

きる。これまで抗体でTGaseの存在を観察できても、活性の存在としての検出は困難であった。特にアイソザイムを区別しての活性検出はまだ確実な方法はなかった。そこで高反応性基質配列に相当するペプチドを蛍光標識し、組織切片と反応させ、内在性の酵素活性によって（グルタミン受容側の）基質にペプチドを取り込ませれば、架橋化反応産物を検出できると考えた。

はじめに、皮膚特異的TGaseのひとつ（TGase 1）に対する高反応性基質配列を用いて試みた¹¹⁾。マウス皮膚表皮の凍結切片を調製し、蛍光標識したペプチドを加えて反応させた。図3に方法と結果を示しているが、TGase 1の存在する場所（表皮細胞の細胞膜）に相当してシグナルが観察された。グルタミン残基を変異させたペプチドではこのようなシグナルは存在しない。また、図では省略したが、カルシウムイオンキレート存在下やTGase 1ノックアウトマウス由来の皮膚表皮切片の場合にも観察されない。

この方法により、原理的にはどの組織でも、「活きた」酵素の存在を検証することが可能と考えられる。組織のアイソザイム特異的なTGase活性を高感度に検出するシステムとして今後詳細な研究を展開する予定である。また、さらに第三の活用法として現在、これらのペプチドを利用して、簡易で高感度・高特異性を持つTGaseのアッセイ系も確立している。

TGaseの異常な活性レベルが関与する疾病が、血液凝固や皮膚表皮の形成不全の他、アルツハイマー病等の脳神経疾患や小腸での自己免疫疾患（セリアック病）等、広範な組織で明らかにされている^{14,15)}。このような疾病に関する研究では、血中や組織の酵素活性を高感度に検出することが求められている。これらの研究において、組織での活性の視覚化や微量アッセイ系が役立てられると考えている。今後は、細胞内外の新たな基質検索等の基礎的知見の拡大に加え、先に述べた工学的な応用とあわせて幅広い展開をめざしたい。

本研究は筆者の所属する研究室において、杉村禎昭博士、細野真代氏、北村三矢子氏らとの研究成果であり、紹介して感謝の意を表したい。

- 1) Lorand, L. & Graham, R.M. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 140-156.
- 2) Beninati, S., Bergamini, C.M., & Piacentini, M. (2009) *Amino Acids*, 36, 591-598.
- 3) 人見清隆 (2005) 生化学, 77, 552-558.
- 4) Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005) *Nat. Rev. Mol.*

Cell Bio., 6, 328-340.

- 5) Hitomi, K. (2005) *Eur. J. Dermatol.*, 15, 313-319.
- 6) Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 447-454.
- 7) Esposito, C. & Caputo, I. (2005) *FEBS J.*, 272, 615-631.
- 8) Sugimura, Y., Hosono, M., Wada, F., Yoshimura, T., Maki, M., & Hitomi, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 17699-17706.
- 9) Hitomi, K., Kitamura, Y., & Sugimura, Y. (2009) *Amino Acids*, 36, 619-624.
- 10) Sugimura, Y., Yokoyama, Y., Nio, N., Maki, M., & Hitomi, K. (2008) *Arch. Biophys. Biochem.*, 477, 379-383.
- 11) Sugimura, Y., Hosono, M., Kitamura, M., Tsuda, T., Yamaniishi, K., Maki, M., & Hitomi, K. (2008) *FEBS J.*, 275, 5667-5677.
- 12) Tanaka, Y., Turuda, Y., Nishi, M., Kamiya, N., & Goto, M. (2007) *Org. Biomol. Chem.*, 5, 1764-1770.
- 13) Sugimura, Y., Ueda, H., Maki, M., & Hitomi, K. (2007) *J. Biotechnol.*, 131, 121-127.
- 14) Hartley, D.M., Zhao, C., Speier, A.C., Woodard, G.A., Li, S., Li, Z., & Walz, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 16790-16800.
- 15) Sollid, L.M. (2002) *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 647-655.

人見 清隆

(名古屋大学大学院生命農学研究科
応用分子生命科学専攻)

Identification and application of the preferred substrate peptides for transglutaminases

Kiyotaka Hitomi (Department of Applied Molecular Biosciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan)

Dock ファミリータンパク質による細胞形態・運動の制御

1. はじめに

細胞はアクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格を使ってその形態を変化させたり維持したりしている。細胞骨格は外界からの刺激によって引き起こされる細胞内のシグナル伝達によって厳密にコントロールされており、そのシグナル伝達に重要な役割を担っているのがRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質（Gタンパク質）である。RhoファミリーGタンパク質は、GTPが結合することにより活性状態に、GDPが結合することにより不活性状態になることで、細胞内シグナル伝達分子スイッチとして働いている。またRhoファミリーGタンパク質はグアニンヌクレオチド交換因子（guanine nucleotide exchange

factor, GEF) の働きによって GDP-GTP 交換反応が引き起こされ活性化される. Rho ファミリー G タンパク質を活性化する GEF は, Dbl ホモロジドメイン (DH ドメイン) を共通に持つグループと, Dock ファミリーと呼ばれる独自の活性化領域を持つグループの二つに大きく分類される. 両グループを含めて哺乳類ではこれまでに約 80 種類の GEF が報告されている. このように約 20 種類の Rho ファミリー G タンパク質に対して GEF が数多く存在することで, 様々な刺激に対する細胞の複雑かつ多彩な形態変化が厳密に制御されていると考えられている. Dock ファミリーは, Dock180 に代表される分子量 180–200 kDa の分子ファミリーで, 植物や酵母から哺乳類に至るまで進化の過程で古くから保存されており, 線虫の CED-5 やショウジョウバエの myoblast city については細胞の形態や運動の制御に関する論文がこれまでも幾つか報告されている

(図 1A)¹⁾. 本稿では哺乳類細胞の形態形成や運動性における Dock ファミリータンパク質の役割について, 最近の知見を中心に紹介したい.

2. Dock ファミリータンパク質の構造

1996 年に Dock180 が最初に報告されて以来, 現在では 11 種類の Dock ファミリータンパク質が哺乳類で確認されており, その構造の類似性から大きく四つのグループに分けられる (図 1)¹⁾. Dock ファミリータンパク質にはファミリー間でアミノ酸配列がよく保存されている二つの領域, Dock homology region 1 (DHR1) と DHR2 が存在し, このうち DHR2 を介してそれぞれ特異的な Rho ファミリー G タンパク質を活性化することが知られている. 一方 DHR1 は, ホスファチジルイノシトール 3-リン酸と結合することで Dock ファミリータンパク質の局在に重要で

