

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08309

研究課題名(和文)白血球の遊走方向を制御する細胞極性蛋白質複合体の作用機構

研究課題名(英文) Regulation of directional movement during leukocyte chemotaxis by cell polarity proteins

研究代表者

鎌倉 幸子 (KAMAKURA, Sachiko)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：80398081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：白血球の一種である好中球は、体内に外来微生物が侵入すると直ちに駆けつけ、貪食・殺菌を行う、哺乳類の生命に必須の細胞である。この細胞の遊走過程は「ケモタキシス(走化性)」と呼ばれ、ケモタキシスが適切に起こるためには「方向の決定」と「運動性の亢進」が必要である。特に「遊走方向」を制御する機構については不明な点が多い。私たちは最近、好中球の遊走方向を制御するGPCR下流の新しいシグナル経路を明らかにした。本研究は、この新規なGPCRシグナルの下流で、細胞極性制御因子が好中球の遊走方向をコントロールする際のメカニズムの一端を明らかにした。

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 for pathogen killing. Although neutrophil chemotaxis requires not only increased motility but also directional movement, molecular mechanisms for directionality control have remained largely unknown.

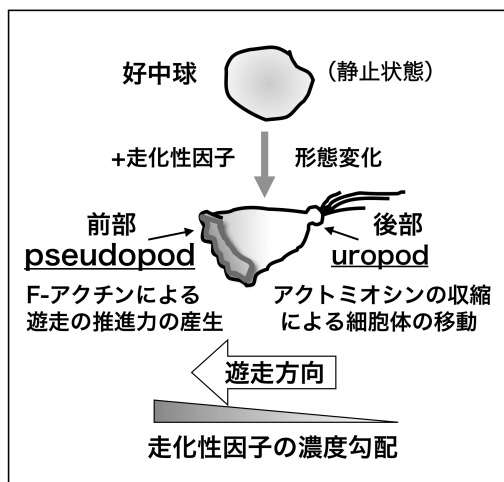
We have previously reported that Inscuteable protein regulates directionality of chemotaxing neutrophils by tethering chemoattractant-elicited trimeric-Gi-protein signaling to an evolutionarily-conserved Par-polarity-protein complex. Here, we have identified downstream regulators of the polarity complex for directionality control during neutrophil chemotaxis.

研究分野：細胞生物学、生化学

キーワード：ケモタキシス 好中球

1. 研究開始当初の背景

好中球を呼び寄せる拡散性の分子は「走化性因子」と呼ばれ、その濃度勾配に従った細胞の遊走を特に「ケモタキシス」と呼ぶ。ケモタキシスの際に好中球は、外来微生物の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、細胞はその差を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である微生物に「正確に」たどり着く。このように好中球のケモタキシスは巧妙なしくみを持つ生命現象であるが、その遊走方向の正確性を支える分子メカニズムについては不明な点が多い。



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(上図参照)。広がった形態の前部では pseudopod と呼ばれる突起が形成され、盛んなアクチン重合が遊走の原動力を産み出す。一方、後部はアクトミオシンの収縮力により細胞体を前へと押し出す。このような細胞の前(front)と後(rear)の形態と機能の非対称性を、front-rear polarity (polarity: 細胞極性)と呼ぶ。好中球がケモタキシスするためには「運動性」の亢進と「方向性」の制御が必要であるが、この front-rear の細胞極性は、好中球の「運動性」と「方向性」の両方に必要である。好中球の主な走化性因子の受容体は、すべて7回膜貫通型の受容体、すなわち GPCR である。面白いことにケモタキシスを誘導する走化性因子受容体のすべてが、3量体 G 蛋白質の Gi と特異的にカプラーする。受容体の活性化により Gi 上ではヌクレオチド交換反応が起き、G サブユニットが解離する(右図参照)。G は PI3K を活性化するが、これは「運動性」の亢進に必要である。この G 下流で「運動性」が制御されるしくみは比較的よく解明されている一方で、Gi サブユ

