

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770127

研究課題名(和文) Dorsal ruffle形成におけるDOCK180の時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Spatio-temporal analysis of DOCK180 during dorsal ruffle formation

研究代表者

實松 史幸 (SANEMATSU, FUMIYUKI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80381094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：刺激に伴い細胞は、Racを活性化させPeripheral ruffleとDorsal ruffleという2つの異なるラッフル膜を形成するが、Dorsal ruffleのメカニズムは不明な部分が多い。本研究において、Rac活性化分子DOCK1(DOCK180)はDorsal ruffleの形成に必須な分子であり、細胞膜上のホスファチジン酸への膜局在化がDorsal ruffle形成に重要であることを見出した。このことより、DOCK1がDorsal ruffleを形成するための新規局在化機構の存在とそれらの時空間的制御機構について明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Activation of receptor tyrosine kinases leads to the formation of two different types of plasma membrane structures: peripheral ruffles and dorsal ruffles. Although the formation of both ruffle types requires activation of the small GTPase Rac, the difference in kinetics suggests that a distinct regulatory mechanism operates for their ruffle formation. DOCK1(DOCK180) and DOCK5 are atypical Rac activators and are both expressed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). We found that DOCK1 deficiency alone impaired dorsal ruffle formation in MEFs. DOCK1 bound to phosphatidic acid (PA) through the C-terminal polybasic amino acid cluster and was localized to dorsal ruffles. In addition, we show that phospholipase D, an enzyme that catalyzes PA synthesis, is required for PDGF-induced dorsal, but not peripheral, ruffle formation. These results indicate that the phospholipase D-PA axis selectively controls dorsal ruffle formation by regulating DOCK1 localization.

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：ラッフル膜形成 Rac活性化分子 DOCK180

1. 研究開始当初の背景

刺激に伴い細胞は、Rac の活性化を介して、Peripheral ruffle と Dorsal ruffle という異なるラッフル膜を形成する。従来、Dorsal ruffle は Peripheral ruffle の延長線上にあるものと位置づけられてきたが、近年 Rab5, WAVE-1, Actinin-4 等 Dorsal ruffle 形成を特異的に制御する分子が同定されるに至り、(Nature 429: 309-314, 2004; Dev. Cell 5: 595-609, 2003; J Cell Sci. 113: 3329-3340, 2000)、Dorsal ruffle 形成は Peripheral ruffle と異なるシグナル伝達系で制御されていると考えられるようになった。

Dorsal ruffle の機能的意義は十分に解明されたとは言えないが、細胞外マトリックスへの浸潤を制御することが示唆されている (Dev. Cell 5: 595-609, 2003)。それゆえ、Dorsal ruffle 形成を制御するシグナル伝達系を明らかにすることは、がん細胞の浸潤・転移の過程を理解する上で重要だと考えられる。

CDM ファミリーは線虫からヒトに至るまで進化的に保存された分子であり、低分子量 G タンパク質の上流で機能することで、細胞骨格の制御にかかわっている。CDM ファミリーに属する Rac 活性化分子として、広範囲の細胞に発現している DOCK1(DOCK180)が知られている。現在まで培養細胞株を用いた解析より、DOCK1 は細胞運動、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 (Cell 107: 27-41, 2001; Nat. Cell Biol. 2: 899-905, 2000; Nature 424: 461, 2003)。申請者は DOCK1 欠損マウスを作製することで、血管内皮細胞上における DOCK1 は CXCR4 の下流に位置し Rac を活性化させ、心臓発生および血管形成に重要な役割を果たしていることを報告した (Circ. Res. 107: 1102-1105, 2010)。さらに、DOCK1 欠損マウスの初代線維芽細胞を用いてシグナル伝達経路機構の解析を行ったところ、DOCK1 は Dorsal ruffle 形成に必須な分子であることを見出した。また、MEF には同じく Rac 活性化分子である DOCK ファミリー分子の 1 つである DOCK5 も発現しており、その両者の間の機能的差異についても検討が必要であった。

2. 研究の目的

2 つのラッフル膜である Dorsal ruffle 及び Peripheral ruffle のうち、Dorsal ruffle の研究は未だ不明な点が多かった。しかしながら、DOCK1 欠損 MEF の解析により、DOCK1 は Dorsal ruffle 形成機構に関与することがわかった。また、申請者は DOCK1 が Dorsal ruffle 部位に集積することを、GFP 融合タンパクによって確認した。従来より DOCK1 は PIP3 依存的な膜局在化がシグナル伝達機構に必要なと考えられてきたが、その局在化シグナルドメインである DHR-1 部位を欠損しても膜への集積は障害されないことから、

DOCK1 は別の新局在化機構があると示唆された。本研究では DOCK1 が Dorsal ruffle 形成機構に関与することに焦点を当て、それらの詳細な分子機構について解明を目指した。

本研究は、DOCK1 欠損マウスを始めとして種々のノックアウトマウスを用いた遺伝学的アプローチをとりながら、「Dorsal ruffle 形成における DOCK1 の時空間的制御機構」を分子レベルで研究を行った。本研究課題においては、DOCK1 が関与する Dorsal ruffle 形成機構を解析することで、さらにはがん細胞浸潤過程の機序解明を目指した。