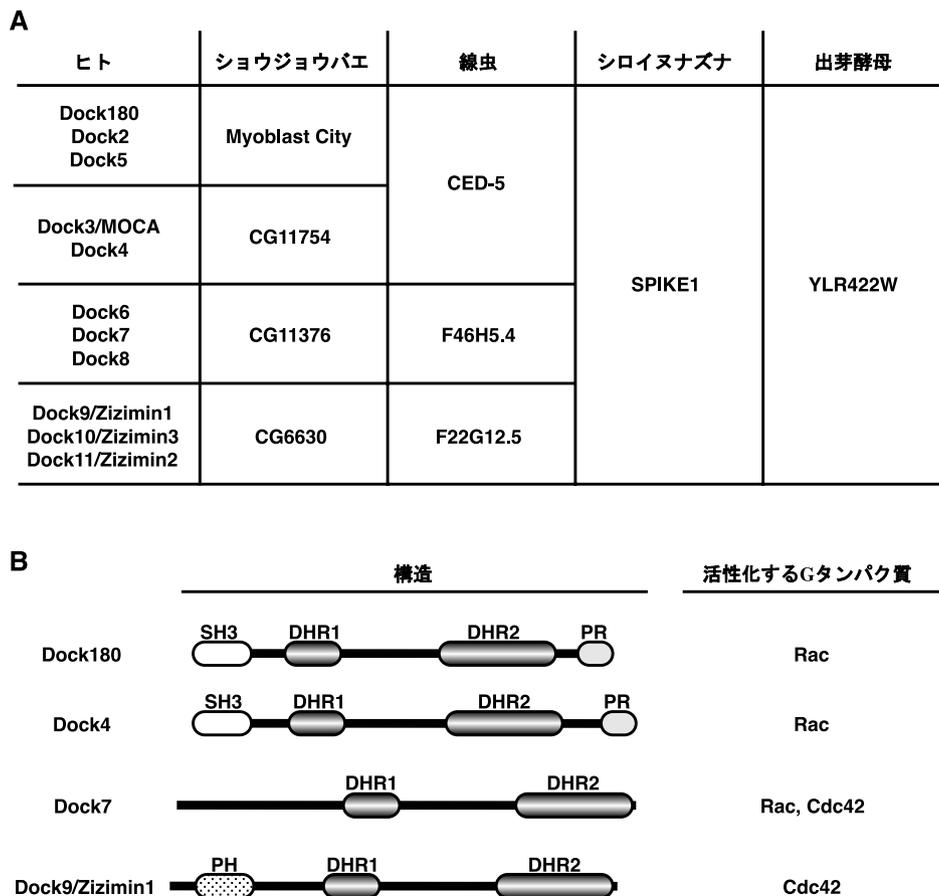


図 1 Dock ファミリータンパク質とその構造

(A) Dock ファミリータンパク質は酵母や植物から哺乳類に至るまで, 進化の過程で古くから保存されている (文献 1 を参照). (B) Dock ファミリータンパク質の構造. SH3, Src homology 3 domain; DHR, Dock homology region; PR, proline-rich region; PH, pleckstrin homology domain.

あることが報告されている²⁾。また最近では DHR1 を介して GEF 活性非依存的にタンパク質の輸送に関わっているとの報告もある³⁾。Dock ファミリータンパク質の中では Dock180 が最も研究が進んでおり、N 末端側の SH3 ドメインを含む領域で engulfment and cell motility (ELMO) と呼ばれるタンパク質と結合することにより、細胞内では ELMO-Dock180 複合体のかたちで Rac に対する GEF として機能していることが報告されている⁴⁾。また C 末側の proline-rich 領域を介してアダプタータンパク質である Crk と結合し、インテグリンからのシグナルを受けていると考えられている。Dock4 についても Dock180 と同様、ELMO と複合体を形成し、Rac を特異的に活性化することを我々は報告している⁵⁾。Dock7 に関しては DHR1, DHR2 以外に特徴的な配列が確認されていないが、最近ニューレグリン 1 受容体 ErbB2 と DHR1 と DHR2 に挟まれた領域を介して直接結合し、チロシンリン酸化を受けることで Rac と Cdc42 両方を活性化することが明らかとなっている⁶⁾。Dock9-11 (Zizimin1-3) グループは N 末側に PH ドメインが存在し、この領域が細胞膜への移行に重要であることが報告されているが、Cdc42 を活性化する以外にどのようなタンパク質と結合しその機能を発揮しているかについては未だ明らかにされていない。

3. Dock ファミリータンパク質による細胞運動の制御

我々は酵母のツーハイブリッドスクリーニング法を用いて、Rho ファミリー G タンパク質の一つ RhoG が活性依存的に ELMO と直接結合することを見だし、Dock180 の活性が RhoG によって制御されていることを明らかにし

た(図2)⁷⁾。通常、刺激のない状態では ELMO-Dock180 複合体は細胞質に局在している。ところが RhoG が活性化されると ELMO と結合して ELMO-Dock180 複合体を細胞膜へと移行させ、そこで細胞膜上に存在する Rac を活性化し、局所的に細胞膜のラフリングなどアクチン細胞骨格の再構成を引き起こす。我々のこれまでの結果から、この RhoG を介した Dock180 の活性化経路が細胞の運動性に対して非常に促進的に働くことが明らかとなっている⁸⁾。我々はショートヘアピン RNA を用いて RhoG を特異的にノックダウンさせた HeLa 細胞を作製し、コントロールの細胞に比べ著しくその運動能力が低下していることを見出した。実際に RhoG がノックダウンされた細胞では運動方向の先端端のラメリポディアの形成が減少しているのが観察されている。この RhoG ノックダウン細胞の運動能力の低下は、ELMO と Dock180 を過剰発現させることにより回復した。逆に元々運動能力が低い HEK293T 細胞に RhoG の常時活性型を過剰発現させたところ、その運動能力が著しく促進され、この促進作用は Dock180 のドミナントネガティブ変異体により抑制された。以上の結果から Dock180 は ELMO を介して RhoG によって活性化され、細胞の運動性を促進していることが明らかになった。RhoG による Dock180 の活性化経路は他にもファゴサイトーシス(食食作用)への関与や、また赤痢菌が細胞内に侵入するときこの経路を活性化することも報告されている^{9,10)}。

