

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570191

研究課題名（和文） 細胞運動時の極性形成における ARF の役割

研究課題名（英文） Roles of ARF in polarity formation during cell migration

研究代表者

真崎 雄一（MAZAKI YUICHI）

熊本大学・大学院先端機構・特任助教

研究者番号：60311304

研究成果の概要：細胞運動は、我々の身体の至る所で見られ、それらは厳密にコントロールされており、一旦、異常が起こると、我々の身体に重篤な障害をもたらす。このように、細胞運動は、重要な生命現象であり、その仕組みが明らかになれば、病気の治療や解明といった様々な恩恵を我々は得ることができると期待される。近年の研究によって、細胞の移動の仕組みは明らかになりつつあるものの、移動の前段階である極性形成については、不明な点が多い。本研究では、この点に注目し、免疫細胞の一つである好中球の細胞に關与する分子を調べた。その結果、細胞内輸送に關与する GBF1 が、好中球の細胞運動に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞運動、ARF、好中球

1. 研究開始当初の背景

細胞運動は、様々な生命活動で観察される現象であり、その分子メカニズムを明らかにすることは、形態形成過程や免疫応答などの正常な生命活動に加え、癌細胞の浸潤過程など、様々な病気の過程を理解するうえでも重要であると考えられる。外界から刺激があると、細胞は、刺激の方向を認識し、刺激の方

向に移動できるように前後の極性を形成し、移動を開始する。この際、細胞内では、シグナル伝達、細胞骨格の再編、細胞内輸送、膜の再編など様々な変化が起こるが、これらの変化は、それぞれ独立して起こるものではなく、協調的かつ統合的に起こっていると考えられている。細胞運動の分子メカニズムに関しては、誘引物質に対するレセプターの同定、シグナル伝達機構の研究、細胞骨格タンパク

質の制御機構の研究などによって次第に明らかになりつつあるが、未だ不明な点が残っている。

これまでに、国内外の多くの研究グループが、シグナル伝達機構や細胞骨格の制御に注目し、細胞運動の研究を行ってきた。一方、近年になって、我々をはじめとするいくつかの研究グループが、ARF 及び、その制御因子を中心に、細胞運動における細胞内輸送の役割に着目し、研究を行っている。しかし、これまでのところ、ARF (ADP-ribosylation factor) 及び、その制御因子が、細胞運動時の極性形成に、いかに関わっているかについては、不明である。

これまでに我々は、1) マウスの骨髄から抽出した好中球を誘引物質の一つである FMLP (N-ホルミル-Met-Leu-Phe) で刺激すると ARF の活性が上昇すること 2) ARF の GAP (GTPase activating protein) ドメインを持つ GIT2 (G protein-coupled receptor kinase interactor 2) を欠損させたマウスから抽出した好中球では、FMLP で刺激しても、細胞の移動速度は正常な好中球と変わらないものの、刺激の方向への移動する細胞の割合が低下しており、さらに一定の方向へ継続して移動できる時間も短くなるため、全体として FMLP の刺激による細胞運動(ケモタキシス)が減少すること 3) siRNA によって GIT2 タンパク質の発現を抑制させた好中球様細胞(分化させた HL-60 細胞)に、ARF の GAP として機能しない GIT2 を発現させても、正常な GIT2 を発現させたように細胞運動(ケモタキシス)が戻らないことを見出している。

2. 研究の目的

上記のような背景から、ARF は、好中球の細胞運動(ケモタキシス)に深く関与していることが考えられる。本研究では、ARF に着目し、これまで明らかにならなかった細胞運動時の極性形成における ARF の役割を、好中球を用いて明らかにすると共に、その際の G タンパク質結合型レセプターから ARF の活性化までの制御機構を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的である「細胞運動時の極性形成における ARF の役割を明らかにし、その際の G タンパク質結合型レセプターから ARF の活性化までの制御機構を見出す」という目的を達するため、まず、遺伝子操作が容易なヒトの前骨髄性白血病細胞(HL-60 細胞)にジメチルスルフォキシド(DMSO)を加え、好中球様