3. 研究の方法

1) DOCK1 及び DOCK5 欠損 MEF を用いて、それぞれの分子が Dorsal ruffle 形成に関与するかを検討した。Dorsal ruffle 形成を制御する DOCK1 の機能ドメインの決定するため、DOCK1 欠損 MEF 細胞に DOCK1 の各機能ドメインを欠損させた変異体 (Δ DHR-1, Δ DHR-2, Δ C113, Δ C254) を発現させ Dorsal ruffle 形成の回復を検討した。

2) WT MEF 細胞に DOCK1 の GFP-融合変異体を発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて Dorsal ruffle 部位への集積度合いを定量化して検討した。さらに DOCK1 の種々の領域を欠損させた GFP-DOCK1 変異体で、GFP の集積度合いを観察定量化した。

3) ホスファチジン酸 (PA) 含有 liposome を用いた pull down assay により、DOCK1 の様々な欠失変異体を用いて DOCK1 の PA 結合ドメインを検討した。結合ドメインを絞ったのは、その部位の recombinant タンパク質を作製し、pull down assay にて、PA と結合ドメインが in vitro で直接結合するかを確認し、ドメインを決定した。

4) DOCK1 及び DOCK5 を 293T 細胞に発現させ、それらの細胞溶液を用いて PA 含有 liposome で Pull down を行い、DOCK1 及び DOCK5 間の PA 結合能を比較検討した。DOCK1 の PA 結合部位を DOCK5 のアミノ酸と入れ替えた変異体を作製し、PA 含有 liposome で Pull down を行い、DOCK1 の PA 結合能を比較解析した。また、ホスファチジン酸の局在マーカー (SOS-PH-GFP) を用いることで、Dorsal ruffle と局在マーカーが共局在するかどうかを蛍光顕微鏡で検討した。

6) PA 産生酵素 PLD1 及び PLD2 の KO マウスより初代線維芽細胞 (MEF) を単離し、PDGF 刺激下において Dorsal ruffle の頻度が減少するかどうかを観察した。また、放射性物質をもちいて細胞のリン脂質をラベル

し、細胞を PDGF 刺激後、細胞内で産生される脂質を薄層クロマトグラフィーにて測定して、PA の産生と Dorsal ruffle 形成のタイムコースとの相関を検討した。

6) Dorsal ruffle と DOCK1 の浸潤の関連性を検討した。Dorsal ruffle 形成が起こらない DOCK1 欠損 MEF を用いてマトリゲルへの浸潤過程を評価解析した。

4 . 研究成果

1) DOCK1 及び DOCK5 欠損 MEF を用いることで、DOCK1 は Dorsal ruffle 形成に必須であるのに対し、DOCK5 は Dorsal ruffle 形成には必要ないことがわかった。また、それぞれの GFP 融合タンパク質を用いることで、DOCK1 及び DOCK5 の Dorsal ruffle 部位への集積度合いを定量測定した結果、DOCK1 は Dorsal ruffle 部位に特異的に集積するのに対し、DOCK5 は Dorsal ruffle 部位に集積しないことがわかった。

2) DOCK1 の様々な変異体を用いて集積度合いの定量測定を行ったところ、DOCK1 の C 末 254 残基を欠損させると Dorsal ruffle 部位に集積しないことがわかった。

3) DOCK1 と DOCK5 のアミノ酸比較解析の結果、DOCK1 は DOCK5 と違い C 末側に polybasic 部位を持つことを持ち、その部位を介してイノシトールリン脂質のホスファチジン酸 (PA) と結合することを見出した。

4) チロシンキナーゼ受容体の下流で、PLD1 及び PLD2 が活性化して PA を産生することが Dorsal ruffle 形成に重要であることを阻害剤および PLD1/2 KO マウスの解析より見出した。

5) DOCK1 欠損 MEF を用いて、PDGF 刺激下でマトリゲルへの浸潤を評価したところ、野生化と比較して DOCK1 欠損 MEF は有意に浸潤の減少が見られた。

以上より、DOCK1 とホスファチジン酸の会合により細胞膜へと移行する DOCK1 の局在化機構が Dorsal ruffle 形成に重要であることを見出し、DOCK1 の新たな時空間的制御機構を解明することができた。

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 5 件)

Sakai, Y., Tanaka, Y., Yanagihara, T., Watanabe, M., Duan, X., Terasawa, M., Nishikimi, A., Sanematsu, F., Fukui, Y.

The Rac activator DOCK2 regulates natural killer cell-mediated cytotoxicity in mice through the lytic synapse formation. *Blood*. 122(3):386-93, 2013. 査読有り

Sanematsu, F., Nishikimi, A., Watanabe, M., Hongu, T., Tanaka, Y., Kanaho, Y., Côté, J.F., Fukui, Y. Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. *J Biol. Chem.* 288(12):8092-100, 2013. 査読有り

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(9):e46277, 2012. 査読有り

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(4):488-97, 2012. 査読有り

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, J.V., Kinashi, T., Fukui, Y. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood*. 119(19):4451-61, 2012. 査読有り

{ 学会発表 } (計 1 件)

實松 史幸, 錦見 昭彦, 渡邊 真裕紀, 本宮 綱記, 田中 芳彦, 金保 安則, Jean-Francois Cote, 福井 宣規, Dorsal ruffle 形成時における DOCK1 の役割とその制御, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.12, 福岡

{ 産業財産権 }

なし

{ 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

實松 史幸 (SANEMATSU FUMIYUKI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80381094