

# 博士論文

動的な誘引刺激に対する好中球様細胞の  
先導端応答と方向性運動の解析

石田 元彦

## 目次

1. 序論.....	4
1.1. 本研究の目的.....	4
1.2. 本論文の構成.....	4
2. 背景.....	6
2.1. 細胞運動と走化性.....	6
2.1.1. 細胞運動の意義.....	6
2.1.2. 細胞運動と細胞骨格の編成.....	6
2.1.3. 走化性におけるシグナル伝達系.....	7
2.2. 細胞外誘引分子勾配の知覚と走化性運動.....	11
2.2.1. 細胞性粘菌における細胞外誘引分子勾配の検出.....	11
2.2.2. 好中球における細胞外誘引分子勾配の検出.....	14
2.2.3. 誘引分子 cAMP 濃度の時間変化に依存した細胞性粘菌の走化性運動.....	14
2.2.4. 先端端における細胞外誘引分子濃度勾配の知覚.....	16
2.2.5. 大腸菌の走化性.....	16
2.3. 本研究の概要.....	17
3. 材料と方法.....	19
3.1. HL60 細胞の培養と分化.....	19
3.2. 遺伝子組み換え用プラスミドベクターの作製.....	20
3.2.1. タンパク質発現用 pEBM Multi ベクター.....	20
3.2.2. タンパク質発現用 PiggyBac ベクター.....	21
3.3. HL60 細胞の形質転換.....	25
3.3.1. 電気穿孔法による HL60 細胞へのプラスミドの導入.....	25
3.3.2. pEBMulti ベクターを用いた HL60 細胞の形質転換.....	28
3.3.3. PiggyBac ベクターを用いた HL60 細胞の形質転換.....	28
3.4. 蛍光プローブ.....	29
3.4.1. FRET プローブ.....	29
3.5. 蛍光顕微鏡.....	30
3.6. チャンバー基質の調製と細胞の準備.....	32
3.7. マイクロ流体デバイスを用いた細胞外液性環境の操作.....	33
3.7.1. 空間的に伝搬する誘引分子勾配刺激の形成.....	33

3.7.2.	空間一様な誘引分子刺激 .....	35
3.8.	画像解析 .....	37
3.8.1.	FRET ratio の算出.....	37
3.8.2.	誘引分子濃度の推定と進行波刺激の通過時間の測定 .....	38
3.8.3.	重心移動のトラッキング .....	40
3.8.4.	蛍光画像からの二値化画像の作成.....	40
3.8.5.	細胞境界のトラッキング .....	41
4.	結果：誘引分子の進行波刺激に対する好中球様 HL60 細胞の走化性運動.....	43
4.1.	はじめに .....	43
4.2.	fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動.....	43
4.2.1.	fMLP 進行波刺激に対する重心運動.....	43
4.2.2.	フロント進行波刺激および濃度反転した進行波刺激に対する細胞の走化性運動 動	47
4.3.	Cdc42 阻害での fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動 .....	49
4.4.	ROCK 阻害での fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動.....	53
4.5.	RAC1 阻害での fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動 .....	56
4.6.	PI3K 阻害での fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動.....	58
4.7.	LTB4 進行波刺激に対する好中球様 HL60 細胞の走化性運動 .....	62
4.7.1.	LTB4 進行波刺激に対する重心運動.....	62
4.7.2.	濃度反転した LTB4 進行波刺激に対する細胞の走化性運動動 .....	65
5.	結果：空間的に伝搬する誘引分子 fMLP 勾配刺激に対する HL60 細胞の走化性応答....	67
5.1.	はじめに .....	67
5.2.	時空間的に伝搬する誘引分子勾配に対する PI3K 動態.....	67
5.3.	時空間的に伝搬する誘引分子勾配に対する Cdc42 動態.....	69
5.4.	ROCK 阻害での fMLP 伝搬波に対する先導端分子 Cdc42 の応答.....	79
6.	結果：空間一様な誘引分子刺激に対する先導端分子の応答.....	84
6.1.	空間一様な fMLP 刺激に対する先導端分子の応答.....	84
6.1.1.	fMLP 濃度依存的な Cdc42 の応答.....	84
6.1.2.	ZCL278 存在下での空間一様な fMLP 刺激に対する Cdc42 の応答 .....	86
6.1.3.	Y27632 存在下での空間一様な fMLP 刺激に対する Cdc42 の応答.....	87
6.2.	空間一様な LTB4 刺激に対する先導端分子の応答.....	88