細胞に分化させた細胞を用いて実験を行った。

(1) 極性形成機構に関わる ARF の検索

ヒトでは、ARF のアイソフォームが 5 種類存在することから、分化させた HL-60 細胞で、いずれの ARF のアイソフォームが発現しているのかを RT-PCR を用いて解析した。

の実験で発現が見られた ARF のアイソフォームを siRNA によって、発現を抑制し、FMLP の刺激の際、どの ARF のアイソフォームの発現を抑制した場合に、分化させた HL-60 細胞の細胞運動(ケモタキシス)に影響を及ぼすのかを調べた。

GGA (Golgi-localized, Gamma-ear-containing, Arf-binding protein)による pull-down 法を用い、の実験で発現がみられた ARF のアイソフォームのうち、FMLP の刺激によって、どの ARF のアイソフォームが活性化されるのかを調べた。

(2) 極性形成機構に関わる ARF の GEF の検索

ARF は、活性化因子である GEF (Guanine nucleotide exchange factor)によって活性化される。そこで、上記の実験で影響が見られた ARF のアイソフォームが、どの ARF の GEF によって活性化されるのかを調べた。具体的には、以下のように行った。

これまでヒトで明らかになっている 15 種の ARF の GEF のうち、いずれが分化させた HL-60 細胞に発現しているのかを RT-PCR を用い解析を行った。

の実験で発現が見られた、それぞれのタンパク質を siRNA によって、発現を抑制し、FMLP の刺激の際、どの ARF の GEF の発現を抑制した場合に、分化させた HL-60 細胞の細胞運動(ケモタキシス)に影響を及ぼすのかを調べた。

の実験で影響がみられた ARF の GEF の siRNA を用いて、タンパク質の発現を抑制し、FMLP 刺激による ARF の活性化状態を調べた。

の実験で影響がみられた ARF の GEF の FMLP 刺激による局在の変化を調べた。

(3) ARF の GEF の活性化機構の探索

FMLP の刺激によって ARF の GEF が活性化するためには、G タンパク質結合型レセプターから、そのシグナルが ARF の GEF へ伝わる必

要がある。好中球の細胞運動において、Gタンパク質結合型レセプターから細胞内に存在する分子への伝達様式として、PAK1 (p21-activated kinase 1)やホスファチジルイノシトール3-キナーゼ γ (PI3K γ)のようにGタンパク質のサブユニットであるG $\beta\gamma$ サブユニットと複合体を形成することによって活性化される場合と、Aktのように活性化されたPI3K γ によって産生されたホスファチジルイノシトール3,4,5三リン酸(PI(3,4,5)P₃)などと結合することによって活性化される場合の2つが報告されている。そこで、

分化させたHL-60細胞の細胞運動に影響を及ぼしたARFのGEFとG $\beta\gamma$ サブユニットとの複合体形成を調べた。

PI3K γ を特異的に阻害する5-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione(以下、PI-3K γ 阻害剤)で処理することによって、MLP刺激によるPI3K γ とARFの活性化の関係を調べた。

4. 研究成果

(1) 極性形成機構に関わるARFの検索

ARFのアイソフォームには、ARF1~ARF6の6つのアイソフォームが存在するが、ヒトではARF2が存在せず、ヒトには、ARF2を除く、5つのアイソフォームが存在することが知られている。そこで、分化させたHL-60細胞で、いずれのARFのアイソフォームが発現しているのかをRT-PCRを用い、解析した。

その結果、分化させたHL-60細胞には、5つのアイソフォームのいずれも発現しているが、特に、ARF3を除くARF1、ARF4、ARF5、ARF6が強く発現していることが明らかとなった。

の実験の結果、分化させたHL-60細胞には、ヒトに存在することが知られている5つのアイソフォームの全てが発現していることが明らかとなった。そこで、これら5つのアイソフォームの全てに対するsiRNAを作成し、MLPの刺激の際、どのARFのアイソフォームの発現を抑えた場合に、分化させたHL-60細胞の細胞運動(ケモタキシス)に影響を与えるのか調べた。