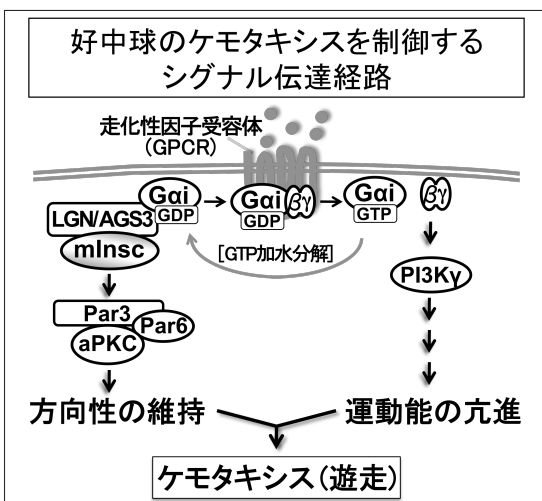
ニットの役割や、「方向性」を制御するしくみについては、ほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

私達は最近、好中球の遊走過程において mInsc というタンパク質が遊走方向を制御することを示した (Kamakura et al., Dev. Cell, 2013)。走化性因子により生じた遊離の (Gβγ と会合していない) GDP 結合型 Gi が好中球前方の pseudopod に集積し、それが mInsc のパートナー分子 LGN/AGS3 への結合を介し mInsc をリクルートすることを見出した(下図参照)。さらに、mInsc は進化的に保存された細胞極性制御因子群 Par3-Par6-aPKC 複合体の pseudopod へのリクルートに必要であり、mInsc ノックアウトマウス由来の好中球、あるいは aPKC 活性を阻害した好中球では、運動能は正常であるにもかかわらず、遊走方向に異常が見られた。これは pseudopod の伸張が走化性因子の方向に安定に維持されないことが原因であると考えられた。このように私達は、遊走方向の維持には、mInsc 依存的に pseudopod にリクルートされた aPKC のキナーゼ活性が必要であることを明らかにしたが、「pseudopod の伸長を維持するために aPKC がリン酸化する基質は何か」という問題が残されていた。そこで、本研究では、この aPKC の基質の同定し、私達が見出した「新しい GPCR シグナル」が好中球の遊走方向を制御する際の分子メカニズムの解明を目的とした。

< 引用文献 >

Kamakura S, Nomura M, Hayase J, Iwakiri Y, Nishikimi A, Takayanagi R, Fukui Y, Sumimoto H. The cell polarity protein mInsc regulates neutrophil chemotaxis via a noncanonical G protein signaling pathway. Dev. Cell 2013; 26:292-302



3. 研究の方法

mass spectrometry による aPKC 結合タンパク質の同定：好中球細胞内で aPKC と結合する蛋白質を mass spectrometry を用いて同定を行った。好中球は遺伝子導入効率が低いため、細胞に過剰発現させたタンパク質を免疫沈降するという方法は難しい。そこで、GST タグを付加した aPKC と Par6 とを大腸菌内で共発現し精製した。この精製蛋白質と、好中球の cell lysate を用いて pull-down を行った。

リン酸化の検討：mass spectrometry 解析によって得られた Par6-aPKC 結合蛋白質の候補について、実際に aPKC の基質としてリン酸化されるかどうかを抗リン酸化 Ser 抗体や、phos-tag を用いるなどの方法で検討を行った。

基質候補タンパク質と aPKC-Par6 の結合：リコンビナント蛋白質を用いた pull-down assay や、HEK293 細胞を用いた免疫沈降実験を行い、基質候補のタンパク質と Par6-aPKC の結合を検討した。

3次元環境下での遊走：好中球が実際に生体内で遊走する際には、主にコラーゲンなどで構成される間充組織を通り抜ける。このような「場」は、溶液中よりも走化性因子の勾配をずっと安定に保つというメリットがある一方で、コラーゲンのような複雑な編み目構造を通り抜けるためには、「細胞極性」の維持がより重要になると考えられる。そこで、市販の transwell chamber にコラーゲンを充填し、ケモタキシスの効率を検討した。

タンパク質の細胞内局在を調べるために前述の Zigmond chamber を用いてケモタキシスをさせた好中球を固定し、抗体を用いて細胞染色を行った。また、GFP 融合蛋白質のタイムラプス撮影も行った。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動くことから、固定細胞での観察には限界がある。そこで GFP を融合させたタンパク質をそれぞれ好中球に導入し、タイムラプス撮影を行った。ごく微量の走化性因子の入った micropipette (先端の直径が 1 μm 弱のガラスキャピラリー) を近づけると、局所的に形成された走化性因子の濃度勾配に従い、好中球が micropipette の先端に向かって遊走する。その際の GFP 融合蛋白質の局在の変化を撮影し観察を行った。

