

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号：19790362
 研究課題名 (和文) 好中球の遊走における DOCK2 の動態制御と細胞極性形成の分子機構
 研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of DOCK2 dynamics and cell polarization during neutrophil migration.
 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：好中球は、感染源に由来する走化性因子を感知すると、走化性因子の方向に仮足を伸ばして運動することにより、感染局所に効率よく移動する。これまでに研究代表者は、走化性因子の方向への仮足伸張に、DOCK2 の細胞内局在制御が重要であることを明らかにした。本研究で、走化性因子刺激した好中球における DOCK2 の動態制御機構を解析したところ、まず、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸により DOCK2 が細胞膜直下に引き寄せられ、続いて産生されるホスファチジン酸により局所に集積することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,700,000	0	1,700,000
20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：細胞、好中球、遊走、極性、リン脂質

1. 研究開始当初の背景

好中球は高い運動性をもつ白血球であり、感染源に由来する走化性因子 (fMLP, C5a など) に応答して遊走することが知られている。この際、走化性因子に面した側の細胞膜直下で、局所的にアクチンの重合が促進されることで仮足が形成され、これが走化性因子に向かって運動するための原動力となっている。従来、このような局所的なアクチン重合を促す分子機構として、PI3 キナーゼ γ (PI3K γ) と Rac を介したシグナル伝達系の存在が提唱されてきた。すなわち、走化性因子が結合した受容体の直下で PI3K γ によりホスファチ

ジルイノシトール 3 リン酸 (PIP₃) が産生され、その下流で Rac が活性化されることにより、局所的にアクチン重合が促進されるというものである。

研究代表者はこれまでに、走化性因子に応答した好中球のシグナル伝達系において、PIP₃ の下流で Rac を活性化している分子が DOCK2 であること、また、遊走中の好中球において DOCK2 が先端端に集積することを明らかにしてきた。

一方、PI3K γ を欠損した好中球における DOCK2 の細胞内動態を詳細に検討した結果、走化性因子の刺激による DOCK2 の細胞膜への

移行は障害されているものの、局所への集積ならびに仮足の形成はほぼ正常であることを見いだした。このことから、好中球の遊走における DOCK2 の集積ならびに局所でのアクチン重合にともなう細胞極性の形成には、PI3K γ とは異なる分子により制御されていることが示唆された。

2. 研究の目的

上記の検討により、好中球の遊走における DOCK2 の集積ならびに細胞極性の形成において、PI3K γ およびその産物の PIP₃の関与が部分的なものであることが明らかになり、この他に何らかの因子が関わっていることが示唆された。本研究では、好中球における DOCK2 の細胞内動態を制御する未知の因子を同定し、この因子がどのような分子機構で DOCK2 の局在と細胞極性の形成を制御しているのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 種々の阻害剤存在下において、好中球の走化性因子刺激による DOCK2 の局在変化を観察し、DOCK2 の集積ならびに細胞極性形成が障害される阻害剤を探索した。

(2) 前項の検討により、DOCK2 の局所への集積ならびに細胞極性の形成が、ホスホリパーゼ D の活性によることが明らかになったため、PLD の過剰発現により、DOCK2 の細胞内局在が変化するかどうか、HEK293T 細胞を用いて検討した。

(3) PLD がホスファチジルコリンからホスファチジン酸 (PA) への変換を触媒する酵素であることから、好中球に直接 PA を取り込ませて、DOCK2 の局在や細胞極性に影響を与えるかどうか検討した。

(4) DOCK2 が PA と相互作用するか、また、するとすれば DOCK2 のどの領域で相互作用しているのかを検討するため、野生型あるいは一部の領域を欠損した DOCK2 を HEK293T 細胞に発現させ、その可溶化物について、PA を含むリポソームプルダウンアッセイで検討した。次に、DOCK2 が PA に直接相互作用するかどうか検討するため、PA と相互作用していると思われる DOCK2 の領域をリコンビナントタンパクとして作製し、同様のプルダウンアッセイを行った。そして、この領域のうち PA と相互作用している可能性の高い部分に関してアミノ酸に変異を入れ、相互作用している領域を特定した。