その結果、各々のアイソフォームに対する単独のsiRNAでは、分化させたHL-60細胞の細胞運動(ケモタキシス)に有意な変化が見られなかった。

当初は複数のアイソフォームのsiRNAを使用して影響を調べることを計画していたが、

5つ全てのアイソフォームが発現していたことから、組み合わせが多くなるため、先に、分化させたHL-60細胞の細胞運動に影響を与えるARFのGEFを調べることにした。

分化させたHL-60細胞には、5つのアイソフォームの全てが発現していたが、これまで作成された抗体の多くは、特異性が低く、他のアイソフォームを認識する。そこで、特異性が高いARF1とARF6の抗体を用いて、MLPの刺激によるARFの活性化状態を調べた。

その結果、ARF1は、Cdc42やRac1とほぼ同様にMLPの刺激30秒後に一過性に活性化され、90秒後には定常状態に戻るのに対して、ARF6は、MLPの刺激90秒後から活性化されることが明らかとなった。

(2) 極性形成機構に関わるARFのGEFの検索

まず、極性形成にかかわっているARFのGEFを調べるために、これまでヒトで明らかになっている15種のARFのGEFのうち、いずれが分化させたHL-60細胞に発現しているのかをRT-PCRを用い、解析した。

その結果、分化させたHL-60細胞には、BIG1、BIG2、Cytohesin-1/ARNO2、Cytohesin-2/ARNO1、Cytohesin-3/ARNO3/GRP1、Cytohesin-4/ARNO4、EFA6B、KIAA0522/BRAG1、ARF-GEP100/BRAG2、GBF1(Golgi-specific BFA resistance factor 1)の計10種のARFのGEFが発現していることが明らかとなった。

の実験の結果、分化させたHL-60細胞には、10種のARFのGEFが発現していることが明らかとなったため、それぞれのタンパク質の発現を抑えるsiRNAを作成し、MLPの刺激の際、どのARFのGEFの発現を抑えた場合に、分化させたHL-60細胞の細胞運動(ケモタキシス)に影響を与えるのか調べた。

その結果、複数のARFのGEFにおいて、そのsiRNAが、分化させたHL-60細胞の細胞運動(ケモタキシス)に影響を与えることを見出した。特に、GBF1は、最も細胞運動(ケモタキシス)に影響を与えることが明らかとなった[図1]。

の実験の結果、GBF1が、分化させたHL-60細胞の細胞運動(ケモタキシス)に最も影響を与えることが明らかとなったため、GBF1が、MLP刺激によるARFの活性化状態にも影響を与えているのか調べた。

その結果、siRNAによってGBF1の発現を低下させたものでは、ARF1の活性化が著しく低下していることが明らかとなった。一方、ARF6の活性化に対しては、ほとんど影響が見られなかった[図2]。

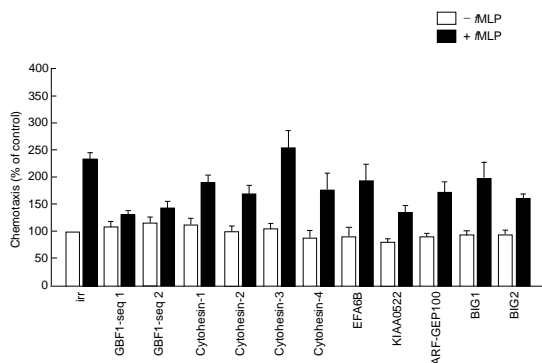


図1 ARFGEFのsiRNAに対する分化させたHL-60細胞の細胞運動(ケモタキシス)の影響

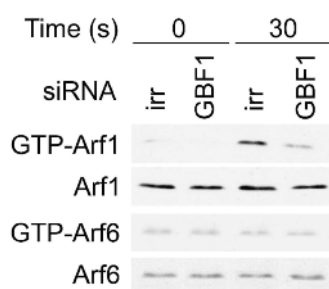


図2 ARFの活性化に対するGBF1の影響

GBF1は、主にゴルジ体に局在することが知られているタンパク質であり、これまでのところ、細胞運動との関係を述べた論文はない。そこで、その手掛かりを得るために、MPLによる刺激時の局在を調べた。