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 を用いた。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ガラスチャンバーで、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。F-アクチンの集積 (= pseudopod の形成) を細胞染色を行い観察することで、好中球に正常な極性形成能があるかどうか、濃度勾配の高い方向へ正しく pseudopod を向けるかどうか検討した。

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を行った。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) の算出を行った。「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。

4. 研究成果

前述の方法で、好中球の cell lysate を用いた mass spectrometry により、aPKC 結合タンパク質の同定を行ったところ、候補タンパク質として種々のアクチン細胞骨格制御因子を見出した。リン酸化の解析を行ったところ、それらの候補タンパク質のうち、p160 protein が非常に効率良く aPKC によってリン酸化されることが分かった。このタンパク質のカルボキシ末端には、aPKC によるリン酸化のコンセンサス配列が複数箇所存在しており、この領域が aPKC と結合する領域であること、さらにこの領域が aPKC により実際にリン酸化を受けること等が明らかになった。また、コラーゲンをを用いた 3次元 transwell assay などのケモタキシス解析を行ったところ、p160 の機能を阻害した好中球では、遊走の効率が著しく低下することが分かった。また、この好中球の遊走過程をタイムラプス撮影により観察したところ、pseudopod が著しく伸展し異常に広がった形態が観察された。このことから、p160 が pseudopod の伸長 (すなわち F-actin の伸長) に対し、抑制的に働くことで、好中球の遊走を制御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)

[雑誌論文](計 5 件)

Chishiki K, Kamakura S, Hayase J, Sumimoto H.
Ric-8A, an activator protein of Gai, controls mammalian epithelial cell polarity for tight

junction assembly and cystogenesis.
Genes Cells 22: 293-309 (2017)
doi: 10.1111/gtc.12477. (査読有り)

Chishiki K, Kamakura S, Hayase J, Yuzawa S, Sumimoto H.

Ric-8A-mediated stabilization of the trimeric G protein subunit G α i is inhibited by pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 483: 941-945 (2017)

doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.036. (査読有り)

Kawamoto M, Onishi H, Ozono K, Yamasaki A, Imaizumi A, Kamakura S, Nakano K, Oda Y, Sumimoto H, Nakamura M.

Tropomyosin-related kinase B mediated signaling contributes to the induction of malignant phenotype of gallbladder cancer.

Oncotarget. 8: 36211-36224 (2017)

doi: 10.18632/oncotarget.16063. (査読有り)

Ishibashi R, Kozuki S, Kamakura S, Sumimoto H, Toyoshima F.

c-Rel Regulates Inscuteable Gene Expression during Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation.

J. Biol. Chem. 291: 3333-3345 (2016)

doi: 10.1074/jbc.M115.679563. (査読有り)

Yuzawa S, Kamakura S, Hayase J, Sumimoto H.

Structural basis of cofactor-mediated stabilization and substrate recognition of the α -tubulin acetyltransferase α TAT1.

Biochem. J. 467: 103-113 (2015)

doi: 10.1042/BJ20141193. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

鎌倉 幸子, 住本 英樹: 好中球の遊走方向を制御する GPCR からの新しいシグナリング経路

第 27 回 日本生体防御学会学術総会

2016 年 7 月 7~9 日、福岡

知識 嘉奈子, 鎌倉 幸子, 早瀬 純也, 住本 英樹: 百日咳毒素は G α i と Ric-8A の結合を阻害することにより G α i のタンパク質レベルを減少させる

BMB2015 (第 38 回 日本分子生物学会年会・

第 88 回 日本生化学会大会 合同大会)

2015 年 12 月 1~4 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔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 (KAMAKURA Sachiko)

九州大学大学院・医学研究院・講師

研究者番号: 80398081

(2) 研究分担者:

()

研究者番号:

(3) 連携研究者:

()

研究者番号:

(4) 研究協力者:

()

研究者番号: