

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07084

研究課題名（和文）好中球の貪食と細胞外トラップ形成における新規アクチン束化因子の機能解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of novel actin-binding factors in neutrophil phagocytosis and extracellular trap formation

研究代表者

阿部 匡史（ABE, TADASHI）

岡山大学・医学部・技術専門員

研究者番号：60423282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：好中球は自然免疫において侵入した細菌を破壊する重要な役割を担う。この過程でアクチン骨格の再構成を伴う細胞膜の形態変化をおこす。我々はダイナミン2のCharcot-Marie-Tooth病変異体K562Eの発現によりストレスファイバーが異常となることを見出し、この変異体のアクチンへの影響をin vitroで解析した。ダイナミン2 K562Eは自己重合能と膜結合能が著しく低下していた。この変異ダイナミンはアクチン線維を直接束化したが、形成されたアクチン線維束の膜結合能は顕著に減少していた。以上よりダイナミンはアクチン線維を束化し細胞膜とリンクさせることで細胞内のアクチン骨格を制御していると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球は細胞膜とアクチン骨格をダイナミックに再構成し、形態を変化させて体内に侵入した細菌の殺菌行動に備える。次いで貪食するか、細胞外に放出したクロマチン網で細菌を捕らえ殺菌する。このクロマチン網は、細胞外トラップと呼ばれ、強力な殺菌手段である。最近、細胞外トラップが自己免疫疾患、がん転移、血栓の過形成への関与が報告され、その形成制御が課題である。本研究は、好中球の貪食及び細胞外トラップ形成に関わる細胞膜とアクチン骨格の再構成機構を解析する研究である。得られる知見は、好中球の殺菌機構の解明のみならず、近年明らかになった好中球細胞トラップ由来の数々の炎症の治療戦略に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Neutrophils play an essential role in the destruction of bacteria in innate immune system. In the process of killing pathogens, neutrophils drastically change their cell shape with accompanying the rearrangement of actin cytoskeleton. We found that expressing dynamin 2 K562E mutant, one of the pathogenic mutations in Charcot-Marie-Tooth disease in cells leads to aberrant actin clusters and stress fibers. The effect of this mutant on actin fibers was analyzed in vitro. Recombinant dynamin 2 K562E showed lower self-assembly ability and membrane binding ability than that of dynamin 2 wildtype. Although dynamin K562E directly bundled actin filaments, the formed bundles showed much less ability to bind to the lipid membranes as compared to dynamin 2 wildtype. In conclusion, dynamin 2-mediated interactions between actin and membranes are critical for actin bundle formation in neutrophil functions.

研究分野：生化学

キーワード：細胞外トラップ ダイナミン アクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

体内の細菌の侵入を察知した好中球は、細胞膜とアクチン骨格をダイナミックに再構成し、形態を変化させて殺菌行動に備える。次いで貪食するか、細胞外に放出したクロマチン網で細菌を捕らえ殺菌する。特に、このクロマチン網は、「細胞外トラップ」と呼ばれ、強力な殺菌手段である。しかし、「細胞外トラップ」の自己免疫疾患、がん転移、血栓の過形成への関与が次々と報告され、その形成制御が喫緊の課題となっている。我々は、好中球の機能低下を示すダイナミンの変異体を見出した。しかし、ダイナミンがどのように好中球の細胞機能に関与するのかについて明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

我々は、好中球のアクチン線維形態を異常にする Charcot-Marie-Tooth 病の疾患変異の一つダイナミン 2K562E を見出した。この変異体を発現した好中球は、細胞内にアクチン凝集体を生じる。本研究は、ダイナミンによるアクチン制御機構を中心に、細胞株及び精製タンパクを用いて *in cellulo* 及び *in vitro* にて解析した。

3. 研究の方法

細胞の解析には、好中球様細胞株 (HL-60) および細胞内アクチン骨格の解析が容易なヒトポドサイト細胞株 (HPC) を用いた。これら細胞に、ラットダイナミン 2 野生型または K562E 変異体を過剰発現させ、細胞内アクチン線維の配向、ストレスファイバー形成を観察した。また、ラットダイナミン 2 野生型と K562E 変異体タンパクをコムギ胚芽無細胞タンパク合成系を用いて調製し、その性状を *in vitro* で解析した。人工球状脂質膜 (リポソーム) を用いて膜変形活性を電子顕微鏡法により調べた。膜変形以外の機能解析は、GTPase 活性測定を主体とした生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ダイナミン 2K562E 変異体の発現は、細胞内アクチン線維の異常凝集を引き起こす

我々は、ヒト神経変性疾患である Charcot-Marie-Tooth 病の原因変異の一つであるダイナミン 2K562E を U2OS 細胞に強制発現させると細胞内のアクチン動態に異常が出ることを報告してきた (山田ら *Neurosci.Lett.*,628,170-185,2016)。この変異体発現の影響を調べるために、好中球様に分化することが知られており、好中球の機能解析に汎用されている HL-60 細胞を用いた。培地中に 1.5% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) を加えることで好中球様に分化させた HL-60 細胞に、ダイナミン 2 野生型または K562E 変異体を発現させた。その後、ダイナミン 2、アクチン線維を免疫染色法により可視化した。ダイナミン 2K562E 変異体を発現した HL-60 細胞では、細胞内に大きなアクチン線維の凝集体が観察された。一方、ダイナミン 2 野生型を発現させた細胞では、細胞辺縁部に比較的小さいアクチン線維の塊が観察された (図 1)。

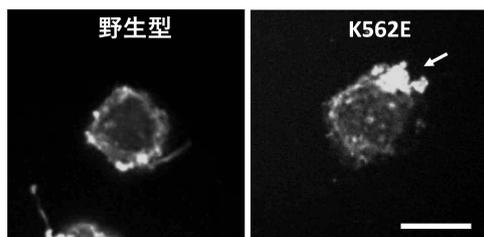


図 1: 好中球様に分化させた HL-60 細胞におけるダイナミン 2K562E 変異体発現によるアクチン線維の凝集(右)。大きなアクチン凝集体 (矢印)。スケールバー; 20 μm

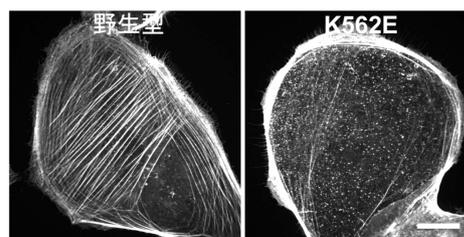


図 2: ダイナミン 2K562E 変異体を発現した HPC (右)。ストレスファイバーの形成異常が見られる。スケールバー; 20 μm

これらの結果から HL-60 細胞においても、ダイナミン 2K562E 変異体の発現は、アクチン線維

の形態異常を引き起こすことが確認された。しかしながら、HL-60 細胞では、ダイナミン 2K562E 変異体の発現により、大きなアクチン線維の凝集体が形成されるため詳細な形態観察が困難である。このために、アクチン細胞骨格が明瞭に観察されるヒトポドサイト細胞株 (HPC) を用いて同様の実験を行った。HPC にダイナミン 2K562E 変異体を発現させるとストレスファイバーの形成が顕著に低下するとともに、アクチン線維の凝集体が多数観察された (図 2)。

(2) ダイナミン 2 野生型および K562E 変異体タンパクの精製と性状解析

(1) よりダイナミン 2 が直接または間接的にアクチン線維の形態に影響する可能性を考えた。ダイナミン 2 は自己重合能が高いことが知られており、大腸菌や昆虫細胞を用いたタンパク発現系によるタンパク精製がしばしば困難である。そのため、コムギ無細胞タンパク発現系を用いて、これらタンパクを精製することを試みた。SDS-PAGE にてシングルバンドで精製されたことを確認し、最終的に約 7-10 μM の濃度のタンパクを得た。このタンパクを用いて、自己重合依存性 GTPase 活性と脂質膜依存性の GTPase 活性を測定した。ダイナミン 2 は、50 mM NaCl を含んだ低イオン強度緩衝液中で保温するとダイナミンの自己重合が促進され GTPase 活性が上昇することが知られている。また、ダイナミン 2 は人工脂質膜 (リポソーム) 上で重合し GTPase 活性が上昇する。両条件ともに、野生型のダイナミン 2 の GTPase 活性が顕著に上昇した。K562E 変異体では、低イオン強度緩衝液中では、野生型の約 30%、さらに脂質膜依存性 GTPase 活性はほとんど検出されなかった。以上のことから、ダイナミン 2K562E 変異体は、自己重合能と脂質膜との結合能が顕著に低下していることがわかった。

(3) ダイナミン 2 野生型および K562E 変異体は直接アクチン線維を束化する

続いて、精製したダイナミン 2 野生型または K562E 変異体とアクチン線維を反応させて、アクチン線維の形態が変化するかを負染色と透過型電子顕微鏡を組み合わせで観察した。両タンパクとも、アクチン線維を束化した。螺旋状に重合したと考えられるダイナミンが束化されたアクチン線維間で規則的に配向している像が観察された。また、両ダイナミンで形成されたアクチン線維束の直径は約 50 nm であり、野生型、変異体での違いはなかった。さらに、ダイナミンにより束化されたアクチン線維束は、GTP の添加により速やかに崩壊した (図 3)。これら結果から、ダイナミン 2K562E 変異体は、野生型と同様に直接アクチン線維に結合し束化すること、GTPase と共役したアクチン線維束の崩壊機構を維持していることがわかった。

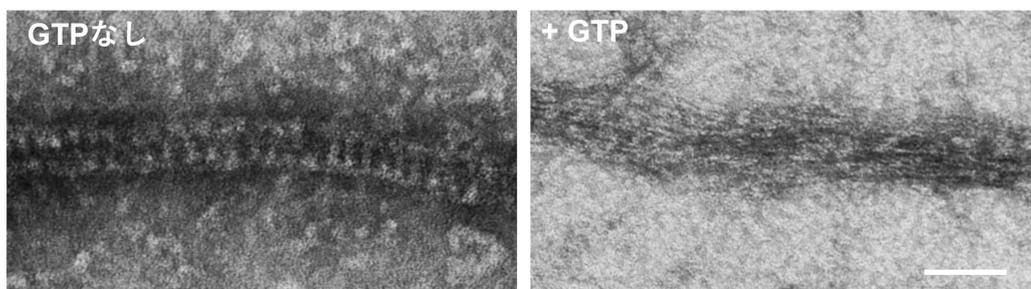


図 3: 精製したダイナミン 2 K562E によるアクチン線維の束化。K562E 変異体とアクチン線維を混ぜて室温にて 2 時間保温すると径の均一なアクチン線維束が形成された (左)。アクチン線維束に GTP を加えると速やかにアクチン線維束は、解けて崩壊した (右)。サンプルは、負染色の後、電子顕微鏡にて 30000 倍にて撮影した。スケールバー; 100 nm

(4) ダイナミン 2K562E により束化されたアクチン線維は脂質膜結合能が低下している

ダイナミンによって束化されたアクチン線維束が脂質膜に結合できるのか調べた。(3)のように、ダイナミンとアクチン線維を反応させ、その後、Rhodamine-phosphatidylethanolamineにより蛍光ラベルしたリポソームを混合した。アクチン線維は、Alexa-488-phalloidinを用いて標識した。混合物をレーザー共焦点顕微鏡にて観察した。ダイナミンが存在していないと、アクチン線維は束化されず、また脂質膜も結合していなかった。野生型またはK562E変異体ダイナミンが存在すると、アクチン線維は束化されたが、K562E変異体によって束化されたアクチン線維には脂質膜の結合はほとんど観察されなかった。

以上の結果よりダイナミン2K562E変異体は、自己重合と細胞膜への結合能が顕著に低下しているために、細胞内のストレスファイバーを含むアクチン線維束を正常に形成できないことにつながったと結論した。本研究をまとめ、論文として報告した(濱崎ら, *Front. Cell. Dev. Biol.*, 10, 884509, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sakane Ayuko, Yano Taka-aki, Uchihashi Takayuki, Horikawa Kazuki, Hara Yusuke, Imoto Issei, Kurisu Shusaku, Yamada Hiroshi, Takei Kohji, Sasaki Takuya	4. 巻 4
2. 論文標題 JRAB/MICAL-L2 undergoes liquid-liquid phase separation to form tubular recycling endosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02080-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujise Kenshiro, Okubo Mariko, Abe Tadashi, Yamada Hiroshi, Takei Kohji, Nishino Ichizo, Takeda Tetsuya, Noguchi Satoru	4. 巻 43
2. 論文標題 Imaging based evaluation of pathogenicity by novel DNM2 variants associated with centronuclear myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 169 ~ 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.24307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li Jianzhen, Fujise Kenshiro, Wint Haymar, Senju Yosuke, Suetsugu Shiro, Yamada Hiroshi, Takei Kohji, Takeda Tetsuya	4. 巻 571
2. 論文標題 Dynamin 2 and BAR domain protein pacsin 2 cooperatively regulate formation and maturation of podosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 145 ~ 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.07.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 The Mon La, Yamada, H., Seiriki, S., Li, S.A., Fujise, K., Katsumi, N., Abe, T., Watanabe, M., Takei, K.	4. 巻 45
2. 論文標題 Internalization of AMPA-type glutamate receptor in the MIN6 pancreatic beta-cell line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Struct. Func.	6. 最初と最後の頁 121-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.20020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 The Mon La, Tachibana, H., Li, S.A., Abe, T., Seiriki, S., Nagaoka, H., Takashima, E., Takeda, T., Ogawa, D., Makino, S., Asanuma, K., Watanabe, M., Tian, X., Ishibe, S., Sakane, A., Sasaki, T., Wada, J., Takei, K., Yamada, H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Dynamin 1 is important for microtubule organisation and stabilisation in glomerular podocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 16449-16463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001240RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujise K., Okubo M., Abe T., Yamada H., Nishino I., Noguchi S., Takei K., Takeda T.	4. 巻 296
2. 論文標題 Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100077-100077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirose, T., Cabrera-Socorro, A., Chitayat, D., Lemonnier, T., Feraud, O., Cifuentes-Diaz, C., Gervasi, N., Mombereau, C., Ghosh, T., Stoica, L., Jeanne d'arc, AL.B., Yamada, H., Takei, K., Emiliani, V., Bennaceur-Griscelli, A., Schwartz, C.E., Nguyen, G., Groszer, M	4. 巻 129
2. 論文標題 ATP6AP2 variant impairs CNS development and neuronal survival to cause fulminant neurodegeneration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Clin. Invest.	6. 最初と最後の頁 2145-2162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI79990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 竹居 孝二, 山田 浩司, 竹田 哲也	4. 巻 59
2. 論文標題 ダイナミン複合体による新規の膜切断機構: クラスタラーゼ・モデル	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 255-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee, Y., Yamada, H., Pradipta, A., Ma, J.S., Okamoto, M., Nagaoka, H., Takashima, E., Standley, D.M., Sasai, M., Takei, K., Yamamoto, M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Initial phospholipid-dependent Irgb6 targeting to Toxoplasma gondii vacuoles mediates host defense.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 濱崎英理子, 安岡宏樹, 和木田夏輝, 阿部匡史, 竹田哲也, 竹居孝二, 山田浩司
2. 発表標題 ダイナミン2の自己重合と膜との相互作用は糸球体ポドサイトのアクチン制御に重要である
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安岡宏樹, 西井尚子, 原田結加, 宮地孝明, 阿部匡史, 竹田哲也, 和田淳, 竹居孝二, 山田浩司
2. 発表標題 糸球体ポドサイトからのグルタミン酸の放出と開口放出関連タンパクの探索
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藪彩夏, 安岡宏樹, 片野坂友紀, 阿部匡史, 竹田哲也, 竹居孝二, 山田浩司
2. 発表標題 ダイナミン1は微小管の配向を調節しTRPV2の細胞膜移行を制御する
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田浩司
2. 発表標題 系球体足細胞（ポドサイト）におけるダイナミンによる微小管制御と形態形成
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jianzhen Li, Kenshiro Fujise, Haymar Wint, Yosuke Senju, Shiro Suetsugu, Hiroshi Yamada, Kohji Takei, Tetsuya Takeda
2. 発表標題 Dynamin 2 and BAR domain protein pacsin2 cooperatively regulate formation and maturation of podosomes
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haymar Wint, Jianzhen Li, Kenshiro Fujise, Hiroshi Yamada, Kohji Takei, Tetsuya Takeda
2. 発表標題 Unveiling function of a BAR domain protein Pacsin 2 in cancer cell migration and invasion
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原史也, 藤瀬賢志郎, 山田浩司, 竹居孝二, 竹田哲也
2. 発表標題 骨格筋細胞分化におけるMTM1/Myotubularin の機能解析
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田浩司
2. 発表標題 ポドサイトにおけるダイナミン2によるアクチン制御にはダイナミン2の適切な自己重合と膜との相互作用が必要である
3. 学会等名 第6回ポドサイト研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹居孝二
2. 発表標題 分化ポドサイトにおけるダイナミン1の機能
3. 学会等名 第6回ポドサイト研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田浩司, The Mon La, 竹田哲也, 阿部匡史, 浅沼克彦, 竹居孝二
2. 発表標題 腎系球体ポドサイトにおけるアンフィファイジン1の機能
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部匡史, The Mon La, 橘 洋美, 竹田哲也, 竹居孝二, 山田浩司
2. 発表標題 腎系球体ポドサイトにおけるダイナミンイソフォームの局在と機能
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹居孝二, テモンラ, 阿部匡史, 竹田哲也, 藤原郁子, 成田哲博
2. 発表標題 ダイナミン GTP アーゼはアクチン線維の束化と分散を機械的に制御する
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 The Mon La, Tadashi Abe, Masayuki Morita, Eizo Takashima, Tetsuya Takeda, Katsuhiko Asanuma, Takei Kohji, Hiroshi Yamada
2. 発表標題 Amphiphysin 1 is important for actin cytoskeletal regulation with synaptopodin in glomerular podocytes
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹居 孝二 (Takei Kohji) (40322226)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	山田 浩司 (Yamada Hiroshi) (80325092)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------