7.	結果：CDC42 の機能解析.....	92
7.1.	はじめに .....	92
7.2.	光遺伝学を用いたタンパク質膜局在誘導系の構築 .....	93
7.2.1.	488 nm 青色光依存的なタンパク質膜局在の時定数.....	94
7.2.2.	局所的な光刺激による Cdc42-GEF の集積 .....	94
7.2.3.	fMLP 勾配下での局所的な光刺激による Cdc42-GEF の集積 .....	99
7.3.	常活性型(GTPASE DEFECTIVE)CDC42、優勢阻害型(NUCLEOTIDE-FREE)CDC42 の細胞内分布 102	
7.3.1.	ランダム運動する好中球様 HL60 細胞の場合 .....	102
7.3.2.	熱処理した好中球様 HL60 細胞の場合.....	103
7.3.3.	LatA 処理された好中球様 HL60 細胞の場合 .....	105
8.	まとめと議論.....	107
8.1.	fMLP 進行波刺激に対する走化性.....	107
8.2.	fMLP 進行波刺激に対する走化性（阻害剤実験） .....	108
8.2.1.	ZCL278 による Cdc42 阻害の影響 .....	108
8.2.2.	Y-27632 による ROCK 阻害の影響.....	109
8.2.3.	NSC23766 による Rac1 阻害の影響 .....	112
8.2.4.	LY294002 による PI3K 阻害の影響 .....	112
8.3.	LTB4 進行波刺激に対する走化性 .....	114
8.4.	誘引分子の空間一様刺激に対する CDC42 応答.....	114
8.5.	光遺伝学を用いた CDC42-GEF の集積実験 .....	120
8.6.	CDC42 の活性状態に依存した細胞内分布.....	121
8.7.	まとめ.....	123
	引用文献 .....	129

## 1. 序論

### 1.1. 本研究の目的

真核細胞の走化性では、細胞外誘引分子によって、細胞内でシグナル伝達分子と細胞骨格タンパク質の非対称な空間分布、つまり、細胞の前（先導端と呼ぶ）と後ろがいかに形成されるかが問題となる。これまで、好中球と細胞性粘菌(以下、粘菌と略記)では、細胞両端での誘引物質濃度の差に基づいて先導端が形成されることが明らかにされてきた[Parent et al, 1998; Servant et al., 2000; Janetopoulos et al., 2004; Wang et al. 2014]。一方で、生体内の炎症反応において好中球の浸潤、炎症部位への集合運動は誘引物質濃度の空間勾配だけでなく、時間的な変動を伴って制御されていることが報告されている[Afonso et al., 2012; Lammerman et al., 2013]。また、粘菌の集合過程では誘引物質 cAMP のらせん状の進行波にむかって細胞が一方向的に運動して集合することが知られており、動的な場での走化性運動の理解は重要である。粘菌に関して近年、空間勾配場であっても濃度が時間的に減少する場では先導端形成が起こらず、その結果、誘引物質 cAMP のらせん状の進行波に向かって一方向的に運動し集合することが実験と先導端形成の数理モデルから明らかにされた[Nakajima et al., 2014]。好中球に関しては、誘引物質濃度が空間一様に増加するフェーズで細胞の運動速度が上昇し、濃度減少するフェーズで運動速度が低下することが報告されている[Geiger et al., 2003]。しかし、誘引物質濃度勾配が与えられ、かつ、その濃度が時間的に増減する場合に好中球がいかなる走化性運動を示すかは非自明で、未解決の問題である。本研究では、時間変動する誘引物質濃度勾配における好中球の走化性運動を調べ、誘引物質の空間勾配だけでなく、濃度の時間変化が細胞の極性形成および走化性にいかに影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

### 1.2. 本論文の構成

第2章では細胞運動と速く這い回る細胞である細胞性粘菌や好中球の走化性に関して述べる。第3章では本研究で用いた材料と方法に関して述べる。第4章では変動を伴う誘引分子濃度勾配における好中球様 HL60 細胞の走化性運動の測定結果を示し、細胞の走化性運動が誘引分子濃度変動に依存すると期待されることを述べる。第5章では変動を伴う誘引分子濃度勾配における走化性応答の測定結果を示し、先導端分子の活性動態と細胞移動との対応に関して述べる。第6章では誘引分子濃度の増減に対する先導端分子の活性化応答を測定した結果を示し、その応答の特徴を述べる。第7章では先導端分子活性と膜伸長の関係に関して述べる。第8章で、これまでの結果に対して考察を行い、まとめとする。



## 2. 背景

### 2.1. 細胞運動と走化性

#### 2.1.1. 細胞運動の意義

細胞運動は自然界や生体内で広く見られる現象である。土壌に存在する細胞性粘菌の場合には餌（菌類）の捕食や、栄養環境が悪くなり細胞が集合し胞子を形成する過程において細胞運動は重要であり、その異常は個体や種の生存・存続に関わる。また、生体内では、白血球やマクロファージは炎症部位に集合し、外部から侵入した異物や細菌に向かって遊走し貪食することで生体防御の役割を果たす[Zigmond et al., 1974, 1977, 1981; Lämmermann, 2016]。リンパ球は組織内を遊走し[Harris et al., 2012]抗原提示細胞との間での抗原抗体反応を経て成熟する。皮膚の上皮細胞は傷口（細胞同士の非接触領域）ができたことを検知して移動する性質を持ち、ここで見られる細胞運動は傷口を修復するという重要な役割を果たす[Farooqui et al., 2005]。また、発生過程においては間葉系細胞が集団で移動する[Donà et al., 2013]ことによって組織の複雑な形態形成が実現されることが報告されている。以上のように細胞運動は単細胞・多細胞レベルで重要な機能を果たしている。

#### 2.1.2. 細胞運動と細胞骨格の編成

運動する細胞には、細胞性粘菌や好中球、魚の間充織細胞であるケラトサイトなど 10  $\mu\text{m}/\text{min}$  程度と速く運動する細胞から、それより少し遅いマクロファージやリンパ球、さらに遅く 10  $\mu\text{m}/\text{hour}$  程度で運動する上皮細胞や線維芽細胞などがある。以下では、細胞性粘菌や好中球などの速い細胞運動に着目する。細胞運動は細胞の進行方向（前方または先端と呼ぶ）における細胞膜の伸長と、進行方向とは反対の後方において細胞膜が収縮し、細胞質が前方に押し出されることが運動することによって実現する[Ridley et al., 2003; Tsai et al., 2019] (図 2-1)。細胞骨格の動態に着目すると、前方での細胞膜の伸長は細胞と基質の間に形成された接着斑を足場として、網目状または直線状にアクチン重合が起こり、膜が押し出されることによって実現される[Li & Gundersen, 2008]。一方、細胞の後端では直鎖状のアクチン繊維と複合体を形成するミオシン（アクトミオシン）が ATP の加水分解に伴って収縮力を発揮することにより、膜の収縮とそれに引き続く前方への細胞質の押し出しが生じる。

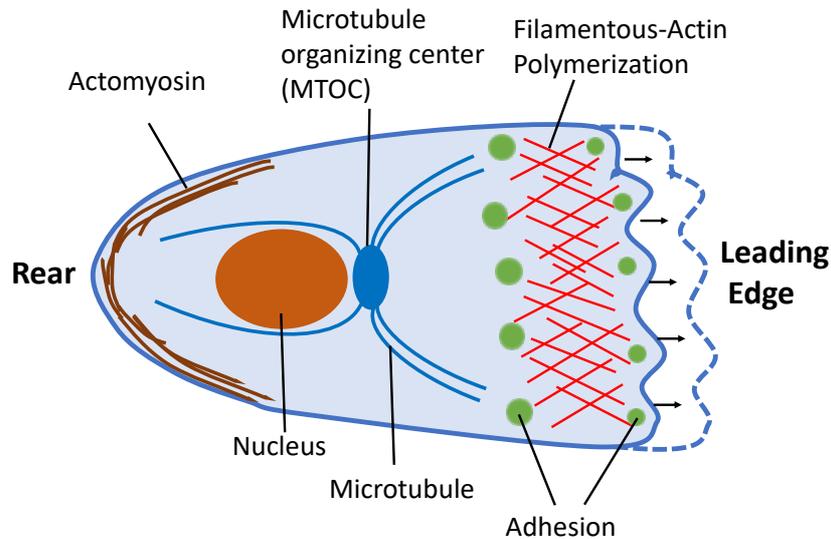


図 2-1 細胞運動の模式図。細胞の前方では接着斑と網目状のアクチン線維が形成されることで細胞膜が押し出される。細胞の後方では細胞膜に結合したアクチンと複合体を形成したミオシンの収縮力により膜の収縮が起こり、細胞質が前方に向かって押し出される (Ridely et al., 2003 をもとに作図)。

### 2.1.3. 走化性におけるシグナル伝達系

好中球は白血球の一種であり、外来の異物や細菌を貪食することで感染防御の役割を果たす。そして好中球は外部から侵入した細菌、免疫細胞および間質細胞から産生・分泌される液性因子の濃度の違いに基づいて方向性をもった運動をする性質を持つ。このような化学分子によって細胞運動が誘起される性質を走化性という。濃度が高い方向に細胞運動を誘導する化学分子を誘因物質、濃度が低い方向に細胞運動を誘導する化学物質を忌避物質と呼ぶ。本研究では誘引分子刺激に対する好中球の走化性を対象とする。細胞外に存在する誘因物質は細胞膜表面に分布している受容体、多くの場合、G タンパク質共役受容体 (G protein coupled receptor; GPCR) によって受容される。GPCR は細胞膜を 7 回貫通するタンパク質であり、誘引分子との相互作用がない場合は、3 量体 G タンパク質  $G\alpha$ 、 $G\beta\gamma$  と複合体を形成している。誘引分子が受容体に結合すると  $G\alpha$  が不活性型であるグアノシン 2 リン酸 (Guanosine diphosphate; GDP) 結合型から、活性型であるグアノシン 3 リン酸 (Guanosine triphosphate; GTP) 結合型となり、 $G\alpha$  および  $G\beta\gamma$  が GPCR から解離し、下流のシグナル分子が活性化される。好中球における代表的な走化性誘引分子として、細菌やネクロシスを起こした細胞から分泌されるフォルミルペプチド (fMLP など)、補体

の C5a、好中球が分泌する脂質代謝物であるロイコトリエン B4 (LTB4)、間質細胞から分泌される SDF1(Stromal cell derived factor)を挙げることができる。これら誘引分子に特異性をもった受容体はいずれも GPCR であることが明らかにされている [Boulay et al., 1990; Gerard et al., 1991; Yokomizo et al., 1997; Feng et al., 1996]。

### 先導端形成のシグナル伝達系

ここでは、先導端におけるアクチン重合制御のシグナル伝達の概要を述べる。好中球の走化性において、先導端形成を制御する主要な分子として、フォスファチジルイノシトール 3 リン酸を生成する phosphoinositide 3 kinase(PI3K)や低分子量 G タンパク質である Ras GTPase、Rho GTPase が詳しく研究されており、これまでの知見を整理する。なお、走化性運動する細胞の前端に局在を示し、膜伸長と関連する分子を先導端分子と呼び、運動する細胞が形成する一時的な突出を仮足と呼ぶ。

### PI3K

フォスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) はクラス I,II,III に分類され、このうちクラス I がフォスファチジルイノシトール(4,5)-2 リン酸を基質としてフォスファチジルイノシトール(3,4,5)-3 リン酸 (PIP3) を生成する酵素である。PI3K クラス I は酵素サブユニットの違いで  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  および  $\delta$  があり、PI3K  $\beta$  および  $\gamma$  は GPCR 下流の  $G\beta\gamma$  によって活性化される [Vanhaesebroeck et al., 2010]。PI3K によって生成される PIP3 はエフェクタータンパク質の PH (Pleckstrin-homology) ドメインと結合することによって、シグナル伝達に寄与する。それぞれのタンパク質の PH ドメインはそれぞれ結合する脂質への特異性を持つ。PIP3 は Rac-GEF である P-REX (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger) の PH ドメインの結合サイトとして働き、細胞膜上で Rac を活性化し先導端形成に寄与すると考えられている [Welch et al., 2002]。G  $\alpha_i$  を阻害する百日咳毒素によって fMLP 依存的な Akt-PH の膜局在が阻害されることから、PI3K の活性化が  $G_i$  依存であると示された。また Rho GTPase の阻害剤である *C.difficile* toxin の添加によって fMLP 依存的な Akt-PH の膜上への局在が阻害されることから、PI3K の活性化には Rho GTPase が必要であることが示された [Servant et al., 2000]。ラトランキュリンによるアクチン脱重合、ジャスプラキノリドによるアクチン安定化によって、Akt-PH の先導端への局在が低下することが観察されており、先導端への PIP3 の局在には F-アクチン動態からのフィードバックがあると考えられている [Wang et al., 2002]。PI3K  $\gamma$  ノックアウトによって誘引分子 (fMLP, C5a) 依存的な PIP3 の産生がほぼ完全に阻害されることが報告されている。同ノックアウトマウスの初代好中球では fMLP に対する走化性が阻害されるが、完全には阻

害されないことが報告されている [Sasaki et al., 2000; Hannigan et al., 2002]。まとめると、膜上の PIP3 はそれと特異的な PH ドメインを持つ Rac-GEF を膜近傍にリクルートし、アクチン重合を促進し、その結果膜が伸長する。また PIP3 の局在はアクチン重合により促進されている。PI3K は走化性運動には必ずしも必要ではないが、高い走化性効率の実現に寄与していると考えられている

## Ras

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* では、低分子量 GTPase Ras が 3 量体 G タンパク質の下流、PI3K の上流に位置し、先端端で局所的に活性化された状態の Ras-GTP をとる。また、誘引分子 cAMP 一様刺激に対して適応的な応答を示すことが報告されている [Sasaki et al., 2007; Takeda et al., 2012]。好中球では、誘引分子 fMLP 刺激に対して適応応答を示すこと、先端端から 5  $\mu\text{m}$  後方で活性が最大となることが報告されている [Yang et al., 2015]。

## Rac1/2

低分子量 GTPase Rac は WAVE2(Wiskott-Aldrich syndrome protein family member)複合体を活性化し、Arp2/3(Actin-related protein)を介して網目状のアクチン線維の形成を促進する [Takenawa et al., 2007; Weiner et al., 2006]。また Formin を活性化し、直状のアクチン線維形成を促進する [Kuhn et al., 2014]。Rac1 は細胞種によらず発現が見られるが、Rac2 は好中球やリンパ球など血球系細胞に特異的に発現するタンパク質である [Sasaki & Firtel, 2006]。ノックアウトマウスの初代好中球を用いた走化性実験から、Rac1 は走化性における方向決定に寄与し、Rac2 は細胞の運動性に寄与することが報告されている [Sun et al., 2004; Sun et al., 2007]。常活性型 Rac の過剰発現株では Akt-PH が恒常的に膜局在する一方、常活性型の Cdc42 過剰発現株では Akt-PH の膜局在が生じないことから、Rac が膜上での PIP3 の産生を促進すると主張されている [Srinivasan et al., 2003]。PIP3 依存的な Rac-GEF として P-Rex1 [Welch et al., 2002]、Vav [Han et al., 1998; Aoki et al., 2005] および SWAP-70 [Shinohara et al., 2002] が報告されており、これらが Rac-PIP3 のフィードバックループを形成していると考えられている。光遺伝学的手法を用いて、PI3K  $\alpha, \beta$  および  $\delta$  と結合する p85 iSH ドメイン [Vanhaesebroeck et al., 2010] を膜上に移行させることによって、膜上での PIP3 生成を促進した実験で、膜上の Rac(1/2/3)の活性化が誘導されることが報告されている [Graziano et al., 2017]。ただし、この系における Rac 活性化は誘引分子 fMLP 刺激と比較して 10 分の 1 程度であり、光遺伝学的に誘導した PIP3 量が十分でない可能性や、PIP3 を経ない Rac 活性化の経路がある可能性を残している。また Rac1 の光依存的な局所活性化によってマクロファージ様 raw264.7 細胞の方向性運動および線維芽細胞株 IA32 の

