

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570224

研究課題名(和文) 走化性情報システムの理解を目指した細胞極性、運動の分子機構の解明

研究課題名(英文) The molecular basis for polarity formation and motility of chemotactic cells

研究代表者

上村 陽一郎 (Kamimura, Yoichiro)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：20321599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：走化性とは、細胞が示す細胞外化学物質の濃度勾配に沿った細胞運動の総称で、白血球が感染部位に集まるのがその代表例である。このような細胞では形態的に顕著な前後軸をもち、効率の良い細胞運動がおこなう。本研究ではこれらの分子基盤を探索し、低分子量Gタンパク質を介したTorC2-PDK-PKB (TPP) モジュールが細胞外シグナルのない状態でも活性化し、いわゆる自己組織化能をもつことで自発運動を制御し、これが走化性の細胞運動において重要であることを示した。また、その背後にある細胞膜上での分子動態の一端も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chemotaxis is directional motility along chemical gradients and observed in many biological situations, such as neutrophil migration to the infected site. Chemotactic cells have a typical polarized morphology with the distinct front and back, which is required for efficient motility. In this study, we found that the small GTPase-mediated TorC2-PDK-PKB (TPP) module is activated independently of external signals, known as self-organization ability important for cellular motility in chemotaxis. Also, its underlying molecular dynamics on the plasma membrane were analyzed.

研究分野：生物学

キーワード：走化性 細胞極性 細胞運動 低分子量Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

走化性とは細胞が示す化学物質への遊走性であり、多細胞生物の発生、ガン細胞の転移、多くの自己免疫疾患など生理学的、病理学的に重要である。動物では感染あるいは炎症部位への白血球の走化性が古くより知られており、そのモデルとして細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) が精力的に解析され、多くの知見を与えてきた。これまでの研究から走化性は (1) 化学物質の濃度勾配の認識 (センシング)、(2) 細胞運動、(3) 細胞極性の形成の3つの粗過程から構成され、これらの分子機構の解明が進められていた (図1)。

細胞性粘菌は走化性物質である cAMP によって一連の走化性シグナル伝達経路が活性化される。ホスファチジルイノシトール (3,4,5) トリスリン酸 (PIP₃) は PI3 キナーゼと PTEN フォスファターゼによって制御されるイノシトールリン脂質でこの経路は走化性に重要であるものの、それ以外にパラレルな経路の存在が示唆されていた。申請者は cAMP 刺激により生じる細胞内リン酸化反応を指標に TorC2 (ラパマイシン非感受性複合体キナーゼ) - PDK-PKB (Protein Kinase B) キナーゼ (以下 TPP モジュール) を中心とした新規シグナル伝達系が走化性に関与することを示した。つまり、cAMP が二つの異なる PKB キナーゼ、PKBA、PKBR1 を PIP₃ 依存的、非依存的に活性化し走化性を制御していることを示した。この結果はなぜ、PIP₃ 合成酵素である PI3K 変異株では走化性はほぼ正常だが、PIP₃ 分解酵素である PTEN 変異株で走化性能が極端に低下するかをうまく説明できた。つまり、PTEN 変異株では PIP₃ 依存的 PKBA が過剰に活性化され正常な走化性を阻害するが、PI3K 変異株では TPP 経路が正常に機能し走化性を制御していると考えられた。

さらに、cAMP による TPP モジュールの活性化機構を検討した結果、TORC2 は低分子量 G

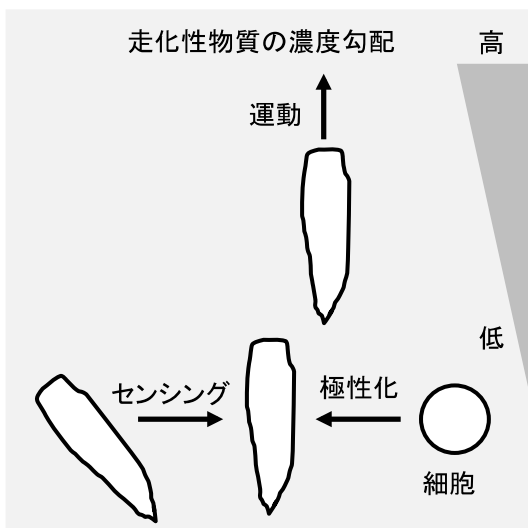


図1. 走化性を構成する3つの粗過程 (センシング、運動、極性化)

