., Yokoyama, S., Stein, J.V., 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

② Nishikimi A., Urano, 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

③ Hanawa-Suetsugu, K., Kukimoto-Niino, M., Mishima-Tsumagari, C., Akasaka, R., Ohsawa, N., Sekine, S., Ito, T., Tochio, N., Koshihara, S., Kigawa, T., Terada, T., Shirouzu, M., Nishikimi, A., Urano, T., Katakai, T., Kinashi, T., Kohda, D., Fukui, Y., Yokoyama, S. Structural basis for mutual relief of DOCK2 and ELMO1 from their autoinhibited forms for Rac activation in lymphocyte chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 3305-3310, 2012. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

錦見昭彦、田中芳彦、福井宣規 免疫系特異的な Rac 活性化因子 DOCK2 を標的とした免疫抑制剤の開発 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 11 月 27 日、千葉

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: DOCK2 による Rac 活性化を制御する低分子化合物及びその用途

発明者: 福井宣規、錦見昭彦、金井求、神田大輔、齋藤貴士

権利者: 九州大学、東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-109334

出願年月日: 2011 年 5 月 16 日

国内外の別: 国内

[その他]

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

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