膜伸長を誘導できることが報告されている [O'Neil et al., 2014; Guntas et al., 2015]。

## Cdc42

低分子量 GTPase Cdc42 はアクチンの枝分かれ構造の形成に必須である Arp2/3 を活性化する分子である WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) と結合し、活性化することによって網目状のアクチン線維の形成を促進する [McGavin et al., 2002; Takenawa et al., 2007; Tomasevic et al., 2007; Laylin et al., 2017]。また直状のアクチン線維形成を促進する Formin (mDia2,3) を活性化する [Kuhn et al., 2014]。G $\beta$   $\gamma$ 、PAK1 および PIX $\alpha$  (Rac/Cdc42 GEF) によって Cdc42 が活性化される経路があることが報告されている [Li et al., 2003]。優勢阻害型の Cdc42(T17N) を発現したマクロファージ様 Bac1.2F5 細胞では、その運動性は低下しないものの、CSF1 勾配における方向性運動が低下するため、Cdc42 は走化性の方向検出に寄与すると考えられている [Allen et al., 1998]。Cdc42-GTP と結合するがエフェクター分子と結合しない WASP  $\Delta$  C (WASP の C 末欠損変異) あるいは優勢阻害型の Cdc42(T17N) を過剰発現した好中球様 HL60 細胞では、ガラスニードル先端から形成される誘引分子勾配に対して走化性を示さない [Srinivasan, 2003]。野生型が単一の先端端を形成することに対して、Cdc42 ノックアウト好中球では fMLP 濃度勾配に対する走化性が低下し、複数の仮足を形成すること、細胞の運動速度は野生型と比較して差は確認されないことが報告されている [Szczur et al., 2009]。Cdc42 は Ras, Rac と比べて膜伸長との運動性が高いこと、Cdc42 活性は伸長先端で最大であることに對し Ras および Rac 活性は伸長先端から細胞後方 5  $\mu$ m の位置で最大となること、活性型 Cdc42 が細胞の後端形成に関わる RhoA を抑制することが報告されている [Yang et al., 2015]。Cdc42 は誘引分子濃度勾配のもとで細胞が高濃度側に仮足伸長することに寄与すると考えられる。

## 後端構造の形成のシグナル伝達系

好中球の後端における収縮力制御および構造について述べる。好中球は誘引分子刺激が明示的に与えられていない場合でもランダム運動を示し、この際細胞の後端にミオシン II 局在 [Tsai et al., 2019] と ERM タンパクの Moesin が局在することが知られている [Niggli & Rossy, 2008; Hind et al., 2016]。細胞後端の Moesin の局在は PIP3 (Akt-PH) 局在と比べて持続時間が長く、Moesin の後端局在と運動方向の持続性に正の相関があることが報告されている [Prentice-Mott et al., 2015]。アクトミオシンの収縮はミオシン軽鎖のリン酸化によって引き起こされ、RhoA によって活性化される ROCK やミオシン軽鎖キナーゼによって、アクトミオシン収縮が促進される [Vicente-Manzanares et al., 2009]。また RhoA は fMLP によって活性化された G $\alpha_{12/13}$  によって活性化されることが報告されている [Xu et al., 2003]。

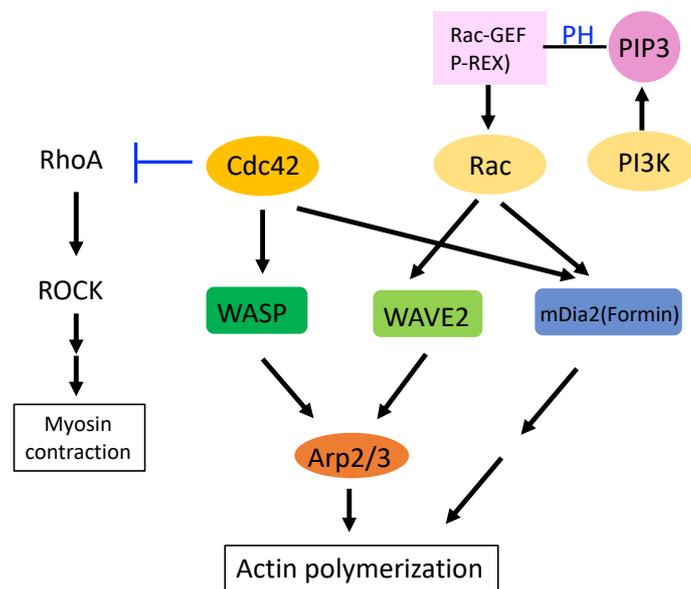


図 2-2 先端端・後端形成に関わる分子のシグナル伝達の概要

## 2.2. 細胞外誘引分子勾配の知覚と走化性運動

### 2.2.1. 細胞性粘菌における細胞外誘引分子勾配の検出

細胞性粘菌をはじめとした這い回る細胞においては、持続的な誘引分子刺激に対して細胞の膜伸長を促進する Ras, PI3K をはじめとする分子が一過的に活性化され、刺激前の活性化状態まで緩和するという応答がよく知られている [Meili et al., 1999; Sasaki et al., 2007; Takeda et al., 2012]。このような応答は適応と呼ばれ、誘引分子が存在する環境の細胞が、シグナル分子応答の活性化の余地を残し、新たな誘引分子刺激に応答できるために重要な機構である。細胞性粘菌を対象として、誘引分子 cAMP 刺激に対する Ras 活性化 (Raf1RBD の膜移行) の適応を測定した実験より、適応にかかる時間が誘引分子濃度に依存しないことが明らかにされた [Takeda et al., 2012]。フィードバック回路 (図 2-3, b) による適応応答では誘引分子の入力が大きくなるに伴い、緩和時間が長くなることが予想されるが、フィードフォワード回路 (図 2-3, a) の場合、適応時間が入力時間に依存しないことから、Ras 活性化の制御様式としてフィードフォワード回路が支持されている [Takeda et al., 2012; Tang et al., 2014]。また、好中球様 HL60 細胞に関して、fMLP に対する PI3K の活性化応答がフィードフォワード回路による動態と一致することが報告されている [Tang et al., 2014]。

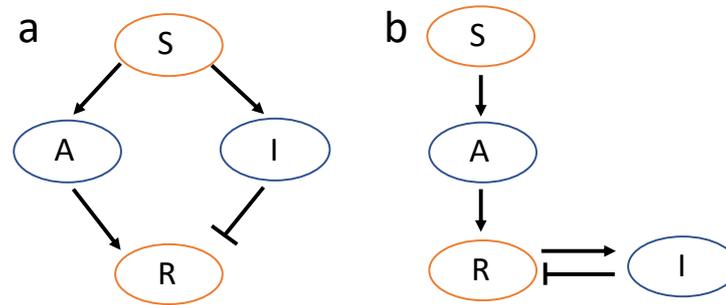


図 2-3 誘引分子刺激 (S) に対する先導端分子(R)の適応応答を示す制御回路。A は R を活性化する因子であり、I は R を抑制する分子である。(a) フィードフォワード型, (b) フィードバック型。(GEF:) (Takeda et al., 2012 を参考にして作図)。

細胞性粘菌が細胞外の誘引分子勾配を検出する仕組みとして、局所活性化大域抑制 (Local Excitation and Global Inhibition; LEGI) と呼ばれる枠組みが考案されている [Parent et al., 1998; Janetopoulos et al., 2004; Devreotes & Horwitz, 2015]。この枠組みは実験的に測定される以下の点を説明することができる。(1)一様な誘引分子刺激に対して、先導端分子の活性化が適応的であること、(2)空間的な誘引分子勾配場において先導端分子が勾配方向に局在することである。LEGI の枠組みにおいては、先導端分子の活性化分子(アクチベータ)と抑制分子 (インヒビター) が存在し、それらは誘引分子によって活性化される(図 2-5)。インヒビターは拡散しやすく濃度が細胞全体で一様となり、アクチベータは拡散しにくく細胞周囲の誘引分子濃度の違いを反映した濃度分布をとると仮定される。一様刺激の場合、アクチベータによる一過的な先導端因子の活性化が起こり<sup>1</sup>、その後インヒビターによる抑制が起こることによって適応的な応答が現れる(図 2-5 左)。定常的な誘引分子勾配のもとでは、細胞全長のうち誘引分子の濃度が高い側でアクチベータがインヒビターを上回り、誘引分子の濃度が低い側ではインヒビターがアクチベータを上回るために高濃度方向に先導端因子の局在が生じる(図 2-4, 図 2-5)。

<sup>1</sup> インヒビターの分解速度がアクチベータの分解速度よりも大きいことを仮定している。

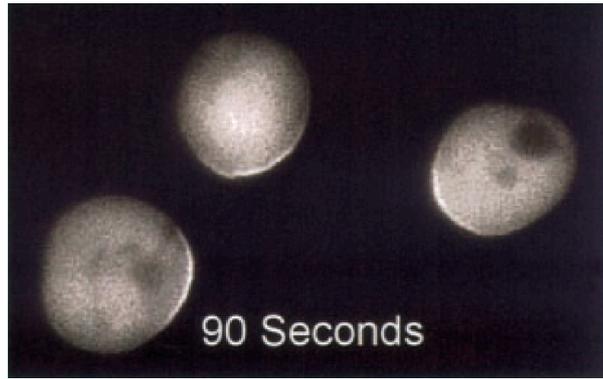


図 2-4 アクチン重合阻害剤であるラトランキュリン存在下での誘引分子 cAMP 高濃度側への細胞性粘菌の先端分子 PIP3(CRAC-PH)の局在。[Parent et al., 1999]より転載。

