

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440051

研究課題名(和文)好中球の活性酸素産生および遊走におけるARFの機能

研究課題名(英文)Roles of ARFs in superoxide production and chemotaxis of neutrophil

## 研究代表者

真崎 雄一 (MAZAKI, Yuichi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60311304

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)：好中球は、感染の際、最初に応答する、極めて重要な自然免疫細胞である。好中球は、病原体を認識すると、すばやく病原体の方へ遊走を開始し、病原体に到着すると活性酸素を産生して、病原体を不活化する。これまでに、細胞内輸送に関わるARFの制御因子が、好中球の活性酸素の産生及び遊走に関わっていることが明らかになっている。そこで、本研究では、ARFと活性酸素産生および遊走の関係に注目し、研究を行った。その結果、ARF1が、細胞骨格の制御タンパク質の一つであるRac1の細胞内局在に深く関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils are important in innate immunity and in the initiating an acute response to infection. During such a response, neutrophils migrate towards invaders and produce antimicrobial agents, including many reactive oxygen species. Previously, we reported that ARF regulatory factors, which are membrane trafficking protein, are involved in superoxide production and chemotaxis of neutrophils. In this study, we examined roles of ARFs in superoxide production and chemotaxis of neutrophil. Our results suggest that ARF1 is involved in subcellular localization of Rac1 during chemotaxis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：好中球 遊走

## 1. 研究開始当初の背景

生体において、好中球の活性酸素産生は非常に重要であり、活性酸素の産生が低下すると、生体は感染症を繰り返して起こし、時には死に至る。一方、活性酸素は、病原体にのみ働くものではないため、不必要な活性酸素の産生は、生体組織に傷害を与え、過剰な炎症を引き起こし、生体に大きなダメージを与える。また、最近、腫瘍免疫において、未熟な好中球が産生する不必要な活性酸素が、抗腫瘍免疫を低下させ、腫瘍の増殖を促していることも報告されている。このように、好中球が産生する活性酸素は、生体において必要不可欠なものの、不必要な産生は毒にしか過ぎず、好中球の細胞内では厳密に制御されている。

遊走もまた、活性酸素の産生と同様、好中球にとって重要な機能の一つであり、その機能低下もまた感染症を引き起こす。好中球は、病原体などの原核生物のタンパク質などを構成する *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) や病原体と反応したマクロファージなどで産生されるインターロイキン 8 (IL-8) などの刺激を受けると、刺激の方へと移動を開始する。これらの誘引物質は、それぞれ別々のレセプターに結合するが、いずれのレセプターも G タンパク質結合型レセプターであり、誘引物質がレセプターに結合すると、三量体 G タンパク質は、 $G\alpha_i$  と  $G\beta\gamma$  は解離すると共に、 $G\alpha_i$  が活性化する。好中球の遊走では、 $G\alpha_i$  ではなく  $G\beta\gamma$  が深く関わっており、 $G\beta\gamma$  がホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K)  $\gamma$  をはじめ様々なタンパク質に結合することによって、結合したタンパク質が活性化し、好中球は極性を形成して、刺激の方向へ移動する。しかし、fMLP による刺激が、好中球の遊走だけでなく、好中球に活性酸素の産生も促すのに対し、IL-8 では、同じ  $G\alpha_i$  を含む三量体 G タンパク質を活性化し、 $G\beta\gamma$  を解離しながら、好中球の遊走を促すのみで、活性酸素の産生を促すことはない。

これまでに、我々は、膜輸送に関わる低分子量 G タンパク質 ARF の GAP の一つである GIT2 が、fMLP や IL-8 刺激による好中球の遊走(走化性)に関わっていること明らかにし、さらに、ARF の GEF の一つである GBF1 も、好中球様細胞に分化させた HL-60 細胞 (以下、dHL-60 細胞) の fMLP 刺激による遊走(走化性)に関わっていることを明らかにした。ま

た、siRNA を使って GBF1 の発現を低下させた dHL-60 細胞では、fMLP の刺激によって活性化した ARF1 の量が、通常の場合と比べてと著しく減少しており、活性酸素の産生量も著しく減少していること。また逆に、GIT2 の発現が欠損した好中球では、fMLP の刺激によって活性化した ARF1 の量が著しく増加しており、活性酸素の産生量も著しく増加していることを明らかにした。このようなことから、ARF は、好中球の活性酸素の産生や遊走において、極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、GBF1 や GIT2 が、好中球の活性酸素の産生や遊走に深く関与していることが明らかになっているものの、ARF には ARF1 から ARF6 までの 6 つが存在し (ヒトでは、ARF2 が存在しないので、5 つのアイソフォームしか存在しない) *in vitro* では GBF1 も GIT2 も、ARF1 から ARF5 までのアイソフォームの活性制御に関わっていることが報告されていることから、どの ARF のアイソフォームが、活性酸素の産生や遊走に関わっているのか明らかになっておらず、また、ARF と活性酸素の産生をつなぐ分子メカニズムや ARF と遊走をつなぐ分子メカニズムも不明である。

## 2. 研究の目的

上記のような研究背景から、本研究では、ARF と活性酸素の産生をつなぐ分子メカニズム及び ARF と遊走をつなぐ分子メカニズムを明らかにするために、ARF に注目し、どの ARF のアイソフォームが、好中球の活性酸素の産生や遊走に関わっているのかを決定し、その後、ARF が活性酸素産生や遊走に関わるメカニズムを調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) ARF 活性化の測定

dHL-60 細胞を 100 nM の fMLP で 5 分間刺激をした後、GST-GGA<sub>31-226</sub> を使い、定法に従って検出した。

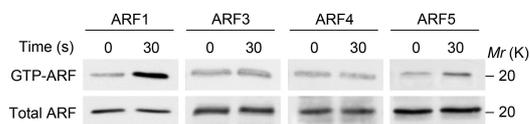
### (2) 免疫染色

dHL-60 細胞をカバーガラスに接着させた後、Dunn チャンバーを用いて、10 nM の fMLP で刺激した。4% パラホルムアルデヒドで固定後、定法に従い、免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

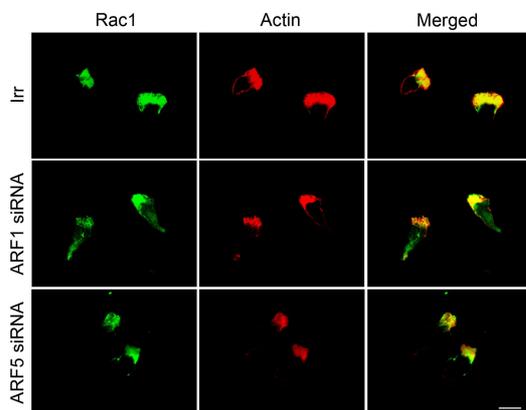
これまでに、我々は、1) dHL-60 細胞を *fMLP* で刺激すると、ARF1 は活性化するものの、ARF6 は活性化しないこと。2) dHL-60 細胞の遊走には、GBF1 が深く関与していることを明らかにしている。一方、*in vitro* において、GBF1 は、ARF1、ARF3、ARF4、ARF5 を活性化することが知られている。そこで、dHL-60 細胞を *fMLP* で刺激によって、いずれの ARF のアイソフォームが活性化するか調べた。その結果、dHL-60 細胞では、ARF1、ARF3、ARF4、ARF5 が発現しているものの、*fMLP* の刺激によって活性化するのは、ARF1 と ARF5 であることが明らかになった[図 1]。

図 1 *fMLP* 刺激による ARF アイソフォームの活性化



さらに GBF1 の発現を抑えると、遊走の際、Rac1 の局在に異常が見られることから、ARF1、ARF5 と Rac1 の関係について解析した。その結果、遊走の際、ARF1 のみ、Rac1 と共局在を示すこと。ARF1、ARF5 の発現を抑えると、ARF1 のみ、GBF1 の場合と同様、Rac1 の局在に異常が見られた。

図 2 Rac1 の局在に対する ARF1、ARF5 siRNA の効果



以上のような結果から、GBF1 は、ARF1 を介して Rac1 の局在に関わっていると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Horinouchi, T., Higashi, T., Mazaki, Y., Miwa, S., 査読無、Carbonyl compounds in the gas phase of cigarette mainstream smoke and their pharmacological properties. *Biol. Pharm. Bull.* (in press)

Higashi, T., Horinouchi, T., Mazaki, Y., Miwa, S., 査読無、A standardized method for preparation of gas phase extract of cigarette smoke. *Biol. Pharm. Bull.* (in press)

Nawata A, Noguchi H, Mazaki Y., Kurahashi T, Izumi H, Wang KY, Guo X, Uramoto H, Kohno K, Taniguchi H, Tanaka Y, Fujii J, Sasaguri Y, Tanimoto A, Nakayama T, Yamada S., 査読有、Overexpression of Peroxiredoxin 4 Affects Intestinal Function in a Dietary Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease., *PLoS One* **11**: e0152549 (2016)  
doi: 10.1371/journal.pone.0152549.

Horinouchi, T., Hoshi, A., Harada, T., Higa, T., Karki, S., Terada, K., Higashi, T., Mai, Y., Nepal, P., Mazaki, Y., Miwa, S., 査読有、Endothelin-1 suppresses insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake via G protein-coupled receptor kinase 2 in skeletal muscle cells., *Br. J. Pharmacol.* **173**: 1018-1032 (2016)  
doi: 10.1111/bph.13406.

Hashimoto, A., Oikawa, T., Hashimoto, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Otsuka, Y., Handa, H., Onodera, Y., Nam, J. M., Oneyama, C., Okada, M., Fukuda, M., Sabe, H., 査読有、P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J. Cell Biol.*, **213**: 81-95 (2016)  
doi: 10.1083/jcb.201510002.

Hashimoto, S., Mikami, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Hashimoto, A., Onodera, Y., Furukawa, S., Handa, H., Oikawa, T., Okada, Y., Oya, M., Sabe, H., 査読有、Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer., *Nat. Commun.*, **7**: 10656

(2016)  
doi: 10.1038/ncomms10656.

Tien, D. N., Kishihata, M., Yoshikawa, A., Hashimoto, A., Sabe, H., Nishi, E., Kamei, K., Arai, H., Kita, T., Kimura, T., Yokode, M., Ashida, N., 査読有、AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- $\kappa$ B under inflammatory conditions., *Sci. Rep.* **4**: 5094 (2014)  
doi: 10.1038/srep05094.

Sato, H., Hatanaka, K. C., Hatanaka, Y., Hatakeyama, H., Hashimoto, A., Matsuno, Y., Fukuda, S., Sabe, H., 査読有、High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients., *Cell Commun. Signal.* **12**: 17 (2014)  
doi: 10.1186/1478-811X-12-17.

Kinoshita, R., Nam, J. M., Ito, Y. M., Hatanaka, K. C., Hashimoto, A., Handa, H., Otsuka, Y., Hashimoto, S., Onodera, Y., Hosoda, M., Onodera, S., Shimizu, S., Tanaka, S., Shirato, H., Tanino, M., Sabe, H., 査読有、Co-overexpression of GEP100 and AMAP1 proteins correlates with rapid local recurrence after breast conservative therapy., *PLoS One* **8**: e76791 (2013)  
doi: 10.1371/journal.pone.0076791.

Nam, J. M., Ahmed, K. M., Costes, S., Zhang, H., Onodera, Y., Olshen, A. B., Hatanaka, K. C., Kinoshita, R., Ishikawa, M., Sabe, H., Shirato, H., Park, C. C., 査読有、Beta1-integrin via NF- $\kappa$ B signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer., *Breast Cancer Res.* **15**: R60 (2013)  
<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3454>

Onodera, Y., Nam, J. M., Sabe, H., 査読無、Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. *Pharmacol Ther.* **140**: 1-9 (2013)  
doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.05.007.

Miura, K., Wakayama, Y., Tanino, M., Orba, Y., Sawa, H., Hatakeyama, M., Tanaka, S., Sabe, H., Mochizuki, N., 査読有、Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of

extracellular signal- regulated kinase. *Oncogene.* **32**: 5292-5301 (2013)  
doi: 10.1038/onc.2012.571.

〔学会発表〕(計3件)

真崎雄一、タバコ煙ガス相水抽出液の簡便な標準的作成法の開発、日本薬理学会、2016年3月10日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

真崎雄一、HL-60細胞のケモタキシスにおいてArf1はRac1の細胞内局在に關与する、日本細胞生物学会、2014年6月13日、奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

真崎雄一、好中球のケモタキシスにおいてGBF1はARF1を介してRac1の局在に關与する、日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2014年12月6日、順天堂大学本郷キャンパス(東京都・文京区)

〔図書〕(計1件)

Hashimoto, S., Hashimoto, A., Sugino, H., Yoshikawa, A., Handa, H., Yoshino, M., Otsuka, Y., Sabe, H., ArfGAPs: not only for the termination. In "Ras-superfamily small G-proteins: biology and mechanisms" Vol. 2 pp 253-274. (Ed. F. Wittenghofer, Springer Pub.) 2014.

〔その他〕

ホームページ等

<http://saibo-yakuri.med.hokudai.ac.jp/>  
<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~g21001/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真崎 雄一 (MAZAKI, Yuichi)  
北海道大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 60311304

(2) 連携研究者

佐邊 壽孝 (SABE, Hisataka)  
北海道大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 40187282