(5) 好中球の遊走における DOCK2 と PA の相互作用の意義を検討するために、DOCK2 欠損好中球に野生型あるいは変異型 DOCK2 を導入

し、細胞極性形成能や遊走能が回復するか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 種々のシグナル伝達因子存在下で、好中球を走化性因子で刺激した結果、ホスホリパーゼ D (PLD) の阻害剤である 1-butanol や 5-fluoro-2-indolyl des-clorohalopemide (FIPI) により、DOCK2 の局所への集積が障害され、細胞極性の形成が認められなかった。また、マイクロペットを用いて、局所より走化性因子を作用させたところ、野生型好中球では、DOCK2 の先端端 (細胞の進行方向に対して前縁部) への移行と走化性因子の方向に向かった仮足の形成が観察された。一方、上記の PLD 阻害剤存在下では、DOCK2 の先端端への移行は認められず、形成された仮足も薄く不完全なものであった。

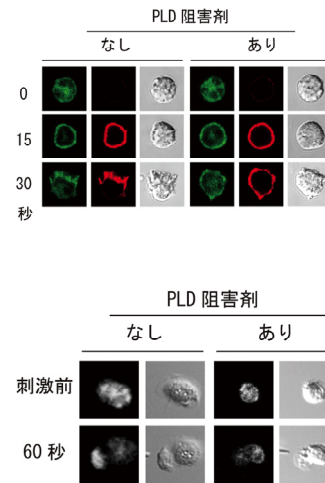


図 1 PLD 阻害剤存在下における好中球の DOCK2 の動態 (上) PLD 阻害剤 (FIPI) 存在下で、C5a 刺激した好中球における DOCK2 (緑) とアクチン繊維 (赤) の動態。(下) マイクロペットを用いた fMLP 濃度勾配存在下での細胞の形態と DOCK2 (白) の局在。

(2) 膜局在型 PLD である PLD2 を HEK293T 細胞に過剰発現させると、DOCK2 が部分的に膜に移行することが明らかになった。このことは、PA により DOCK2 の細胞内局在が制御されることを示している。

(3) 好中球にミセル状にした PA を取り込ませたところ、走化性因子で刺激した場合と同様に、局所でのアクチン重合による細胞の極性が観察された。他のリン脂質ではこのような現象は認められなかった。また、DOCK2 欠損好中球では、PA による細胞極性形成が見られなかったことから、PA が DOCK2 を介して細胞極性を制御していることが明らかになった。

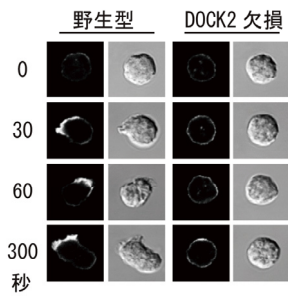


図 2 PA によるアクチン重合の促進と仮足の形成 野生型の好中球に PA を取り込ませると、アクチン重合ならびに仮足の形成が観察された。一方、DOCK2 欠損好中球では、PA を加えてもアクチン重合や仮足の形成は観察されなかった。

(4) 野生型 DOCK2 を発現させた HEK293T 細胞を、PA を含むリボソームでプルダウンしたところ、PA 依存的に DOCK2 がリボソームと共沈することが明らかになった。一方、C 末端領域を欠損した DOCK2 は、PA を含むリボソームと共沈しなかった。リコンビナントタンパクとして大腸菌で作製した DOCK2 の C 末端領域が、PA を含むリボソームと共沈し、PA が DOCK2 の C 末端領域に直接結合することが示された。HEK293T 細胞に発現させた全長 DOCK2 ならびにリコンビナント DOCK2-C 末端のいずれも、9 カ所のアミノ酸をアラニンに置換したところ、PA との会合は認められなかった。

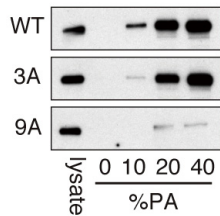


図 3 DOCK2 と PA の相互作用。野生型あるいは C 末端領域のアミノ酸を 3 カ所 (3A) あるいは 9 カ所 (9A) アラニンに置換した変異体について、様々な濃度の PA を含むリボソームでプルダウンした。