また別の Dock ファミリーでは最近、Dock3 と Dock10/ Zizimin3 が、がん細胞の浸潤に関わっていることが報告された^{11,12)}。がん細胞の浸潤は、プロテアーゼ依存的な間葉性遊走とプロテアーゼ非依存的なアメーバ様遊走とに大き

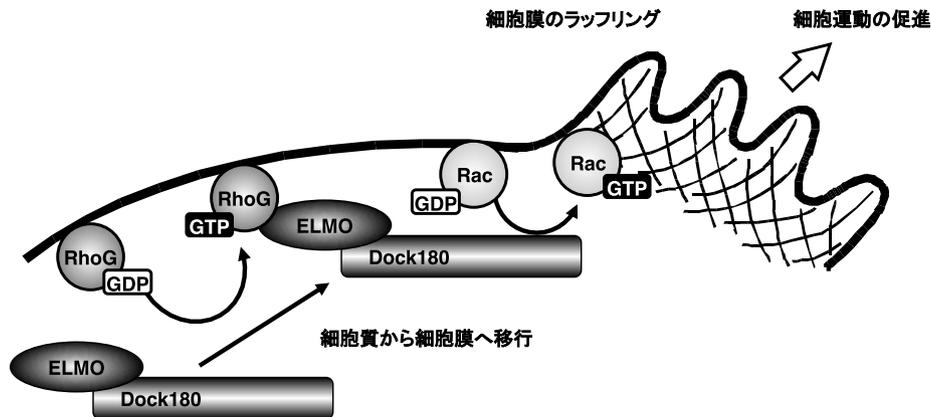


図2 RhoGによるDock180を介したRacの活性化
活性化されたRhoGはELMOと結合し、細胞質に存在するELMOとDock180の複合体を細胞膜へと移行させ、そこで局所的にRacの活性化を引き起こす。

く分けられるが、このうち Dock3 は Rac を活性化し間葉性遊走に、一方 Dock10/Zizimin3 は Cdc42 を活性化することでアメーバ様遊走にそれぞれ関与していることが示された。このようにがん細胞が Dock ファミリータンパク質を使い分けることによってその浸潤様式を変えていることは大変興味深く、がん転移の治療法の確立に向けた今後の研究が期待される。

一方、シュワン細胞は末梢神経の軸索を取り巻くミエリンを形成する細胞で、その遊走の制御がミエリン形成に深く関わっていることが知られているが、そのシュワン細胞の遊走がニューレグリン1とその受容体 ErbB2 によって促進され、その下流で Dock7 が活性化されて Rac と Cdc42 両方が活性化されることが必要であることが明らかになっている⁶⁾。

4. Dock ファミリータンパク質による神経細胞の形態制御

我々は最近、脳における Dock ファミリータンパク質の機能を解明する目的で、まず発達期における Dock ファミリータンパク質の発現を調べた。その結果、Dock4 が生後の海馬において強く発現することが認められた¹³⁾。そこでラットの初代培養海馬神経細胞を用いて神経細胞の成長と Dock4 の発現量との関係を Dock4 特異的抗体で調べたところ、Dock4 が神経細胞の樹状突起の伸長を始める時期にその発現が急激に上昇することを見いだした (図 3A)。そこでショートヘアピン RNA を用いて内在性の Dock4 の発現を減少させたところ、コントロールの細胞に比べその樹状突起の枝分かれが減少していることが観察された。一方、海馬神経細胞に Dock4 とその結合タンパク質である ELMO2 を過剰に発現させたところ、樹状突起の枝分かれが著しく増えていることが明らかとなった (図 3B)。この Dock4 による樹状突起の分枝形成促進作用は、Dock4 による DHR2 を介した Rac の活性化、並びに C 末端側の proline-rich 領域が重要な役割を担っていることも明らかとなった。我々は現在、酵母のツーハイブリッドスクリーニング法を用いて Dock4 の C 末端側 proline-rich 領域に特異的に結合するタンパク質を幾つか同定しており、今後これらのタンパク質との結合と樹状突起の分枝形成促進作用との関わりについて解析していく予定である。

一方、我々は Dock4 の解析と並行して、Cdc42 を活性化する Dock9-11 (Zizimin1-3) のグループについて、脳における発現パターンの解析を行った。その結果、発達期においては Dock9/Zizimin1 の大脳皮質や海馬の神経細胞で

の発現が検出された¹⁴⁾。一方 Dock10/Zizimin3 に関しては成体における海馬の歯状回でその発現が特異的に認められたが、Dock11/Zizimin2 は脳における発現が確認できなかった。そこで発達期にその発現が最も多く認められた Dock9/Zizimin1 について、ラットの初代培養海馬神経細胞を用いて神経細胞の成長と発現量との関係を調べたところ、Dock9/Zizimin1 も Dock4 と同様、神経細胞の樹状突起の伸長を始める時期にその発現が急激に上昇することを見いだした。そこでショートヘアピン RNA を用いて内在性の Dock9/Zizimin1 の発現を減少させたところ、コントロールの細胞に比べその樹状突起の伸長が抑制され、全体の樹状突起の長さが減少していることが観察された。しかし樹状突起の分枝数に関しては有意な差は見られなかった。この Dock9/Zizimin1 による樹状突起の伸長促進作用は、Dock9/Zizimin1 による DHR2 領域を介した Cdc42 の活性化、並びに PH ドメイン、DHR1 を介した細胞膜への局在化が必要であることも示された。

以上我々の最近の結果から、Dock4 と Dock9/Zizimin1 はどちらも海馬神経細胞において樹状突起の形成に深く関わっていることが示され、Dock4 が Rac を活性化することで樹状突起の分枝化に、一方 Dock9/Zizimin1 は Cdc42 を活性化することで樹状突起の伸長にそれぞれ関与していることが明らかとなった。また最近の報告で、Dock ファミリーに属する Dock7 が神経細胞の軸索の形成に、Dock180 が軸索の誘導にそれぞれ関与していることが報告されており^{15,16)}、同じ Dock ファミリーに属するタンパク質が神経細胞の形態形成においてそれぞれ違った働きを担っていることが示唆される。

5. おわりに

これまでに Dock ファミリータンパク質による細胞形態や運動の制御について、最近の報告を中心に紹介してきた。今回紹介できなかった研究も含め、Dock ファミリータンパク質は細胞の形態形成や運動において非常に重要な働きを担っていることが数多く報告されてきており、今後これらの研究がさらに発展することが期待される。一方これまでの Dock ファミリータンパク質に関する研究は細胞を用いた研究が中心であり、個体における生理機能の研究については、Dock180 や Dock2 など一部の Dock ファミリーで報告があるのみで、他の Dock ファミリータンパク質に関してはノックアウトマウスなどを用いた今後の研究が待たれるところである。また Dock ファミリータンパク質とがん細胞の浸潤作用の関係など、疾患との関わりも非

