

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25251015

研究課題名(和文) DOCKファミリー分子の生体機能と動作原理の統合的理解

研究課題名(英文) Comprehensive analyses for biological functions and regulatory mechanisms of DOCK family proteins

研究代表者

福井 宣規 (Fukui, Yoshinori)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：60243961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：DOCKファミリー分子は、DHR-2ドメインを介して低分子量Gタンパク質を活性化する新しいタイプのグアニンヌクレオチド交換因子であり、種々の細胞高次機能を制御するが、その作用機序の詳細は不明である。本研究では、DOCKファミリー分子の機能や制御機構につき、解析を行った。その結果、1) DOCK5がFc RI受容体の下流で機能し、マスト細胞の脱顆粒反応を制御すること、2) DOCK1ががんの浸潤・転移に重要な役割を演じることを実証した。また、3) DOCK2のリン酸化修飾や4) DOCK8の膜局在に関して重要な知見を得ると共に、5) DOCK8の新しい生体機能を発見し、その動作原理を解明した。

研究成果の概要(英文)：DOCK family proteins are atypical guanine nucleotide exchange factors that mediate GTP-GDP exchange reaction through their DHR-2 domain. Recent evidence indicates that DOCK family proteins are involved in many cellular functions, yet their regulatory mechanisms are poorly understood. In this study, we have analyzed signaling and functions of DOCK family proteins and obtained the following important findings: 1) DOCK5 acts downstream of FC RI receptor and critically regulates mast cell degranulation. 2) DOCK1 plays a key role in invasion and metastasis of breast cancer cells. 3) The phosphorylation sites of DOCK2 in response to chemokine stimulation were identified. 4) The critical domain required for membrane localization of DOCK8 was identified. 5) The previously unknown function of DOCK8 and its regulatory mechanism were discovered.

研究分野：機能生物化学

キーワード：シグナル伝達 生体分子 癌 免疫学

### 1. 研究開始当初の背景

Rho、Rac、Cdc42 といった低分子量 G タンパク質は細胞内分子スイッチとして機能し、細胞骨格の再構築を介して様々な細胞高次機能を制御している。これらの分子はいずれも、グアニヌクレオチド交換因子 (GEF) と称される分子群によって、GDP を結合した不活性型から GTP を結合した活性型へ変換されることで、その機能を発現する。従来 GEF は DH ドメインをコードする分子として特徴づけられてきたが、近年このような構造を持たない、新しいタイプの GEF として DOCK ファミリーと呼ばれる分子群が同定されるに至り、その機能やシグナル伝達機構は国際的にも大きな関心を集めている。

代表者は、免疫系特異的に発現する分子として DOCK2 を同定し、DOCK2 がケモカイン受容体や抗原受容体の下流で機能する Rac 活性化のマスター分子であり、リンパ球や好中球といった免疫細胞の遊走・活性化に重要な役割を演じることを世界に先駆けて明らかにし、以降その機能や構造、シグナル伝達機構に関して精力的に研究を進めてきた。DOCK2 は、DHR-2 と呼ばれる領域を介して Rac と会合し、GTP-GDP 交換反応を触媒する。DOCK2 を欠損した免疫細胞に野生型の DOCK2 を発現させると運動性が回復するが、GEF 活性を欠く DHR-2 変異体では、このような機能回復は認められない。このことから、DOCK2 が Rac の活性化を介して免疫細胞の遊走を制御していることは明らかであるが、DOCK2 自身の活性化機構には依然として不明な点が多い。一方 DOCK5 は、破骨細胞の分化や機能発現に重要な Rac 活性化分子であるが、DOCK5 欠損によって生じる機能異常は、GEF 活性を欠く DHR-2 変異体を発現させることで回復する。このことから、DOCK5 は Rac 活性化と無関係に、破骨細胞の機能を制御していると考えられる。

一方、DOCK8 は、高 IgE 血症で特徴づけられる新規ヒト複合型免疫不全症の原因であることが報告され、近年注目を集めている分子である。代表者は、DOCK8 をノックアウトすることで、樹状細胞の三次元環境下での遊走が選択的に障害されることを見いだした。DHR-2 変異体を用いた解析から、DOCK8 は Cdc42 の GEF として三次元環境下での細胞運動を制御していると考えられるが、DOCK8 欠損樹状細胞においても Cdc42 の活性化は正常に起こることから、単に量的な制御だけでは説明できない。このため、DOCK8 の動作原理を理解するには、時空間情報も含めた詳細なシグナルネットワーク解析が必要である。

また、DOCK1 は非リンパ球系細胞に発現する Rac 活性化分子であり、培養細胞を用いた解析より細胞運動、アポトーシス細胞の貪食、神経突起形成を制御することが報告されていたが、その生理的機能は不明であった。代表者は、コンディショナル KO マウスを作製することで、DOCK1 が心血管形成に重要な役割を演じていることを明らかにした。DOCK1 も DOCK2 と同様に、DHR-2 ドメインを介して Rac と、N 末端の領域を介して ELMO と会合し、受容体チロシンキナーゼの刺激に伴いリン酸化修飾を受ける。DOCK1 はこれまで多くのがんにおいて、浸潤能や転移能を規定する Rac GEF であると報告されているが、その詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、DOCK1、2、5、8 といった 4 種類の DOCK ファミリー分子を対象に、器官形成や免疫応答、がん細胞の浸潤・転移における機能を明らかにすると共に、その動作原理の全貌を解明することを目的としている。このため、

1. 既に樹立している KO マウスを用いて、各 DOCK ファミリー分子の生体機能とその制御シグナルを明らかにする。
2. 種々の Cre マウスを用いて、成体あるいは組織特異的に DOCK1 の発現を欠くマウスを作製すると共に、がん細胞の浸潤・転移における DOCK1 の役割を明らかにする。
3. 各 DOCK ファミリー分子を対象に、会合分子の網羅的探索を行うと共に、機能発現や細胞内局在に重要なドメインを同定し、その上流および下流のシグナル経路を特定する。
4. 会合分子との相互作用部位やリン酸化サイトに変異を入れたノックインマウスを用いて、各シグナル伝達経路の機能的意義を明らかにする。具体的には、DOCK2 と ELMO の相互作用部位、DOCK2 のセリンリン酸化部位、破骨細胞の機能発現に重要な DOCK5 ドメイン、DOCK8 の局在制御に関わるドメイン等を対象とする。

### 3. 研究の方法

1) DOCK2 の生体機能とその動作原理の解明  
構造解析の結果から、DOCK2 の 128 位のアルギニン酸は、水素結合を介してバンドル構造の安定化に寄与しており、それをアラニンに置換した変異体 (R128A) では、ELMO との会合が著しく障害される。そこで、この変異体を発現するノックインマウスを作製し、DOCK2 の機能に及ぼす R128A 変異の影響を検

討する。また、ケモカイン刺激に伴い、DOCK2 の 1683 位のセリンがリン酸化されることを見いだしていることから、キナーゼの同定や会合分子の探索を行う。

#### 2) DOCK8 の生体機能とその動作原理の解明

DOCK8 が、樹状細胞の三次元環境下での運動に必須の分子であることを明らかにすると共に、DOCK2 と異なり、DOCK8 が定常状態においても形質膜に局在することを見いだした。そこで、遊走応答のスピードや直線性、細胞形態やオルガネラの位置等の定量的な解析を実施すると共に、Cdc42 の時空間制御に及ぼす DOCK8 欠損の影響を検討する。また、DOCK8 と会合する分子の網羅的探索を実施すると同時に、DOCK8 欠損がヒトにおいて高 IgE 血症を発症するメカニズムに迫る。

#### 3) DOCK5 の新しい機能ドメインとシグナルネットワークの同定

DOCK5 は Rac 活性化と無関係に、破骨細胞の機能を制御しているが、そのシグナルの実体は不明である。そこで、DOCK5 の新しい機能ドメインを同定すると共に、DOCK5 会合分子の網羅的探索を行う。また、免疫細胞を対象に、DOCK5 欠損の影響を詳細に解析する。

#### 4) がん細胞の浸潤・転移や心血管形成における DOCK1 の機能とその制御機構

刺激に応答して細胞が遊走・浸潤する際、peripheral ruffle や dorsal ruffle といったラッフル膜が形成されるが、うち dorsal ruffle は、細胞外マトリックスへの浸潤に重要であることが示されている。DOCK1 は dorsal ruffle 形成に必要な分子であり、その発現ががんの悪性度と相関することが知られている。そこで、Cre マウスを用いて、組織特異的に DOCK1 の発現を欠くマウスを作製し、化学発がんや遺伝子改変による発がんモデルと組み合わせ、がんの発生や浸潤・転移における DOCK1 の役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### 1) DOCK2 の生体機能とその動作原理の解明

ELMO との会合に重要な DOCK2 の 128 位のアルギニン酸をアラニンに置換した変異体 (R128A) を発現するノックインマウスを作製した。この変異に伴い ELMO との会合は部分的に障害されたが、リンパ球の遊走応答を障害するには至らなかった。一方、ケモカイン刺激に伴い、DOCK2 が部位特異的にリン酸化修飾を受けることを見だし、その部位に変異を入れたノックインマウスを作製し、好中球遊走時の直線性が低下することを見いだした。そこで、部位特異的リン酸化抗体を作製し、これを各種阻害剤と組み合わせるこ

とで、リン酸化酵素の同定を行った。また、fMLF および PMA 刺激により誘導される Rac 活性化が、DOCK2 と DOCK5 の両者を欠損する好中球において、ほぼ完全に消失することを見出し、その機能解析を実施した。その結果、遊走はもちろん、neutrophil extracellular trap (NET) が顕著に障害されることを発見した。NET は血管炎症や自己免疫反応に関与していることが知られており、NET を介した炎症性疾患を制御する上で、DOCK2 と DOCK5 は治療標的となる可能性がある。

#### 2) DOCK8 の生体機能とその動作原理の解明

DOCK2 と異なり、DOCK8 が定常状態においても形質膜に局在することを見だし、この制御に重要な機能ドメインを同定した。また、DOCK8 がマクロファージの遊走に重要な役割を演じることを見だし、それに関わる機能ドメインと会合分子を同定した。また、自然リンパ球の発生・分化における DOCK8 の役割を解析すると共に、DOCK8 の遺伝子改変マウスが重篤なアトピー様皮膚炎を自然発症することを見だし、そのメカニズムの一端を解明した。

#### 3) DOCK5 の新しい機能ドメインとシグナルネットワークの同定

気管支喘息や花粉症、アナフィラキシーショックは、IgE 抗体によって惹起される I 型アレルギー疾患であり、その発症にはマスト細胞が重要な役割を演じている。マスト細胞は IgE 受容体である FcεRI を発現しており、これが IgE 抗体および抗原により架橋されるとシグナルが伝達され、その結果分泌顆粒が移動し、形質膜と融合することで、最終的にケミカルメディエーターが放出される。この分泌顆粒の移動には微小管のダイナミックな再構築を必要とするが、それを司るシグナル伝達機構は不明であった。私達は、DOCK5 欠損マウスがアナフィラキシーショックに抵抗性を示す事を見だし、そのメカニズムの解析を進めた。その結果、DOCK5 が Nck2 や Akt といった分子と会合することでシグナル伝達のハブとして機能し、GSK3β のリン酸化を制御することで、微小管動態および脱顆粒反応をコントロールしていること明らかにした。

#### 4) がん細胞の浸潤・転移や心血管形成における DOCK1 の機能とその制御機構

乳腺組織特異的に DOCK1 の発現を欠くマウスを作製し、それを遺伝子改変による発がんモデルと組み合わせることで、乳がんの浸潤・転移における DOCK1 の重要性を実証した。また、がん細胞の生存・増殖における DOCK1 の機能的な重要性を明らかにすると共に、その選

拮抗阻害剤を開発した。

#### 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 18 件)

1. Okumura F, Uematsu K, Byrne S, Hirano M, Joo-Okumura A, Nishikimi A, Shuin T, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura K: Parallel regulation of VHL disease by pVHL-mediated degradation of B-Myb and HIF- $\alpha$ . **Mol. Cell. Biol.** 2015 in press (査読有)
2. Yanagihara T, Sanematsu F, Sato T, Uruno T, Duan X, Tomino T, Harada Y, Watnabe M, Wang Y, Tanaka Y, Nakanishi Y, Suyama M, Fukui Y: Intronic regulation of Aire expression by Jmjd6 for self-tolerance induction in the thymus. **Nature Commun.**, 6:8820, 2015 (査読有)  
(DOI:10.1038/ncomms9820)
3. Guo X, Shi N, Cui X-B, Wang J-N, Fukui Y, Chen S-Y: Deducator of cytokines 2, a novel regulator for smooth muscle phenotypic modulation and vascular remodeling. **Cir. Res.** e71-80, 2015 (査読有)  
(DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.305863)
4. Abu-Thuraia A, Gauthier R, Chidiac R, Fukui Y, Screatton RA, Gratton JP, Côté JF: Axl phosphorylates Elmo scaffolding proteins to promote Rac activation and cell invasion. **Mol. Cell. Biol.** 35:76-87, 2015 (査読有)  
(DOI: 10.1128/MCB.00764-14)
5. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, Nácher M, Pitaval C, Radovanovic I, Fukui Y, McEver RP, Filippi M-D, Lizasoain I, Ruiz-Cabello J, Zarbock A, Moro MA, Hidalgo A: Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Science** 346:1234-1238, 2014 (査読有)  
(DOI:10.1126/science.1256478)
6. Ogawa K, Tanaka Y, Uruno T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Côté JF, Fukui Y: DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links Fc $\epsilon$ RI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. **J. Exp. Med.** 211: 1407-1419, 2014 (査読有)  
(DOI:10.1084/jem.20131926)
7. Moalli F, Cupovic J, Thelen F, Halbherr P, Fukui Y, Narumiya S, Ludewig B, Stein JV: Thromboxane A2 acts as tonic immunoregulator by preferential disruption of low-avidity CD4<sup>+</sup> T cell-dendritic cell interactions. **J. Exp. Med.** 211:2507-2517, 2014 (査読有)  
(DOI:10.1084/jem.20140137)
8. Watanabe M, Terasawa M, Miyano K, Yanagihara T, Uruno T, Sanematsu F, Nishikimi A, Côté JF, Sumimoto H, Fukui Y: DOCK2 and DOCK5 act additively in neutrophils to regulate chemotaxis, superoxide production, and extracellular trap formation. **J. Immunol.** 193:5660-5667, 2014 (査読有)  
(DOI:10.4049/jimmunol.1400885)
9. Wen Y, Elliott MJ, Huang Y, Miller TO, Corbin DR, Hussain L-R, Ratajczak MZ, Fukui Y, Ildstad ST: DOCK2 is critical for CD8<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup> graft facilitating cells to enhance engraftment of hematopoietic stem and progenitor cells. **Stem Cells** 32:2732-2743, 2014 (査読有)  
(DOI:10.1002/stem.1780)
10. Damoulakis G, Gambardella L, Rossman K, Lawson C, Anderson K, Fukui Y, Welch H, Der C, Stephens L, Hawkins P: P-Rex1 directly activates RhoG to regulate GPCR-driven Rac signalling and actin polarity in neutrophils. **J. Cell Sci.** 127:2589-2600, 2014 (査読有)  
(DOI:10.1242/jcs.153049)
11. Sakai Y, Tanaka Y, Yanagihara T, Watanabe M, Duan X, Terasawa M, Nishikimi A, Sanematsu F, Fukui Y: The Rac activator DOCK2 regulates natural killer cell-mediated cytotoxicity in mice through the lytic synapse formation. **Blood**, 122:386-393, 2013 (査読有)  
(DOI:10.1182/blood-2012-12-475897)

12. Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y, Côté JF, Fukui Y: Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. **J. Biol. Chem.** 288: 8092-8100, 2013 (査読有)  
(DOI:10.1074/jbc.M112.410423)
13. Unoki M, Masuda A, Dohmae N, Arita K, Yoshimatsu M, Iwai Y, Fukui Y, Ueda K, Hamamoto R, Shirakawa M, Sasaki H, Nakamura Y: Lysyl 5-hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6). **J. Biol. Chem.** 288:6053-6062, 2013 (査読有)  
(DOI:10.1074/jbc.M112.433284)
14. Cimino PJ, Yang Y, Li X, Hemingway JF, Cherne MK, Khademi SB, Fukui Y, Montine KS, Montine TJ, Keene CD: Ablation of the microglial protein DOCK2 reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **Exp. Mol. Pathol.** 94:366-371, 2013 (査読有)  
(DOI:10.1016/j.yexmp.2013.01.002)
15. Laurin M, Huber J, Pelletier A, Houalla, Park M, Fukui Y, Haibe-Kains B, Muller WJ, Côté JF: The Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 110:7434-7439, 2013 (査読有)  
(DOI:10.1073/pnas.1213050110)
16. Kamakura S, Nomura M, Hayase J, Iwakiri Y, Nishikimi A, Takayanagi R, Fukui Y, Sumimoto H: The cell polarity protein mlnsc regulates neutrophil chemotaxis via a noncanonical G protein signaling pathway. **Dev. Cell.** 26:292-302, 2013 (査読有)  
(DOI:10.1016/j.devcel.2013.06.008)
17. Floc'h AL, Tanaka Y, Bantilan NS, Voisinne G, Altan-Bonnet G, Fukui Y, Huse M: Annular PIP3 accumulation controls actin architecture and modulates cytotoxicity at the immunological synapse. **J. Exp. Med.** 210:2721-2737, 2013 (査読有)  
(DOI:10.1084/jem.20131324)
18. Laurin M, Dumouchel A, Fukui Y, Côté JF: The Rac-specific exchange factors Dock1 and Dock5 are dispensable for the establishment of the glomerular filtration barrier in vivo. **Small GTPases** 4:221-230, 2013 (査読有)  
(DOI:10.4161/sgtp.27430)
- [学会発表] (計 18 件)
- 田尻裕匡、宇留野武人、渡邊真裕紀、前原喜彦、福井宣規: DOCK1 as a novel molecular target for controlling cancer invasion and metastasis. 第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 19 日-20 日、米子
  - Shiraishi A, Fukui Y: Critical role of DOCK8 in nucleokinesis during macrophage migration. The 44rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology、2015 年 11 月 18 日-20 日、札幌
  - Ushijima M, Fukui Y: B cell-intrinsic role of DOCK2 in T cell-dependent humoral immunity. The 44rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology、2015 年 11 月 18 日-20 日、札幌
  - 福井 宣規: マスト細胞の脱顆粒反応における DOCK5 の役割とその制御機構. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会、2015 年 5 月 26 日-28 日、東京
  - Fukui Y: A novel mechanism controlling Aire protein expression in the thymus. The Fourth BIZAN Immunology Symposium, 2015 年 1 月 29 日-1 月 30 日、徳島
  - Fukui Y: Critical roles of DOCK family proteins in migration and activation of leukocytes. Keystone Symposium , 2015 年 1 月 13 日-1 月 18 日、Vancouver, Canada
  - Harada Y, Fukui Y: The role of DOCK8 in migration and activation of effector CD4+ T cells during immune responses. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014 年 12 月 10 日-12 月 12 日、京都
  - Yanagihara T, Watanabe M, Fukui Y: Identification of a novel molecule essential for Aire expression and self-tolerance. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014 年 12 月 10 日-12 月 12 日、京都
  - Fukui Y: DOCK1 as a novel molecular target for controlling cancer

- invasion and metastasis. The 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Gastroenterological Carcinogenesis, 2014年11月13日-11月14日、福岡
10. Ogawa K, Tanaka Y, Fukui Y: Identification of a molecule critical for degranulation of mast cells and anaphylactic reaction. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2013, 2013年12月11日-13日、千葉
  11. Watanabe M, Nishikimi A, Terasawa M, Jean-François Côté, Fukui Y: Critical roles of DOCK2 and DOCK5 in neutrophil chemotaxis, ROS production, and NETs formation. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2013, 2013年12月11日-13日、千葉
  12. Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. Germany-Japan Immunology Seminar, 2013年12月5日-8日、静岡
  13. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y: DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. 15th International Congress of Immunology, 2013年8月22日-27日、Milan.
  14. Shiraiishi A, Tanaka Y, Fukui Y: Critical role of DOCK8 in dendritic cell trafficking during T cell immune responses. 15th International Congress of Immunology, 2013年8月22日-27日、Milan.
  15. Watanabe M, Nishikimi A, Terasawa M, Jean-François Côté, Fukui Y: Critical roles of DOCK2 and DOCK5 in neutrophil chemotaxis, ROS production, and NETs formation. 15th International Congress of Immunology, 2013年8月22日-27日、Milan.
  16. Ogawa K, Tanaka Y, Fukui Y: Identification of a molecule critical for degranulation of mast cells and anaphylactic reaction. 15th International Congress of Immunology, 2013年8月22日-27日、Milan.
  17. Ushijima M, Nishikimi A, Fukui Y: B cell-intrinsic role of DOCK2 in T cell-dependent humoral immunity. 15th International Congress of Immunology, 2013年8月22日-27日、Milan.
  18. Yanagihara T, Sakai Y, Tanaka Y, Fukui Y: The Rac activator DOCK2 regulates natural killer cell-mediated cytotoxicity through the lytic synapse formation. 15th International Congress of Immunology, 2013年8月22日-27日、Milan.
- 〔図書〕（計2件）
1. 宇留野武人、福井宣規：免疫抑制剤開発の新しい分子標的としてのDOCK2、実験医学増刊、羊土社、32：184-189、2014
  2. 福井宣規：新たな免疫抑制剤開発標的としてのRac活性化因子DOCK2、細胞工学、学研メディカル秀潤社、32:1227-1231、2013
- 〔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.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 福井 宣規 (FUKUI, Yoshinori)  
 九州大学・生体防御医学研究所・教授  
 研究者番号：60243961
  - (2) 研究分担者  
 宇留野 武人 (URUNO, Takehito)  
 九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
 研究者番号：80532093