

Biol. Chem., 279, 47402-47410.

- 17) Tian, Y., Zhou, R., Rehg, J.E., & Jackowski, S. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 975-982.

杉本 博之
(獨協医科大学大学生化学)

Transcriptional regulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase α in phospholipid biosynthesis
Hiroyuki Sugimoto (Department of Biochemistry, Dokkyo Medical University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan)

単球・マクロファージ遊走制御タンパク質「フロント」

1. はじめに

白血球の細胞遊走は、炎症・免疫応答において必要な場所に必要な細胞を動員するための重要な生命現象である。細胞遊走の基本的なメカニズムは、細胞性粘菌などの単細胞生物から哺乳類白血球細胞まで保存されており、遊走シグナルの受容にGタンパク質共役型受容体(GPCR)を用いること、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)の局在化から細胞骨格の再構成に至る経路などほぼ共通している。細胞性粘菌ではcAMPまたは葉酸を遊走因子として感知するのに対して、白血球では遊走因子としてケモカインという約50種類にのぼる多様な分子群を感知する。ケモカインレセプターは約20種類が報告されており、白血球の細胞遊走は、この多様なケモカイン・ケモカインレセプターの組み合わせによって、複雑かつ巧妙に制御されていると考えられる。これまでの細胞遊走のメカニズムについての知見の多くは細胞性粘菌の研究から得られたものであり、白血球遊走の詳細についてはまだ不明な点が多い。最近、我々は炎症反応において中心的な役割を果たす白血球の一種、単球・マクロファージに発現するケモカインレセプターCCR2に会合し、これらの細胞の遊走を制御する因子として新規分子「フロント」を報告した¹⁾。本稿ではこれまで明らかとなっている白血球遊走制御の知見とこの新規分子フロントの機能について紹介したい。

2. 単球・マクロファージ遊走を制御するケモカインレセプターCCR2

単球は血中より炎症局所に動員され、局所でマク

ロファージへと分化する。マクロファージは、感染細胞やアポトーシス細胞の貪食、各種のサイトカインの産生を担う炎症反応において重要な細胞である。しかしながら過剰な単球・マクロファージの集積は、動脈硬化症や関節リウマチなどの原因となる。ケモカインレセプターCCR2はこれらの単球・マクロファージに発現し、ケモカインCCL2などの刺激によって細胞遊走を誘導する。このCCR2の活性化制御によって単球・マクロファージの過剰な集積を防ぐことが、関連する疾患の予防・治療につながるものと期待される。

3. 白血球の遊走シグナル

細胞が遊走するとき、細胞に前後の極性が生じ、前方ではアクチン骨格の再構築による葉状仮足、糸状仮足の形成、後方では細胞接着が剥がれ収縮が行われる。葉状仮足、糸状仮足の形成にはそれぞれ低分子量Gタンパク質Rac, Cdc42が関与していることが知られている。これらの前方部特異的な活性化は、イノシトールリン脂質の一種であるPIP3という拡散速度の遅い分子が前方部に局在化することが重要である。これにより、PIP3に結合するPHドメインを有する分子が前方へリクルートされ、アクチン重合を引き起こす。PIP3の先端部への局在化は、PIP2からPIP3を産生するリン酸化酵素PI3Kの先端部への局在化およびPIP3をPIP2に代謝するホスファターゼ・テンシン・ホモログ(PTEN)の細胞後部への局在化によって厳密に制御されていると考えられている。最近では、後部におけるPIP3→PIP2の変換にチロシンホスファターゼSHP-1も重要な働きをしているという報告もなされている^{2,3)}。これまでの知見から、PIP3を先端部に局在化させる最上流はPI3Kということになるが、PI3Kの局在自体がアクチン重合依存的事実であることが明らかとなっており、さらにPI3Kの活性化を制御する未知の機構が存在すると考えられる。また生体内では細胞は非常に希薄なケモカイン濃度勾配を感知できるが、その細胞表面のケモカインレセプターの発現は均一であると考えられており、希薄なケモカイン濃度勾配を検知する初期シグナルと、それを細胞内シグナル分子の急勾配へと変換する増幅機構が存在すると考えられる。このように濃度勾配に応じた細胞の極性化の機構については、いまだ不明な点が存在する。

4. 遊走制御機構に重要なケモカインレセプターの細胞膜近傍C末端領域(Pro-C領域)

ケモカインレセプターの7回膜貫通領域以降のC末端

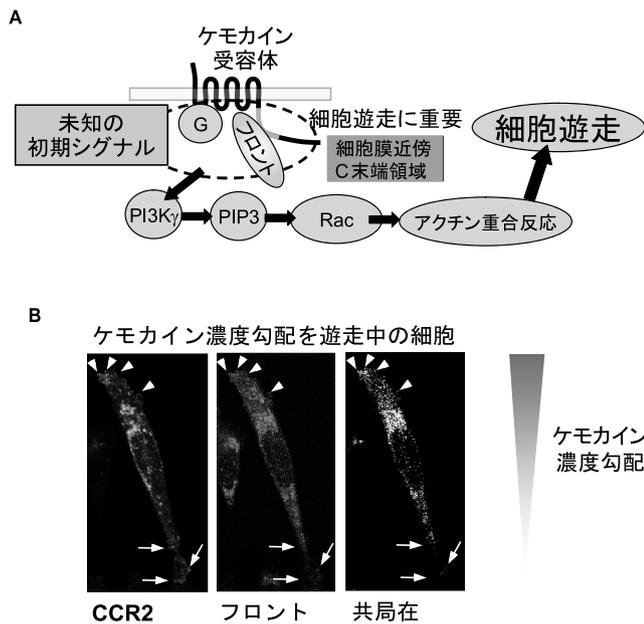


図1 細胞遊走シグナルの未知な領域と新規分子フロント

A. ケモカインレセプターの細胞膜近傍C末端領域(Pro-C領域)は細胞遊走に重要であるとされ, 新規分子フロントはこの部位に結合する.

B. TAXIScan システム ((株)エフェクター細胞研究所) を用いてケモカイン濃度勾配下を遊走する細胞を観察すると, フロントとケモカインレセプター CCR2 との共局在(矢じり)がケモカイン濃度勾配の高いほうに多く認められる. 後方には CCR2 単独のシグナル(矢印)が認められる.

細胞内領域は, 受容体の活性化依存的なインターナリゼーションを誘導する G タンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK) が結合する領域を含んでいるが, そのリン酸化部位を欠損しても遊走活性は維持される. しかしさらに上流の細胞膜近傍 C 末端領域 (proximal C-terminal domain: Pro-C 領域) を欠損した変異体では遊走活性がみられないことが知られており⁴⁾, この Pro-C 領域が細胞遊走シグナル誘導に必須であることが示唆されている (図 1A). そこでこの領域が受容体下流の細胞遊走に関与する細胞内シグナル伝達分子の活性化に重要であることが想定された. 我々は Pro-C 領域の細胞遊走における重要性を説明する未知の分子機構が存在すると推測し, この領域に結合し, 遊走シグナルを制御する未知の分子が存在するという仮説をたて, 結合分子の探索を行った.

5. Pro-C 領域に結合する新規分子「フロント」の発見

我々は酵母ツーハイブリッドシステムを用いて, CCR2 の C 末端領域をえさ (bait) としてヒト単球・マクロファ-

ジ系の細胞株である THP-1 細胞の cDNA ライブラリーの探索を行い, CCR2 の C 末端に結合する分子を抽出した. さらにこの中から遊走活性を制御する分子のスクリーニングを行い, 新規分子を同定することに成功し, 「フロント (FRONT)」と命名した.

フロントは, それまで知られていたケモカインレセプターに会合する分子 (三量体 G タンパク質, GRK, JAK など) のいずれとも異なる新規の分子であった. フロントは 656 アミノ酸からなる細胞内可溶性タンパク質であり, 細胞性粘菌, 線虫からヒトまで高度に保存されている (図 2A). フロントタンパク質には種を超えて高度に保存されているクラスリン重鎖のうち CHCR6 と高い相同性を示すクラスリン重鎖リピード (CHCR) 様ドメインが一つ存在する (図 2B). フロントのように分子内に一つの CHCR 様ドメインをもつタンパク質は他にも存在し, CHCR 類似タンパク質として Vps11, Vps18, Vps39, Vps41 などが報告されている (図 2C, D)⁵⁻⁸⁾. これらは CHCR 様ドメインを介したタンパク質間相互作用やタンパク質のオリゴマー化を制御することが知られている.

6. フロントは細胞の進行方向前方でケモカインレセプターと共局在する

フロントは遊走促進作用によるスクリーニングで得られた分子であるが, 実際にフロント抑制細胞, 強制発現細胞を樹立して遊走活性を比較すると, フロント抑制細胞では遊走活性の低下が認められ, フロント強制発現細胞では遊走活性の亢進が認められた.

さらに新規分子フロントとケモカインレセプター CCR2 のケモカイン濃度勾配下における局在様式を観察した結果, フロントは細胞全体に存在するが, フロント-CCR2 の共局在は濃度勾配の高い側に集中して存在することが判明した (図 1B). このことはフロントが遊走因子の濃度勾配の高い側に存在する受容体に対して選択的に結合することを示している. 遊走因子受容体と受容体会合分子との相互作用が細胞前方部特異的に見られるという現象は, 方向性認識から極性化にいたるメカニズムの解明に重要な知見である. この前方部選択的な結合のメカニズムを今後詳細に解析する必要がある.

7. 遊走シグナル関連分子とフロントとの位置関係

我々はフロントと遊走シグナル関連分子との位置関係についても明らかにした. フロントを強制発現した細胞では, 葉状仮足の形成が亢進しており, PI3K の阻害剤存在

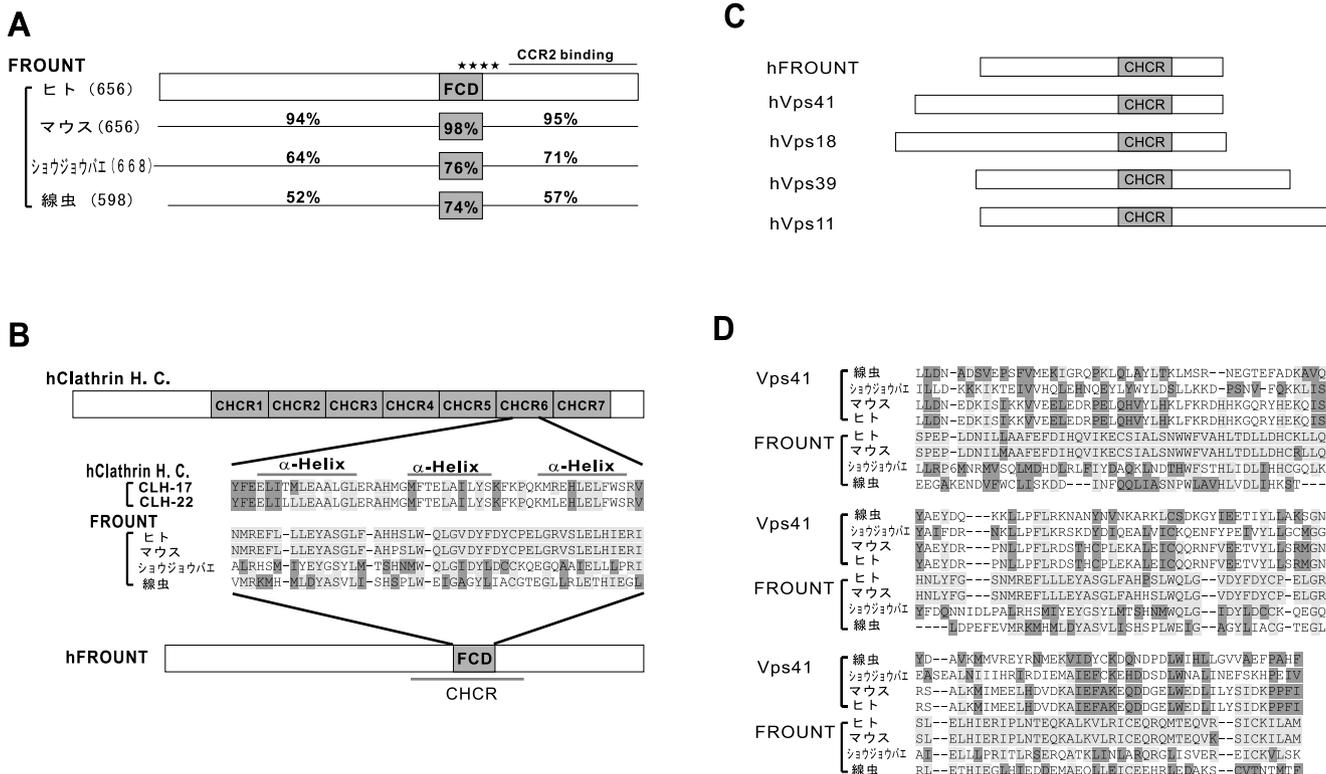


図 2 クラスリン重鎖相同タンパク質フロント
 A. フロントは線虫からヒトまで高度に保存されたタンパク質である。
 B. フロントは分子内に一つの CHCR 様ドメインをもつ。FCD = FROUNT conserved domain
 C. 分子内に一つの CHCR 様ドメインをもつタンパク質。
 D. フロントと CHCR 類似タンパク質 Vps41 のそれぞれの CHCR 様ドメインのアミノ酸配列の同源性。

下ではこの亢進作用が減弱し、葉状仮足形成に参与する低分子量 G タンパク質 Rac の活性化も減弱した。これはフロントが Rac の活性化と葉状仮足形成を促進することを示すものである。またケモカインレセプターからのシグナルによって PI3K が活性化されると PH ドメインタンパク質の細胞膜への局在化が誘導されるが、フロント強制発現細胞ではこの PI3K 依存的な PH ドメインの細胞膜への局在化が無刺激状態においても認められ、刺激後の細胞膜への局在化も亢進することが示された。また、ケモカインレセプターからのシグナル伝達には刺激依存的なクラスター形成が重要であるが^{9,10)}、フロントはこのクラスター形成を促進する作用をもつ。このようなフロントの機能は PI3K 阻害剤、あるいは一般的な遊走シグナルに重要と考えられている三量体 G タンパク質 Gαi サブユニットの阻害剤存在下でも発揮され、フロントが受容体直下の、これまで知られている中でもごく上流において遊走シグナル伝達機構の増幅に参与している可能性が示された。図 3A に

フロントの機能をまとめた。これらの結果より、フロントは遊走シグナルの中でも初期シグナルに参与する重要な分子であることが示唆される。最近、低分子量 G タンパク質である Ras がこの初期シグナルに参与することが報告され¹¹⁾、遊走因子受容体に直接会合する分子フロントとの関連も注目される。

8. 生体レベルでのフロントの機能

フロントの細胞遊走促進機能は個体レベルにおいても示されている¹⁾。マウスでフロント発現を抑制すると、単球・マクロファージの数・比率に大きな差は見られないが、腹膜炎モデルでのマクロファージの遊走・組織浸潤が低下することを我々は見出した。CCR2 欠損マウスにおいてもこれとほぼ同様の結果が観察されることより^{12~14)}、フロントは生体レベルにおいても CCR2 を介したマクロファージ遊走に重要な役割を担っていることが示唆される。また最近、慢性炎症性疾患である心不全患者組織にお

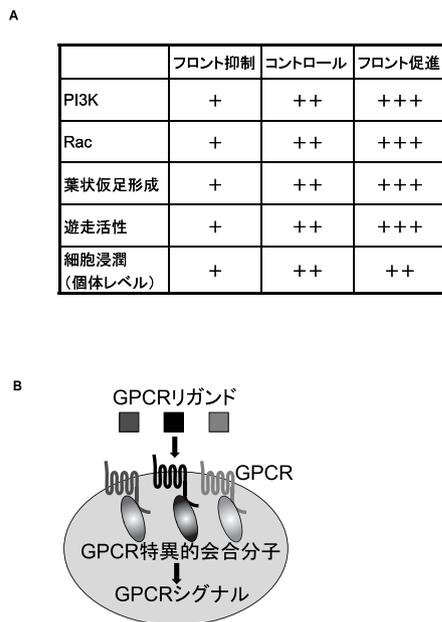


図3 フロントの細胞遊走シグナル制御における機能と GPCR 特異的の会合分子による GPCR シグナル制御の可能性

A. フロントは細胞遊走に重要な PI3K の活性化と Rac の活性化の促進, および Rac を介する葉状仮足形成を促進する. フロントは細胞遊走に促進的に働き, 個体レベルのマクロファージの組織浸潤にも促進的な関与が明らかとなっている.

B. CCR2 会合分子フロントの存在は, 他の GPCR においても特異的な会合分子が存在し, GPCR シグナルを制御している可能性を暗示している.

いてフロント mRNA レベルが増加することが報告され¹⁵⁾, ヒトにおいてもフロントの炎症性疾患への関与が示されている.

9. 今後の展望

今後は個体レベルでのフロントの機能をさらに詳細に解明するとともに, PI3K とフロントとのつながりを解明し, 遊走初期シグナルの全容解明につなげたい. 現在, フロント/CCR2 の結合阻害剤の開発を行っており, これが実現すれば, 全く新しい作用機序による CCR2 機能制御法として, CCR2 関連疾患の治療への応用が期待される. そして CCR2 特異的の会合分子として同定されたフロントであるが, このような C 末端特異的の会合分子が他のケモカインレセプター, あるいは他の GPCR にも存在し, 個々の GPCR のシグナルを制御している可能性も十分考えられ

る. そこには新たな GPCR シグナル制御ワールドが存在しているかもしれない (図 3B).

- 1) Terashima, Y., Onai, N., Murai, M., Enomoto, M., Poonpiriya, V., Hamada, T., Motomura, K., Suwa, M., Ezaki, T., Haga, T., Kanegasaki, S., & Matsushima, K. (2005) *Nat. Immunol.*, 6, 827-835.
- 2) Nishio, M., Watanabe, K., Sasaki, J., Taya, C., Takasuga, S., Iizuka, R., Balla, T., Yamazaki, M., Watanabe, H., Itoh, R., Kuroda, S., Horie, Y., Forster, I., Mak, T.W., Yonekawa, H., Penninger, J.M., Kanaho, Y., Suzuki, A., & Sasaki, T. (2007) *Nat. Cell. Biol.*, 9, 36-44.
- 3) Ferguson, G.J., Milne, L., Kulkarni, S., Sasaki, T., Walker, S., Andrews, S., Crabbe, T., Finan, P., Jones, G., Jackson, S., Camps, M., Rommel, C., Wymann, M., Hirsch, E., Hawkins, P., & Stephens, L. (2007) *Nat. Cell. Biol.*, 9, 86-91.
- 4) Arai, H., Monteclaro, F.S., Tsou, C.L., Franci, C., & Charo, I. F. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 25037-25042.
- 5) Peterson, M.R. & Emr, S.D. (2001) *Traffic*, 2, 476-486.
- 6) Darsow, T., Katzmam, D.J., Cowles, C.R., & Emr, S.D. (2001) *Mol. Biol. Cell.*, 12, 37-51.
- 7) Caplan, S., Hartnell, L.M., Aguilar, R.C., Naslavsky, N., & Bonifacino, J.S. (2001) *J. Cell. Biol.*, 154, 109-122.
- 8) Nakamura, N., Hirata, A., Ohsumi, Y., & Wada, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 11344-11349.
- 9) van Buul, J.D., Voermans, C., van Gelderen, J., Anthony, E.C., van der Schoot, C.E., & Hordijk, P.L. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 30302-30310.
- 10) Nieto, M., Frade, J.M., Sancho, D., Mellado, M., Martinez, A. C., Sanchez-Madrid, F (1997) *J. Exp. Med.*, 186, 153-158.
- 11) Sasaki, A.T., Chun, C., Takeda, K., & Firtel, R.A. (2004) *J. Cell. Biol.*, 167, 505-518.
- 12) Kuziel, W.A., Morgan, S.J., Dawson, T.C., Griffin, S., Smithies, O., Ley, K., & Maeda, N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12053-12058.
- 13) Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., & Bravo, R. (1997) *J. Exp. Med.*, 186, 1757-1762.
- 14) Boring, L., Gosling, J., Chensue, S.W., Kunkel, S.L., Farese, R.V. Jr., Broxmeyer, H.E., & Charo, I.F. (1997) *J. Clin. Invest.*, 100, 2552-2561.
- 15) Satoh, M., Akatsu, T., Ishikawa, Y., Minami, Y., & Nakamura, M. (2007) *J. Card. Fail.*, 13, 114-119.

遠田 悦子, 寺島 裕也

(東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室)

FRONT, a regulator of monocytes/macrophage chemotaxis
Etsuko Toda and Yuya Terashima (Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)