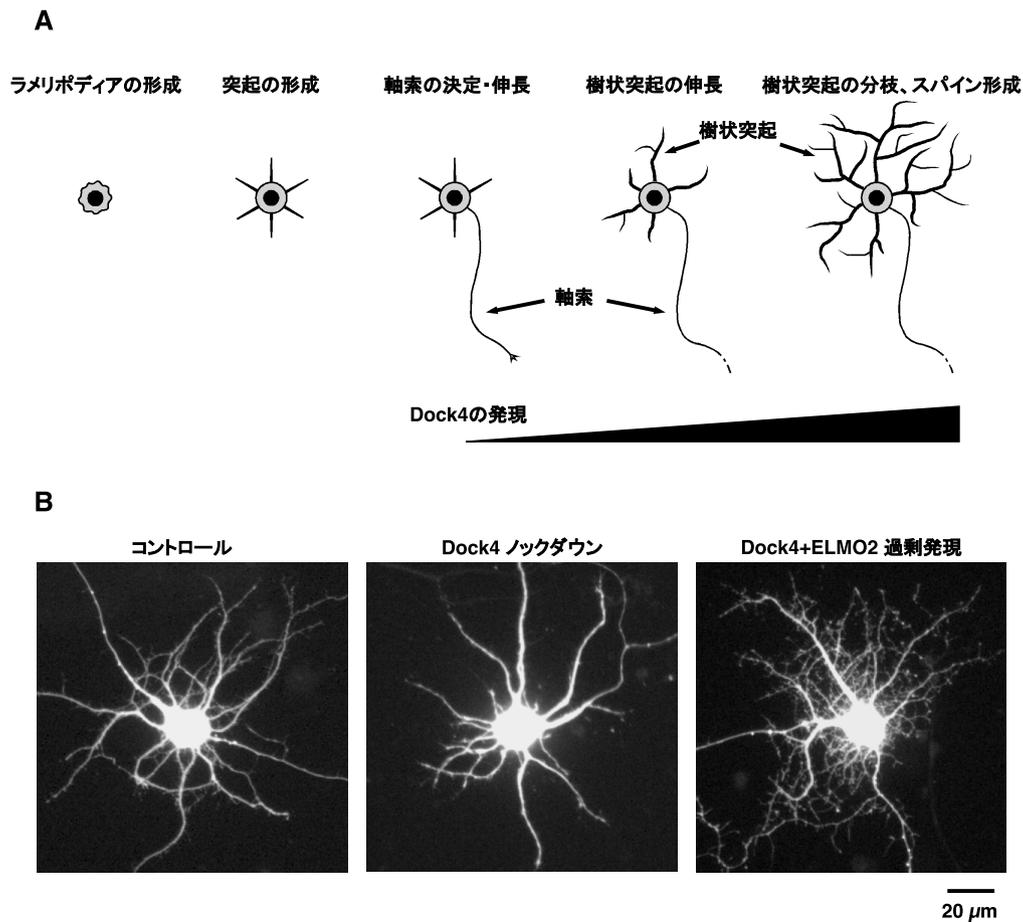


図3 Dock4による海馬神経細胞の樹状突起分枝形成促進作用

(A) 初代培養した海馬神経細胞は、接着後直ちにラメリポディアを形成し(ステージ1)、その後24時間以内に数本の神経突起を伸ばす(ステージ2)。その後、伸ばした神経突起のうち1本が急速に伸長して軸索となり(ステージ3)、その数日後には残りの神経突起も伸長を始めて樹状突起が形成される(ステージ4)。その後樹状突起は枝分かれが起こり、スパインが樹状突起上に形成される(ステージ5)。海馬神経細胞におけるDock4の発現は、樹状突起の伸長が始まる時期に急激に上昇する。(B) 海馬神経細胞を培養後、yellow fluorescent protein (YFP) とともに各発現ベクターを導入し、固定後、YFPの蛍光によって樹状突起の形態観察を行った。

常に興味深いところであり、我々もその点について今後明らかにしていきたいと考えている。

- 1) Côté, J.F. & Vuori, K. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 4901-4913.
- 2) Côté, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A., & Vuori, K. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 797-807.
- 3) Hara, S., Kiyokawa, E., Iemura, S., Natsume, T., Wassmer, T., Cullen, P.J., Hiai, H., & Matsuda, M. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 3823-3825.
- 4) Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G. R., & Ravichandran, K.S. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 574-582.
- 5) Hiramoto, K., Negishi, M., & Katoh, H. (2006) *Exp. Cell*

- Res.*, **312**, 4205-4216.
- 6) Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Chan, J.R., & Tanoue, A. (2008) *J. Cell Biol.*, **2**, 351-365.
- 7) Katoh, H. & Negishi, M. (2003) *Nature*, **424**, 461-464.
- 8) Katoh, H., Hiramoto, K., & Negishi, M. (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 56-65.
- 9) deBakker, C.D., Haney, L.B., Kinchen, J.M., Grimsley, C., Lu, M., Klingele, D., Hsu, P.K., Chou, B.K., Cheng, L.C., Blangy, A., Sondek, J., Hengartner, M.O., Wu, Y.C., & Ravichandran, K.S. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 2208-2216.
- 10) Handa, Y., Suzuki, M., Ohya, K., Iwai, K., Ishijima, N., Koleske, A.J., Fukui, Y., & Sasakawa, C. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 121-128.
- 11) Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A., & Marshall,

- C.J. (2008) *Curr. Biol.*, 18, 1456–1465.
- 12) Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., & Marshall, C.J. (2008) *Cell*, 135, 510–523.
- 13) Ueda, S., Fujimoto, S., Hiramoto, K., Negishi, M., & Katoh, H. (2008) *J. Neurosci. Res.*, 86, 3052–3061.
- 14) Kuramoto, K., Negishi, M., & Katoh, H. (2009) *J. Neurosci. Res.*, 87, 1794–1805.
- 15) Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E., & Van Aelst, L. (2006) *Neuron*, 51, 727–739.
- 16) Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J., & Rao, Y. (2008) *Nat. Neurosci.*, 11, 28–35.