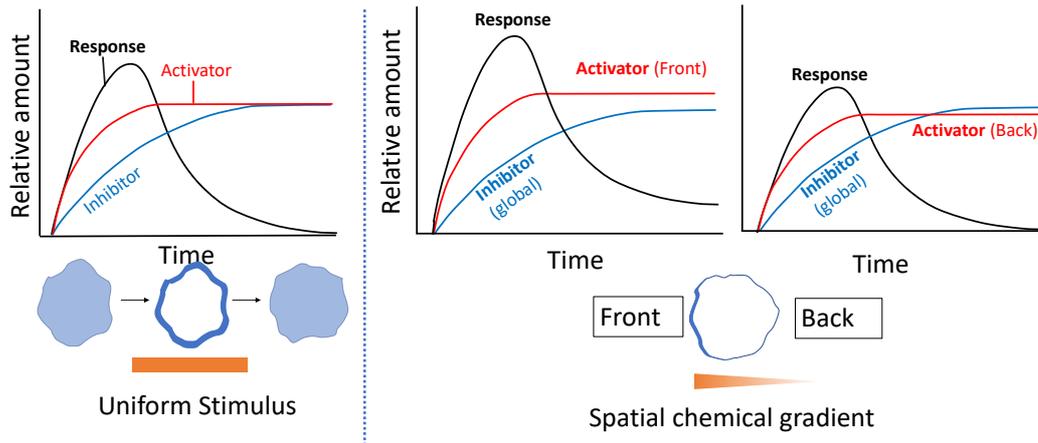


図 2-5 誘引分子刺激に対する一過性応答と誘引分子の空間的な濃度勾配を検出するための機構。局所活性化大域抑制 (Local Excitation and Global Inhibition; LEGI)モデルと呼ばれる。(Devreotes & Horwitz 2015 を参考にして作図)

### 2.2.2. 好中球における細胞外誘引分子勾配の検出

細胞の走化性運動においては細胞の進行方向、つまり細胞の前側（以下では先導端という用語を用いる）を形成することが重要である。PI3K によって産生された PIP3 に特異的に結合する PH ドメインを持つセリンスレオニンキナーゼである Akt が、細胞の先導端に局在するタンパク質であることが示された [Servant et al., 2000] (図 2-6)。さらに、ラトランキュリンによってアクチン重合が阻害された細胞に対して誘引分子 fMLP の勾配刺激を与えた場合においても、fMLP 高濃度側に Akt-PH が局在することが示された。このことから、好中球には細胞前後端での誘引分子の濃度の違いをもとに勾配方向を検出する仕組み、つまり、空間的な濃度勾配を検出する仕組みがあると考えられている。しかし、アクチン重合を阻害した場合に、PIP3 の誘引分子高濃度側への局在はより緩やかな勾配となることが報告されており (図 2-6)、PIP3 の先導端への集積は F アクチンによる正のフィードバック制御を受けていると考えられている [Wang et al., 2002]。

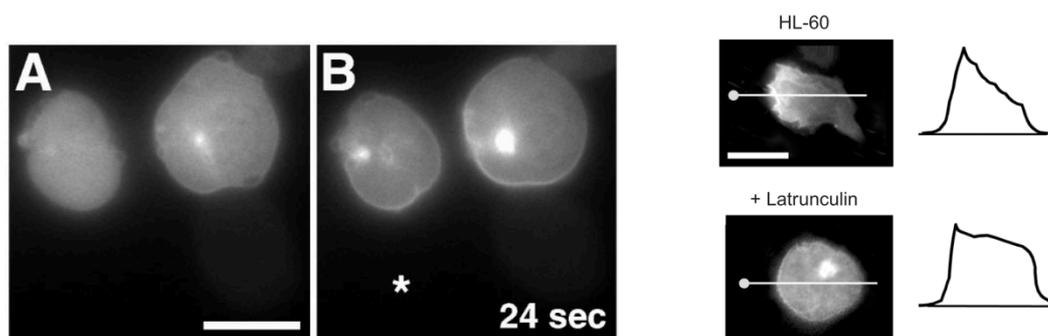


図 2-6 アクチン重合阻害剤であるラトランキュリン存在下での誘引分子 fMLP 高濃度側への先導端分子(Akt-PH)の局在。アスタリスク(\*)は誘引分子が放出されるマイクロピペット先端の位置を表している。左は [Servant et al, 2000]、右は [F. Wang., 2002] より転載。

### 2.2.3. 誘引分子 cAMP 濃度の時間変化に依存した細胞性粘菌の走化性運動

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は栄養環境が悪化すると細胞間で走化性誘引分子である cAMP を分泌・受容し、空間的に伝搬する cAMP の螺旋波を作り出す。細胞性粘菌はこの空間的に伝搬する cAMP 勾配に対して、cAMP 濃度の時間的な増加を伴う場合に cAMP 高濃度側への走化性を示すが、濃度の時間的な減少を伴う場合には cAMP 濃度勾配を無視して移動する。この結果細胞性粘菌は螺旋波の中心に集合し、多細胞体を形成し、最終的に孢子を作ることによって貧栄養環境をしのぐことができる。この、濃度の時間減少を伴う場合に細胞が誘引分子の濃度勾配に沿った方向性運動をしない性質が 1 細胞の先導端分子の

活性化制御に着目することで理解できることが示された[Nakajima et al., 2014]。その機構は以下に示す。1つには先導端分子の活性が LEGI モデルで制御されることを想定し、誘引分子刺激に対する適応後の先導端分子活性が誘引分子濃度の減少に伴いアンダーシュートしない状況として、モデルのインヒビターの反応が0次の酵素反応(抑制反応が基質である先導端分子の量に依らない反応)であると想定することである。この場合、濃度の時間増加に対しては先導端分子の正の応答が現れるのに対して、濃度の時間減少に対しては僅かな負の応答しか現れないことが帰結する。実験的にも、先導端分子の応答は誘引分子の濃度増加を伴う場合には高濃度側への局在が見られることに対し、濃度の時間減少を伴う場合には先導端分子の局在が現れないことが観察されている。そして、上記の先導端分子応答は誘引分子の濃度の時間変化率に依存して変化することが、細胞外の誘引分子勾配を制御した実験によって示された (図 2-7)。