RasC により制御されていることがわかった。また、恒常的活性化変異 RasC (Q62L) の解析から TPP 経路の適切な時空間制御が走化性に必須であることがわかった。

このような一連の解析を通して、走化性における TPP 経路の重要性とその全体像が明らかになりつつあった。そこで、TPP 経路の研究をさらに推進すれば、細胞運動や細胞極性の形成についてその分子機構が明らかになると期待された。

2. 研究の目的

(1) 細胞極性の形成機構

cAMP の濃度勾配下で細胞は、運動方向の前方で重合アクチン、PIP₃、TPP モジュールなどを局所的に蓄積、活性化する。このような細胞極性は効率のよい走化性に必須であるが、その形成機構は明らかでない。TPP 経路を制御する RasC は現在のところ走化性シグナル伝達経路の最上流で上記のような特徴的な局在を示す分子であり、RasC の活性制御の分子機構を解明することで、細胞極性の理解につなげることを目的とした。

(2) TPP モジュールの自己組織化と自発運動への関与

PIP₃ 合成は細胞内で自己組織化する。自己組織化とは反応の均一性が破れ、空間的な秩序構造が現れることである。例えば、PIP₃ は細胞外刺激の無い増殖期の細胞膜上で自発的に合成、分解される。また、やはり細胞外刺激の無い環境で細胞のアクチン骨格を破壊すると細胞膜上の PIP₃ 合成が波のように伝わるダイナミクスが観察される。このような自己組織化は細胞の自発運動にとって重要であると考えられる。そこで、PIP₃ と並走する TPP モジュールも細胞外刺激の無い状態で自発的に活性化、つまり自己組織化される可能性が高く、この可能性を検討した。

(3) 細胞運動を制御する TPP モジュールの下流因子

細胞運動には運動方向の細胞前端で仮足が形成される必要がある。仮足形成に必要な重合アクチン制御因子について多くの研究がなされてきたが、その形成機構は明らかでない。TPP 経路に欠損がある細胞では細胞運動に異常をきたすことから、この経路における仮足形成の分子実態をさぐることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、動物細胞の白血球とともに、走化性のモデルとして最もよく研究されている細胞性粘菌を対象にした。細胞性粘菌は、ハプロイドゲノムをもつ土壌細菌で、遺伝子破壊などの遺伝学的操作や、生化学的、細胞生物学的実験を容易におこなえる生き物である。この細胞は飢餓状態になると、自ら分泌する cAMP を走化性物質とし顕著な走化性

応答を示す。cAMP は G タンパク質共役受容体を介して三量体 G タンパク質を活性化し、その下流に複数あるシグナル伝達経路にシグナルを伝える。最終的に、細胞は細胞外の cAMP 濃度勾配情報を読み取り、cAMP のより高い方向へと効率よく移動する。

4. 研究成果 (図2 参照)

(1) 細胞極性の形成機構

細胞を一様な cAMP で刺激すると RasC の活性化は一過的におこり cAMP の存在にもかかわらずダウンレギュレーションされる。このような反応は適応反応と呼ばれ、細胞極性形成の理解に直結することが示唆されていた。適応反応に関する理論的研究からは、Local Excitation and Global Inhibition (LEGI) モデルが提唱されており、ここでは cAMP 刺激後、活性化因子に引き続き不活性化因子が少しの時間遅れを伴い出現することで一過性の活性化を実現すると予想されている。