加藤 裕教

(京都大学大学院生命科学研究科)

Regulation of cell morphology and motility by Dock family proteins

Hironori Katoh (Laboratory of Molecular Neurobiology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

低温細菌における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能

1. はじめに

高度不飽和脂肪酸 (PUFA) のエイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) は近年、健康食品として注目されている。これらを含む魚の摂取が推奨され、種々のサプリメントが開発されている。これらの脂肪酸はメチル末端から3番目の炭素とその次の炭素の間に二重結合をもつことから ω 3系あるいはn3系脂肪酸と総称されるが、ヒトはこれらを *de novo* 合成できず、EPA や DHA そのもの、あるいはそれらの合成前駆体となる α -リノレン酸を魚や植物から摂取する必要がある。これらの脂肪酸には抗炎症作用があるほか、心疾患発症リスクを抑える効果や脳の正常な発達を助ける効果があると言われている^{1,2)}。脂質メディエーター前駆体となるほか、リン脂質のアシル鎖として生体膜の物理化学的性質に影響を及ぼすが、分子レベルでの詳細な機能発現メカニズムは未だ不明な状態におかれている。

EPA や DHA は一部の細菌においても重要な役割を果たす。細菌は1970年代までPUFAをもたないと考えられていたが、その後、 γ プロテオバクテリアに属する種々の海洋性細菌がEPAやDHAを生産することが明らかにされ、

これらの細菌におけるPUFAの生理機能が注目されるようになった³⁻⁶⁾。1990年代から2000年代にかけて、これらの細菌におけるPUFA生合成遺伝子が明らかにされ、その生理機能を分子遺伝学的手法などで解析することが可能になった^{3,5)}。そのような手法によって、ここ数年、筆者らのグループを含め、いくつかの研究グループによってPUFAの機能解析が進められている。本稿では細菌におけるPUFAの生合成機構と生理機能に関する最近の知見と今後の課題について述べる。

2. PUFAの生合成

ヒトが α -リノレン酸からEPAやDHAを生合成する反応には脂肪酸の伸長反応を触媒する酵素や分子状酸素依存的に二重結合を導入する脂肪酸不飽和化酵素が関与する⁶⁾。ヒトはn3不飽和化酵素をもたないため、n3系PUFAである α -リノレン酸を合成前駆体として摂取する必要があるが、線虫 *Caenorhabditis elegans* やある種のカビはn3不飽和化酵素を含む一連の酵素群を有しており、n3系PUFAの *de novo* 合成を行うことができる⁶⁾。

一方、細菌は、ヒト、線虫、カビなどとは全く異なる経路でn3系PUFAを生合成する^{5,6)}。この反応はポリケチド合成系酵素群と類似した酵素群によって触媒される (図1A)。炭水素鎖の二重結合は脱水反応によって導入され、脂肪酸不飽和化酵素はこのプロセスに関与しない。したがって分子状酸素は要求されず、嫌気的条件下でもPUFAの合成が可能である。このような生合成経路は γ プロテオバクテリアに属する *Shewanella* 属、*Photobacterium* 属、*Moritella* 属、*Colwellia* 属、*Psychromonas* 属の海洋性細菌のほか、海洋性真核微生物であるラビリンチュラ類でも見いだされている⁵⁾。進化的にかけ離れた生物間に共通した代謝経路が存在することから、n3系PUFA生合成系遺伝子群はこれらの生物間で水平伝播したものと考えられている。これらの微生物は海洋環境における主要なn3系PUFAの一次生産者と考えられており、魚類におけるEPAやDHAの蓄積に大きく寄与していると考えられている。

3. 海洋性低温細菌におけるEPA含有リン脂質の機能

これまでにn3系PUFA生産能が示された細菌のほとんどは海洋性の低温菌である。低温菌は極地や深海など地球上の生命圏のおよそ8割を占める低温環境に生息する⁷⁾。近年、低温菌が生産する低温活性酵素を低温反応プロセスに利用する試みや⁸⁾、低温菌を低温での物質生産の宿主として開発する取り組みがなされており⁹⁾、産業的に注目を