その結果、GBF1は、未刺激時には、主にゴルジ体に局在しているものの、MPLで刺激すると、細胞の前端部にも局在するようになることが明らかとなった[図3]。一方、異なったARFのGEFであるBIG1は、MPLの刺激を受けても、細胞の前端部には、ほとんど局在しないことから、この局在はGBF1に特異的な現象だと考えられる。

(3) ARFのGEFの活性化機構の探索

分化させたHL-60細胞の細胞運動に影響を及ぼしたGBF1と $G\beta\gamma$ サブユニットとの複合体形成を調べるために、GST(Glutathione-S-transferase)とGBF1との融合蛋白質を発現する遺伝子、Xpressタグを付けた $G\beta$ 及び $G\gamma$ 遺伝子の3種類を293T細胞へ遺伝子導入し、それぞれのタンパク質を発現させた後に、グルタチオンセファロースを用いて、GBF1及びそれに結合しているタンパク質を回収した。

その後、ウエスタンブロッティングを行い、Xpressタグで検出した。

その結果、GBF1と $G\beta\gamma$ サブユニットとの複合体形成は認められなかった。しかし、複数のタンパク質を介して、GBF1と $G\beta\gamma$ サブユニットとが複合体を形成している可能性も考えられることから、今後は、293T細胞にGBF1、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ タンパク質だけでなく、他のタンパク質も発現させるなど検討していく予定である。

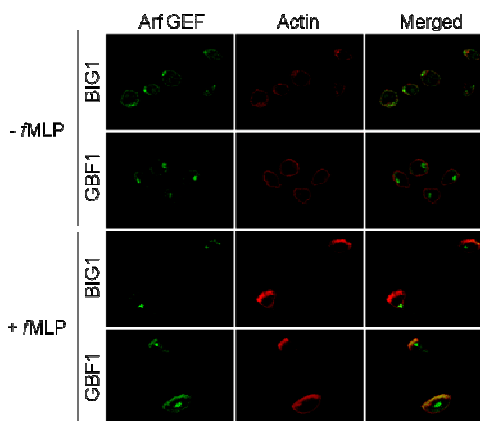


図3 MPLの刺激による局在の変化

MPL刺激による $PI3K\gamma$ とARFの活性化の関係を調べるために、 $PI-3K\gamma$ 阻害剤で処理し、その際のARF1の活性化の状態を調べた。

その結果、 $PI-3K\gamma$ 阻害剤で処理したものは、ARF1の活性が減少した。このことから、 $PI3K\gamma$ がARF1の活性化に関与すると考えられる。今後は、GBF1と $PI3K\gamma$ によって産生された $PI(3,4,5)P_3$ などが結合するののかについて検討していく予定である。

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)

Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., Wei, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Yano, H., Mazaki, Y., Kodama, H., Nio, Y., Manabe, T., Wada, H., Kobayashi, H., Sabe, H. GEP100 links epidermal growth factor receptor signaling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat. Cell Biol.* **10**: 85-92 (2008) 査読: 有

Yano, H., Kobayashi, I., Onodera, Y.,

Luton, F., Franco, M., Mazaki, Y., Hashimoto, S., Iwai, K., Ronai, Z., Sabe, H.

Fbx8 makes Arf6 refractory to function via ubiquitination.

Mol. Biol. Cell. **19**: 822-832 (2008) 査読：有

Nam, J.-M., Onodera, Y., Mazaki, Y., Miyoshi, H., Hashimoto, S., Sabe, H.

CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *EMBO J.* **26**: 647-656 (2007) 査読：有

〔学会発表〕(計 2件)

真崎雄一、Roles of Arf GTPases in neutrophil chemotaxis、第28回日本免疫学会総会、2008年12月1日、京都国際会議場

真崎雄一、Roles of Arf GEF in chemotaxis of neutrophils、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月12日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真崎 雄一 (MAZAKI YUICHI)

熊本大学・大学院先導機構・特任助教

研究者番号：60311304

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者