

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590385

研究課題名(和文)白血球の遊走方向を決め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(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80398081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：体内に微生物が侵入すると、白血球の一種である好中球が微生物の侵入部位(炎症部位)へ素早く遊走して貪食・殺菌を行う。この細胞の遊走過程を「ケモタキシス(走化性)」と呼ぶ。正しくケモタキシスするためには「方向の決定」と「運動性の亢進」が必要であるが、「遊走方向」を制御する機構については不明な点が多い。好中球の主な走化性因子の受容体はGiと共役する7回膜貫通型の受容体(GPCR)である。本研究では、走化性因子により活性化したGiシグナルにより、遊走好中球の前方にリクルートされたmInsc蛋白質が、進化的に保存されたPar蛋白質複合体を介して好中球の遊走方向を制御する機構を明らかにした。

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 developmental morphogenesis and 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 shown that Inscuteable protein regulates directionality of chemotaxing neutrophils by tethering chemoattractant-elicited trimeric-Gi-protein signaling to an evolutionarily-conserved Par-polarity-protein complex.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ケモタキシス 好中球

1. 研究開始当初の背景

好中球のケモタキシスは、好中球が微生物を貪食・殺菌するためにその侵入部位に到達するのに必要であり、生体防御ひいては人間の生存にとって不可欠である。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。広がった形態の前部ではpseudopod(仮足)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、後部はアクチン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と特異的にカップルする。受容体の活性化によりGαi上ではヌクレオチド交換反応が起き、Gβγサブユニットが解離する。GβγはPI3Kγを活性化するが、これは「運動性」の亢進に必要である。このGβγ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、Gαi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

本研究ではGαiと協調的に働く分子とし

て進化的に保存されているInscuteable (Insc)に着目した。Inscはショウジョウバエ神経幹細胞の細胞極性を制御し、非対称分裂時の分裂方向を決定する蛋白質であるが、細胞運動との関連は知られていない。申請者らはこれまでにInscの哺乳類ホモログ(mInsc)を同定・クローニングし、mInscがLGN(遊離したGαiと特異的に結合する蛋白質)と結合すること、その結合を介して、Gαi-LGN-mInscから成る3者複合体を形成すること等を明らかにしていた。そこで、本研究では、走化性因子下流で形成されるこのGαi-LGN-mInsc複合体の「遊走方向の決定」における役割の解明を目的とし、以下の研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 好中球の遊走方向を詳細に調べるために以下の解析を行った。

① 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することができる。

② 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。これらの解析から、wild type (WT) マウス由来の好中球とmInsc KO マウス由来の好中球とを比較し、KO好中球でケモタキシスの効率が低下していた原因の検討を行った。

(2) タンパク質の細胞内局在を調べるために以下の解析を行った。

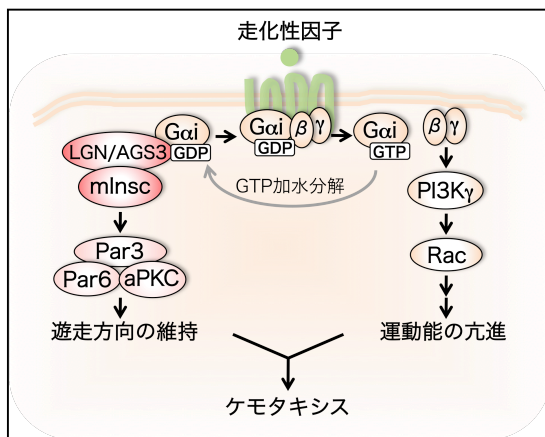
① 抗体染色: 前述のZigmond chamberを用いてケモタキシスをさせた好中球を固定し、

抗体を用いて細胞染色を行った。

② GFP 融合蛋白質のタイムラプス撮影：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 μ m 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。