RasC の活性化制御を理解するため、活性化あるいは不活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) や GTPase 活性化タンパク質 (GAP) を探索した。まず細胞内から野生型の RasC あるいは恒常的活性変異をもつ RasC(Q62L) タンパク質を精製し、結合するタンパク質を質量分析により同定した。RasC(Q62L) タンパク質に特異的に結合するタンパク質は見出されなかったものの、野生型の RasC には複数のタンパク質の結合が見出された。ただし、これらの中に GEF あるいは GAP ドメインを含むタンパク質は存在しなかった。そこで次に、RasC タンパク質をビーズ上に固定し、ここに細胞性粘菌の細胞抽出液を混合し、特異的に結合するタンパク質を調べた。この際、グアノシン二リン酸 (GDP) あるいはグアノシン三リン酸 (GTP) を同時に添加し、不活性化型、あるいは活性化型 RasC を模倣した。ビーズからの溶出液を電気泳動で分離し、比較した結果、複数の結合因子を見出すことができた。しかし、GDP あるいは GTP 依存的に結合しているタンパク質はなかった。これらの事実は RasC とそれらの制御因子、あるいはエフェクターとの結合が非常に弱いことを示唆している。

TPP 経路の上流で働く LEGI の活性化機構はいまだ明らかではないが、さまざまな知見よりその local excitation には三量体 G タンパク質が重要であると示唆されている。そこで、TPP 経路の適応反応をさらに理解するために、三量体 G タンパク質と相互作用する因子を探索した。その結果、Pleckstrin Homology (PH) ドメインをもつ新規の因子を同定に成功した。この因子は三量体 G タンパク質と PH ドメインと異なる C 末端側領域で結合をしていた。この因子の破壊株を作製し解析したところ、栄養飢餓によって誘導される多細胞体形成の初期過程において、十分な数の細胞が集まれないことがわかった。この細胞では、細胞極性の形成に弱く異常をきたしており、

細胞運動の効率が低下していた。さらに、高濃度の走化性物質における走化性応答が著しく低下しており、細胞外の濃度勾配を適切に処理することができないことがわかった。次に、この因子が三量体 G タンパク質にどのように作用するかを検討した。そこでわかったことは、三量体 G タンパク質は通常細胞膜上で機能するものの、その一部は細胞質中にも存在しており、この細胞質プールをつくるのに、この因子が必要であることがわかった。つまり、この因子は、三量体 G タンパク質の細胞内局在を制御することで、高濃度域における走化性応答が正常におこるように働くことがわかった (論文投稿準備中)。

(2) TPP モジュールの自己組織化と自発運動への関与

TPP モジュールの自己組織化能は、PKB のリン酸化を指標に検討した。その結果、細胞外シグナルがない状態においても、TPP モジュールは細胞の一部で活性化していることがわかった。また、活性型 RasC(Q62L) を発現した細胞では TPP モジュールが細胞膜上で広範囲にわたって活性化され、細胞運動にも異常がでた。さらに、この自己組織化能に PIP₃ モジュールが関与している可能性を PI3 キナーゼの阻害剤を使って調べたところ、薬剤の影響は全くなかった。つまり、細胞は少なくともこれら両モジュールを独立に活性化させることで、細胞の自発運動を制御していることを示唆している。走化性物質の濃度勾配はこのような自己組織化するモジュールを空間的にバイアスし方向性のある運動を実現すると考えられており、今回はその一端を明らかにすることができた。ただし、細胞内に複数の自己組織化モジュールが存在する生理学的意義や、それらの同調性を含む関係などはわかっておらず、今後の更なる解析が

