

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」  
平成 20 年度採択研究代表者

福井 宣規

九州大学生体防御医学研究所免疫遺伝学分野・教授

細胞骨格制御シグナルを標的とした免疫難病治療の新戦略

## 1. 研究実施の概要

本研究では、免疫系に発現する CDM ファミリー分子を対象に、発生工学・実験病理学・分子イメージング・プロテオミクス・構造生物学を融合したアプローチにより、これら分子の機能とシグナル伝達機構を包括的に解析し、その理解に立脚して、免疫難病の新しい治療法や予防法を開発することを目的としている。本年度は、好中球遊走における DOCK2 細胞内動態の制御機構を解析し、ホスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)というリン脂質が産生されると DOCK2 が形質膜にリクルートされ、続いてホスファチジン酸(PA)という別のリン脂質との相互作用を介して DOCK2 が先端端に局在化するという、2段階の制御機構が働いていることを明らかにした。また、構造解析に向け、DOCK2 の DHR-2ドメインと Rac1 複合体、N 端領域と ELMO1 複合体、完全長 DOCK2 の発現条件の検討を行い、蛋白質試料を準備すると共に、DOCK2 シグナル阻害剤開発のため、GEF 活性に注目したハイスループットスクリーニング系を構築した。さらに、他の CDM ファミリー分子についてもノックアウトマウスを用いて機能ならびにシグナル伝達機構の解析を行った。本研究の成果は自己免疫疾患や移植片拒絶といった現代医学が解決を迫られている難病の克服に貢献できると期待される。

## 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

### A. CDM ファミリー分子の機能とシグナル伝達機構の解明

好中球は感染局所に速やかに集積し、病原微生物を貪食し、活性酸素を産生することでその除去に働く、いわば生体防御の最前線で機能する白血球である。好中球は感染源を感知すると、その方向に向かって仮足を伸ばす。この仮足は、細胞骨格であるアクチン繊維により構成されており、アクチン繊維が網目状の構造を形成していくことで、仮足の伸張ならびに細胞の推進力を生み出していることが知られている。このようなアクチン繊維の再構成は、細胞内で「分子スイッチ」として働く Rac というたんぱく質により制御されており、この Rac と協調して機能するのが、感染源からの刺激を受けて産生されるホスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)というリン脂質である。我々は以前に、好中球において Rac を活性化する分子(GEF)が DOCK2 であることを突き止め、

DOCK2 が先端端に集積することで局所的にアクチン重合を惹起することを明らかにしたが、DOCK2 の細胞内局在を制御するメカニズムは不明であった。

これまで多くの細胞において、Rac GEF が PIP3 によって先端端にリクルートされ、Rac の活性化を局在化させることで仮足を形成すると考えられてきた。そこで、PIP3 産生に重要な PI3 キナーゼ  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) を欠損した好中球を用いて DOCK2 の細胞内局在を検討したところ、DOCK2 の膜移行が部分的に障害されるものの、最終的に DOCK2 は先端端に集積し、仮足が正常に形成されることを見出した。このことから、DOCK2 の最初の形質膜への移行は PIP3 により担われているが、これに続く先端端への集積は PIP3 以外の分子によって制御されていることが示唆された。

そこで、この分子の同定を目的に研究を行い、ホスファチジン酸 (PA) というリン脂質の産生を担うホスホリパーゼ D (PLD) という酵素の活性を阻害すると、DOCK2 の先端端への集積と仮足の形成が障害されることを見出した。DOCK2 を発現する好中球に PA を添加するとアクチンの重合が惹起されるが、DOCK2 を欠損した好中球ではこのような変化が起こらない。このことから、PA は DOCK2 を介してアクチン重合を制御していると考えられた。さらにこの機能的意義を明らかにするため、PA と結合する領域を特定し、この領域に変異を入れて PA との結合能を失った DOCK2 では、仮足を形成する能力が低下し、好中球の運動を引き起こすことができないことを実証した。

以上より、PIP3 と PA という二種類のリン脂質が順序立てて産生され、DOCK2 を適切な時期に適切な位置に導くことにより、好中球が仮足を伸張して運動する際に必要なアクチンの重合を、時間的・空間的に制御していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。

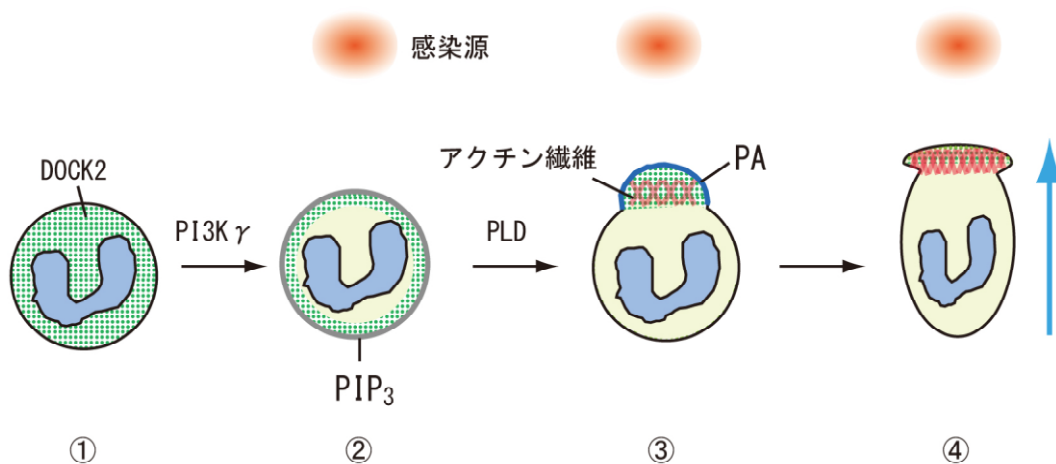


図1 PIP3 と PA による DOCK2 細胞内動態の時間的・空間的制御機構

①未刺激の状態では、DOCK2 は好中球の細胞質にほぼ均一に存在する。②受容体が感染源を感知すると、PI3K  $\gamma$  の働きで PIP3 が産生され、DOCK2 が形質膜に引き寄せられる。③続いて PLD の働きにより PA が産生され、それとの相互作用の結果 DOCK2 が局在化する。DOCK2 が集積した場所では、アクチン重合が惹起され、感染源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。

## B. CDM ファミリー分子群の構造解析

DHR-2 ドメインについては、大腸菌無細胞系を用いて、ヌクレオチド結合が低下した Rac1 変異

体(T17N)との共発現を行うことにより、複合体の蛋白質試料を得ることができた。さらに、この系を利用して、より構造解析に適したDHR-2ドメインの発現領域を選定した。N端領域については、大腸菌無細胞系を用いた通常の発現条件では沈澱傾向を示し、結晶化が困難であったが、ELMO1のC末端領域と共発現を行うことにより、安定な複合体試料の調製に成功した。この複合体試料を用いて、構造解析の評価が可能な共結晶を作製することに成功した。一方、完全長DOCK2については、HEK293細胞発現系を用いて発現条件の検討を行った結果、DOCK2単独では発現が認められるものの、構造解析に十分な発現量が得られず、精製の途中で分解しやすいという問題があった。しかしながら、DOCK2およびELMO1の全長あるいはC末端領域と共発現することにより、DOCK2の発現レベルが大幅に向上し、安定な完全長DOCK2とELMO1との複合体試料を調製することができた。さらに、大腸菌発現系を用いて発現・精製したRac1の共存下でDOCK2複合体の精製を行うことにより、DOCK2・ELMO1・Rac1三者複合体の形成を確認できた。

### C. CDMファミリー分子のシグナル伝達を阻害する低分子化合物の探索

DOCK2の全長あるいはDHR-2ドメインを哺乳類細胞または大腸菌で発現させ、DOCK2により活性化されたGTP結合型Racを検出するアッセイ系を、ハイスループットスクリーニング(HTS)プロトタイプ(96ウェルプレート対応可能な系)として構築した。また、この実験系を基に、HTSプロトタイプの384ウェル化及び機械化の検討に着手した。

## 3. 研究実施体制

### (1)「機能・シグナル解析」グループ

① 研究分担グループ長: 福井 宣規(九州大学、教授)

② 研究項目

CDMファミリー分子の機能とシグナル伝達機構の解明

### (2)「構造解析」グループ

① 研究分担グループ長: 横山 茂之(理化学研究所、領域長)

② 研究項目

CDMファミリー分子群の構造解析

### (3)「創薬研究」グループ

① 研究分担グループ長: 古市 喜義(アステラス製薬株式会社、常勤顧問)

② 研究項目

CDMファミリー分子のシグナル伝達を阻害する低分子化合物の探索

## 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

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*, in press, 2009

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)