4. 研究成果

遊走過程では好中球の前方部に pseudopod が形成されるが、pseudopod には走化性因子により生じた遊離の $G\alpha i$ -GDP が集積し、それが mInsc のパートナー分子 LGN/AGS3 への結合を介し mInsc をリクルートした。さらに、mInsc は進化的に保存された細胞極性制御因子群 Par-aPKC 複合体の pseudopod へのリクルートに必要であり、mInsc 欠損好中球、あるいは aPKC 活性を阻害した好中球では、正常な運動能を持つものの遊走方向に異常が見られた。これは形成された pseudopod 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。mInsc が仮足を安定化するためには、LGN/AGS3 を介した $G\alpha i$ -GDP との複合体形成が必要であったことから、mInsc は走化性因子により惹起される $G\alpha i$ -GDP に依存した noncanonical な G タンパク質経路を介して遊走方向を制御すると考えられた。



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)

① 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 **26**, 292–302 (2013)

doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.008.

査読有り

② Hayase J, Kamakura S, Iwakiri Y,

Yamaguchi Y, Izaki T, Ito T, Sumimoto H.

The WD40 protein Morgl facilitates Par6-aPKC binding to Crb3 for apical identity in epithelial cells.

J. Cell Biol. **200**, 635–650 (2013)

doi: 10.1083/jcb.201208150.

査読有り

③ Iwakiri Y, Kamakura S, Hayase J, Sumimoto H.

Interaction of NuMA protein with the kinesin Eg5: its possible role in bipolar spindle assembly and chromosome alignment.

Biochem. J. **451**, 195–204 (2013)

doi: 10.1042/BJ20121447.

査読有り

④ Chishiki K, Kamakura S, Yuzawa S, Hayase J, Sumimoto H.

Ubiquitination of the heterotrimeric G protein α subunits Gai2 and Gaq is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **435**, 414–419 (2013)

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.103.

査読有り

⑤ Yasuda T, Saegusa C, Kamakura S,

Sumimoto H, Fukuda M.

Rab27 effector Slp2-a transports the apical signaling molecule podocalyxin to the apical surface of MDCK II cells and regulates claudin-2 expression.

Mol. Biol. Cell **23**, 3229–3239 (2012)

doi: 10.1091/mbc.E12-02-0104

査読有り

〔学会発表〕（計 5 件）

① Sachiko Kamakura, Masatoshi Nomura, Junya Hayase, Yuko Iwakiri, Akihiko Nishikimi, Ryoichi Takayanagi, Yoshinori Fukui, and Hideki Sumimoto

「Noncanonical G protein signaling regulates neutrophil chemotaxis via the cell polarity protein mInsc」、

第 24 回 九州大学生体防御医学研究所 国際シンポジウム、

2014 年 11 月 7～8 日

九州大学 馬出キャンパス内 コラボポスターセッション I （福岡県・福岡市）

② 鎌倉 幸子、住本 英樹

「好中球ケモタキシスにおける遊走方向制御の分子機構」

平成 26 年度 日本生化学会九州支部会例会シンポジウム

2014 年 5 月 17 日

九州大学 馬出キャンパス内 コラボポスターセッション I （福岡県・福岡市）

③ 鎌倉 幸子、野村 政壽、早瀬 純也、岩切優子、錦見 昭彦、高柳 涼一、福井 宣規、住本 英樹

「GPCR からの新しいシグナリング経路：白血球の遊走制御機構」

第 87 回日本内分沁学会学術総会 シンポジウム

2014 年 4 月 24～26 日

福岡国際会議場・福岡サンパレス （福岡県・福岡市）

④ 早瀬 純也、鎌倉 幸子、住本 英樹

「新規 Par6 結合タンパク質 Morg1 は Crb3 および Cdc42 と共同して上皮細胞の apical 膜 identity を確立する」

第 87 回 日本生化学会大会 シンポジウム

2014 年 10 月 15～18 日

国立京都国際会館・グランドプリンスホテル 京都（京都府・京都市）

⑤ 鎌倉 幸子、野村 政壽、早瀬 純也、岩切優子、錦見 昭彦、高柳 涼一、福井 宣規、住本 英樹

細胞極性制御因子 mInsc は 非典型的な 3 量体 G タンパク質経路を介して好中球のケモタキシスを制御する

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 3～6 日、神戸ポートアイランド（兵

庫県・神戸市）

〔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：

出願年月日：

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・助教

研究者番号：80398081