(5) 好中球遊走における DOCK2-PA 相互作用の意義を検討するため、DOCK2 欠損好中球に野生型あるいは PA との会合能を欠損した変異体 DOCK2 を導入し、好中球の形態変化および遊走を観察した。野生型 DOCK2 を導入した DOCK2 欠損好中球は、マイクロピペットによる局所からの走化性因子の刺激に応答して、正常な先導端を形成したが、PA との会合能を欠損した変異体を導入した場合には不完全な先導端しか形成されなかった。また、野生

型 DOCK2 を導入した DOCK2 欠損好中球は、走化性因子濃度勾配存在下での遊走が部分的に回復したが、PA との会合能を欠損した変異体を導入した場合には、その回復の割合が低かった。これらのことから、走化性因子に応答した好中球の形態変化と遊走において、DOCK2 と PA の相互作用が重要な役割を果たしていることが示された。

(6) 以上の結果から、好中球が走化性因子の刺激を受けると、まず、PI3K γ により産生された PA によって DOCK2 が細胞膜にリクルートされ、続いて PLD により産生された PA によって DOCK2 が局所に集積し、その場所で局所的にアクチン重合が引き起こされ、走化性因子の方向に仮足が伸び、細胞が移動することが明らかになった。

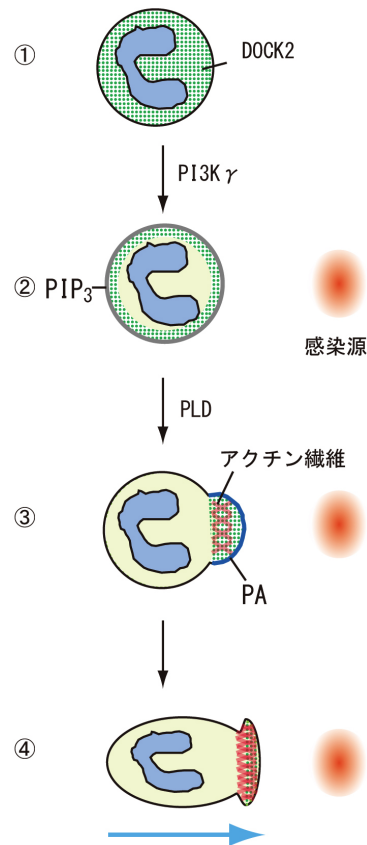


図 4 PIP₃ と PA による DOCK2 の時空間的制御機構 ①通常、DOCK2 は好中球の細胞質にほぼ均一に存在する。②受容体が感染源等を感じると、PI3K γ の働きで細胞膜上に全週性に PIP₃ が産生され、DOCK2 が細胞膜に引き寄せられる。③続いて PLD の働きにより感染源等

に面した側で PA が産生され、そこに DOCK2 が集積する。DOCK2 が集積した場所で、アクチン繊維の再構成が行われ、感染源等に向けて仮足が伸張する。④さらに、アクチン繊維の再構成が進み、細胞が前進する。

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)

① Nishikimi A, Fukuhara H, Su W, Hongu T, Takasuga S, Mihara H, Cao Q, Sanematsu F, Kanai M, Hasegawa H, Tanaka Y, Shibasaki M, Kanaho Y, Sasaki T, Frohman MA, Fukui Y Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. Science (査読あり), 324: 381-384, 2009.

② Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Inayoshi A, Enjoji M, Takayanagi R, Sasazuki T, Fukui Y, Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid dendritic cells versus myeloid dendritic cells. Blood (査読あり), 111: 2973-2976, 2008.

③ Tanaka Y, Hamano S, Gotoh K, Murata Y, Kunisaki Y, Nishikimi A, Takii R, Kawaguchi M, Inayoshi A, Masuko S, Himeno K, Sasazuki T, Fukui Y, T helper type 2 differentiation and intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor- α subunit controlled by the Rac activator Dock2. Nat. Immunol. (査読あり), 8: 1067-1075, 2007.

[学会発表] (計 3 件)

① 錦見昭彦、リン脂質を介した Rac 活性化分子 DOCK2 の時空間制御、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 会日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、2008 年 12 月 12 日

② 錦見昭彦、好中球におけるリン脂質を介した Rac 活性化分子 DOCK2 の時空間制御、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日。

③ 錦見昭彦、DOCK2 は好中球遊走において細胞運動および極性を制御する、第 17 回 Kyoto T Cell Conference、2007 年 6 月 16 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyushu-u.ac.jp/pressrelease/2009/2009-03-27.pdf>

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