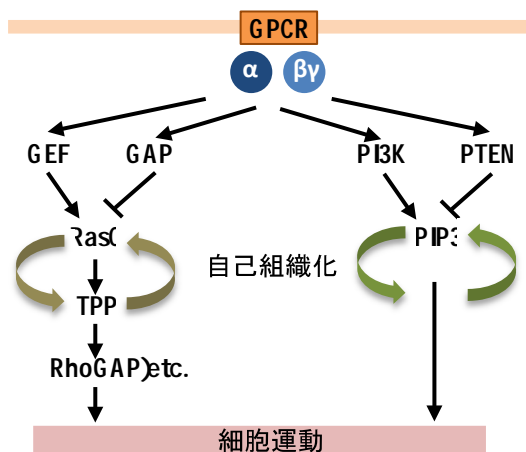


図2. 走化性における細胞運動の制御。走化性物質はGタンパク質共役受容体 (GPCR)を介して三量体Gタンパク質を活性化する。下流では自己組織化能をもつ TPP (TorC2-PDK-PKB) 経路やPI3経路が細胞運動を制御する。TPPモジュールの自己組織化にはRasCが活性化因子として働く。

待たれる。

次に、TPP モジュールがどのように自発運動に関わるかを調べるため、生細胞における活性化ダイナミクスを一分子イメージング法により調べた。まず、野生型 RasC と活性化型 RasC(Q62L)に有機蛍光色素であるテトラメチルローダミンを Halo タグを介して結合し、全反射顕微鏡を用いて解析した結果、どちらの分子とも細胞膜上で3つの異なる拡散係数(単位: $\mu\text{m}^2/\text{s}$) (野生型; 0.288, 0.0192, 0.00148; 活性化型; 0.292, 0.0131, 0.00067)をもつことがわかった。活性化型 RasC は野生型に比べて最も遅い拡散係数により遅く、この状態が下流の TorC2 キナーゼを活性化している状態であることが推定された。つまり、RasC は GDP から GTP 結合型に変換することで細胞膜上での拡散を遅くし、それによって限定された領域での自己組織化に関与していることが考えられた。

(3) 細胞運動を制御する TPP モジュールの下流因子

申請者は PKB の基質として未解析の因子 4 つを含む 8 つを同定しており、これらがアクチン重合を制御する可能性が高い。そこで、未解析のものについて遺伝子破壊株を作製した。その結果、RhoGAP ドメインをもつ因子の破壊株で、栄養飢餓によって誘導される発生過程の初期に異常がみられた。しかし、その表現型は、RasC や TorC2 と比べて弱く重複した機能をもつ未同定の PKB 基質が存在することが示唆された。

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)

[学会発表](計9件)

Yoichiro Kamimura

Search for chemotactic signaling network and identification of a novel interactor of trimeric G proteins in Dictyostelium discoideum
Gordon research conference, "directed Cell Migration"
2015. 01.25. Hotel Galvez (Galveston, USA)

上村 陽一郎

走化性における濃度勾配情報認識に関与する新規三量体 G タンパク質結合因子 Gip1 の解析
第37回日本分子生物学会年会
2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

上村 陽一郎

Gip1 による三量体 G タンパク質を介した走化性の役割
第4回日本細胞性粘菌学会例会
2014年10月11日、東北大学(宮城県・仙台市)

Yoichiro Kamimura

A novel heterotrimeric G-proteins interacting protein (Gip1) and its function in chemotaxis

Annual International Dictyostelium Conference 2014

2014. 08. 03. Seminaris Hotel Potsdam (Potsdam, Germany)

上村 陽一郎

新規三量体 G タンパク質結合因子の走化性における役割

細胞とシステムの動態と理論 VI

2014年04月03日、理化学研究所(埼玉県・和光市)

上村 陽一郎

新規三量体 G タンパク質結合因子の走化性における役割

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月03日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

上村 陽一郎

走化性シグナル経路を制御する新規因子の同定

第3回日本細胞性粘菌学会例会

2013年10月13日、京都大学(京都府・京都市)

Yoichiro Kamimura

Protein interactions between the chemotactic signaling proteins of Dictyostelium discoideum

Gordon research conference, "directed Cell Migration"

2013. 01.20. Hotel Galvez (Galveston, USA)

上村 陽一郎

走化性を制御するシグナル伝達経路のネットワーク構成

第35回日本分子生物学会年会

2012年12月14日、マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 陽一郎 (Kamimura Yoichiro)
理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員
研究者番号: 20321599

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし