

マクロファージの運動・貪食に関わる遺伝子の検索および解析

●真崎雄一 ◆近藤明子 ◆八木良平

(財)大阪バイオサイエンス研究所

〈研究の目的と進め方〉

マクロファージは、免疫、動脈硬化等、様々な生理・病理学的局面で重要な役割を担う貪食細胞である。特に粥状動脈硬化において、この細胞は血管内皮への浸潤、主として酸化LDLの取り込み、泡沫化といった一連の動態変化を行い、初期病変成立過程に深く関与することが知られている。従って、このような動態変化の基本となる運動・貪食過程の分子機構を明らかにすることは、マクロファージの機能を理解する上で重要といえる。

細胞の運動・貪食過程は、細胞骨格・膜の再構成に依存するが、インテグリン裏打ちタンパク質のパキシリンは多数の細胞骨格・膜の制御タンパク質と結合し、マクロファージにおける運動・貪食過程に関与することが明らかにされつつある。

そこで本研究では細胞骨格・膜の再構成に関わると予想されるタンパク質のうち、パキシリン結合性のものに焦点を絞り、類似した機能を持つと考えられるタンパク質を遺伝子データベースを用い検索する。次に検索により得たタンパク質がマクロファージの運動・貪食過程に関与するか検討を行う。さらにパキシリン結合タンパク質に結合する分子をスクリーニングより得ることで、より広範囲の関連分子を網羅的に検索する。この研究で得られた知見は、免疫、動脈硬化等への理解を深め、医学に貢献するものといえる。

〈研究開始時の研究計画〉

1) ARFGAPドメイン及びアンキリンリピートを持つタンパク質の構造及び機能分類

ARFGAPドメイン及びアンキリンリピートを持つタンパク質を分類するために、以下のことを行う。

① 遺伝子データベースより、ARFGAPドメイン及びアンキリンリピートを持つタンパク質を検索し、それらのモチーフ検索を行い、構造的に分類する。

② 単球細胞及びTPAで誘導したマクロファージ様細胞における発現の有無及び誘導前後の発現量を調べる。発現が確認された遺伝子で全長がクローニングされていないものは、RACEを行い、全長を得る。

③ パキシリンに対する結合性を調べるため、目的遺伝子のin vitro translation産物を用い、GSTと融合させたパキシリンとの結合実験を行う。

④ ARFに対するGAP活性の検討を行うために、目的遺伝子をCOS細胞に発現させ、 β -COPの局在の変化を観察することによって、どのクラスのARFに作用するか調べる。

⑤ エンドソームにおける局在について調べため、目的遺伝子をマクロファージ細胞に発現させ、IgGコートビーズを用いてマクロファージに貪食させた場合、マクロファージの泡沫細胞化に関与すると考えられている酸化LDLを用いて貪食させた場合に分け、それらのタンパク質の局在を調べる。

2) ARFGAPドメインを持つタンパク質のマクロファージの運動性に与える影響

1)の②の実験の結果、単球細胞及びTPAで誘導したマクロファージ様細胞における発現が確認されたものに関しては、マウスのマクロファージに発現させ、その運動性をボイデンチャンパー法を用いて解析する。特に酸化LDLを用いたケモタキスによる運動性、ファイブロネクチンなどを用いたハプトタクティックによる運動性に着目し解析を行う。

3) PAGs結合タンパク質及びエンドサイトーシスに関する遺伝子の探求

① PAGsのメンバーのいくつかのものはプロリンリッチドメインを持っていることから、SH3ドメインあるいは、WWドメインを持つタンパク質を検索し、それらのモチーフ検索を行い、構造的に分類する。

② 神経細胞及びマクロファージは、いずれも非常に分化した細胞であり、その共通点はほとんどみられない。しかし、神経細胞はシナプス小胞を、マクロファージは異物を細胞内に取り込むため盛んにエンドサイトーシスを行っている。そこで、①で検索を行った遺伝子について、神経細胞及びマクロファージでマイクロアレイを行い発現を調べる。

③ ②の結果、共通に発現している遺伝子に関して、in vitro translation産物を用い、GSTと融合させたPAGsとの結合を調べる。

④ ②の結果、共通に発現している遺伝子に関して、エンドソームにおける局在について調べため、1)の⑤の解析を行う。

4) 粥状硬化に関与する遺伝子を探索

得られた遺伝子に関して、LDLあるいは酸化LDLを加えたマクロファージ間においてその発現量比を比較し、粥状硬化に関与する遺伝子を探索する。

〈研究期間の成果〉

1) ARFGAPドメイン及びアンキリンリピートを持つタンパク質の構造及び機能分類

登録されているcDNAのうち、ARFGAP領域を持つタンパク質を検索した結果、9つのタンパク質が該当した。これらは、アンキリンリピートを持つもの(7つ)と持たないもの(2つ)の大きく2つの群に分類することができた。これら全てのタンパク質を293T細胞を用い発現させ、パキシリンとの結合を調べた。その結果、アンキリンリピートを持つものでは、発現ができなかった1つを除く、残り6つタンパク質がパキシリンに結合したのに対し、アンキリンリピートを持たないものは、いずれも結合を示さなかった。

さらに、アンキリンリピートを持つもののうち、これまで我々が解析を進めてきたPAG1-3について、マクロファージの貪食過程における関与を調べた結果、ARFGAP領域及びアンキリンリピートを持つPAG1が貪食過程においてほとんど影響を示さなかったのに対し、PAG1のドメインに加えPH、SH3及びプロリンリッチ領域を持つ

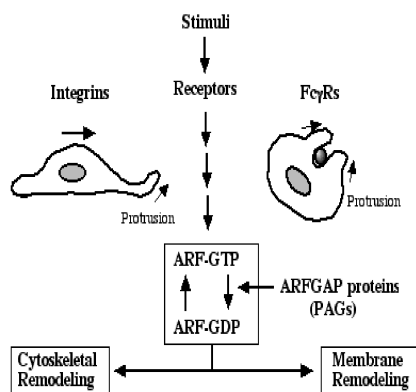
PAG2、3は、食食過程において深く関与することが明らかとなった。[成果公表リスト 論文1]

2) ARFGAPドメインを持つタンパク質のマクロファージの運動性に与える影響

PAG1-3について、マクロファージのハプトタクティクによる運動性を調べた結果、いずれも影響を与えることが明らかとなった。[成果公表リスト 論文2,3]

3) PAGs結合タンパク質及びエンドサイトーシスに関する遺伝子の探求

PAG2、3のプロリンリッチドメインを使ってツーハイブリッドスクリーニングを行った結果、PAG2には5つのタンパク質が、PAG3には6つのタンパク質が結合することが明らかになった。このうち、amphiphysin II、CIN85、intersectin 1は、エンドサイトーシスに関わっていることが知られており、これらはいずれもPAG2、3の両方に結合することが明らかとなった。



〈国内外での成果の位置づけ〉

近年、国外の複数のグループにより新規ARFGAPタンパク質の同定・単離・機能解析結果が次々と報告され、これらの分子が膜輸送系と細胞骨格系の両者を結びつける因子であることが明らかにされつつある。我々は、パキシリン結合タンパク質としてARFGAPタンパク質を単離し、その解析によって、細胞運動に重要な役割を果たしていることを明らかにし、さらに膜輸送系と細胞骨格系の両者を結びつける因子であることを国内外のグループにさきがけて明らかにした。

マクロファージの食食過程は、細胞骨格・膜の再構成を伴うものであるが、この過程にもARFGAPタンパク質が関与することを示した。さらに、PAGs結合タンパク質を単離したことによって、PAGsのマクロファージの運動及び食食に対する役割が詳細になってきた。これらの結果は、マクロファージの運動・食食に留まらず、がん細胞、特に、乳がん細胞の浸潤過程においても同じような分子機構が働いていることが、近年明らかとなり、細胞運動の基本メカニズムを解く手がかりとして注目されている。本研究期間の2年間に3報の論文を報告した。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初の計画では、PAGs結合タンパク質をSH3ドメインあるいは、WWドメインを持つタンパク質を検索することによって見出すことにしていた。しかし、近年、これらのタンパク質が多数単離されてきたことから、これら

を検索・分類することでPAGs結合タンパク質を見出すことが不可能になった。そのため、当初の計画を変更し、ツーハイブリッドスクリーニングによって、PAGs結合タンパク質を単離することとなった。

また、得られた遺伝子に関して、LDLあるいは酸化LDLを加えたマクロファージ間において、その発現量比の比較を試みたが、有意な変化がみられるタンパク質を見出すに至らなかった。

〈今後の課題〉

本研究期間の間に、マクロファージの運動・食食に関わるいくつかのタンパク質を見出した。そこで、これらのタンパク質のmRNAの発現量比をLDLあるいは酸化LDLを加えたマクロファージ間で比較したが、有意な変化を見出すに至らなかった。

近年、これらのタンパク質のなかには転写レベルの調節ではなく、それ以降の調節を受けることによって、タンパク質量が調節されているものが存在することが明らかになってきた。これらのタンパク質が実際にマクロファージの泡沫化に関わっているかどうかに関しては、タンパク質レベルでの更なる解析が必要であると考えられる。

また、近年開発されたRNAi法を使ったノックダウンを行うことで、これまで得られた結果の再検討及び治療への可能性を検討していく必要があると考えられる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. Uchida, H., Kondo, A., Yoshimura Y., Mazaki, Y. and Sabe, H.: PAG3/PAP α /KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor, regulates ARF6 in Fc γ R-mediated phagocytosis of macrophages. *J. Exp. Med.* 193, 955-966 (2001)

2. Mazaki, Y., Hashimoto, S., Okawa, K., Tsubouchi, A., Nakamura, K., Yagi, R., Yano, H., Kondo, A., Iwamatsu, A., Mizoguchi, A. and Sabe, H.: An ADP-Ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization. *Mol. Biol. Cell.* 12, 645-662 (2001)

3. Kondo, A., Hashimoto, S., Yano, H., Nagayama, K., Mazaki, Y. and Sabe, H.: A new paxillin-binding protein, PAG3/Pap α /KIAA0400, bearing an ARF GTPase-activating protein activity is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and migration. *Mol. Biol. Cell.* 11, 1315-1327 (2000)