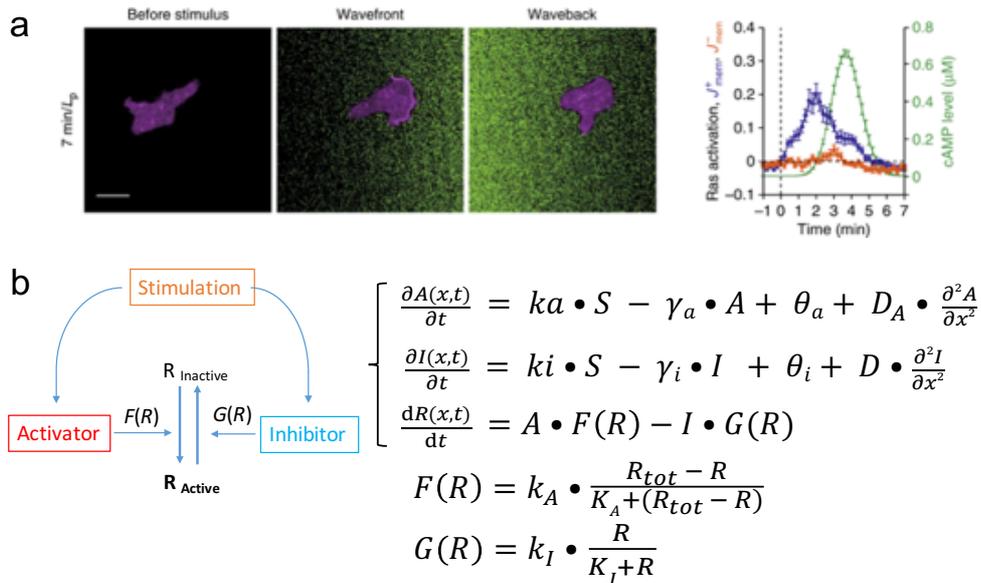


図 2-7 LEGI モデルを基として、濃度の時間変化に依存した誘引分子勾配下での細胞性粘菌の走化性応答の非対称性を説明するモデル (Nakajima et al., 2014 から引用、参考にして作成)。

#### 2.2.4. 先端端における細胞外誘引分子濃度勾配の知覚

細胞性粘菌や好中球は細胞外誘引分子が明示的に与えられていない場合でも、形状変化と重心運動を示す。この振る舞いは、アクチン重合を制御する Rac、Cdc42、PIP3 やミオシン II などの細胞内タンパク質が自発的に非等方的に配置されることに依存すると考えられる [Arai et al, 2010; Taniguchi et al., 2013; Yang et al., 2015; Miao et al., 2017,2019; Tsai et al., 2019]。細胞性粘菌について、緩やかな誘引分子濃度勾配のもとでは新規仮足形成の方向は誘引分子濃度勾配に偏重されず、誘引分子高濃度側に伸長する仮足が最も持続することによって、細胞が高濃度側に運動することを報告されている [Andrew & Insall, 2007]。これは細胞全長にわたる誘引分子の濃度差を細胞内のシグナル伝達によって増幅し、誘引分子濃度の空間的な差異を読み取るという考え方ではなく、膜伸長前後での局所的な濃度変化に基づいて膜伸長の継続あるいは退縮かが判定されるという考え方である。また、細胞内での先端端分子活性あるいは繊維状アクチン構造が局在する領域が生じ、その領域における膜伸長と誘引分子に対する感度が高いことが、誘引刺激に対する走化性と拮抗あるいは協調することが知られている [Zigmond et al., 1981; Arriemerlou & Meyer 2005; Wang et al., 2014; Yang et al.,2015]。

#### 2.2.5. 大腸菌の走化性

大腸菌の場合、大腸菌の移動(遊泳)により、誘引分子濃度の増加を検出した場合は推進力を発揮する方向に鞭毛モーターの回転を継続し、一方誘引分子濃度の増加を検出した場合は鞭毛モーターを逆回転させることによって遊泳を停止する。つまり、大腸菌は誘引分子濃度の時間変化に基づいてランダム運動の方向を偏重させることによって、誘引分子濃度の高い方向に運動する。大腸菌は全長が真核細胞の十分の1程度の1-2 $\mu\text{m}$ と小さく、細胞両端での誘引分子の比較が困難であり、濃度の時間変化検出による走化性が妥当であると考えられている [Berg et al., 1972; Segal et al., 1986; Alon et al., 1999; Sourjik et al., 2012]。

### 2.3. 本研究の概要

これまで述べた内容を整理する。(1)好中球の走化性においては、先導端におけるアクチン重合制御に PI3K, Ras, Rac および Cdc42 などの複数の分子が関与する。(2) 同じく速く這い回る細胞である細胞性粘菌では先導端形成分子の Ras, PI3K が誘引分子刺激に対して適応的な応答を示す。(3)細胞性粘菌の走化性においては細胞全長にわたる誘引分子 cAMP の濃度差に基づいて運動方向を決める仕組みが提案されている。(4)空間的に伝播する cAMP の濃度勾配に対して、粘菌は濃度増加を伴う勾配においてのみ走化性を示し、適応応答に依拠した現象であると考えられている。(5) 好中球においても PI3K, Ras, Rac, Cdc42 が誘引分子 fMLP 刺激に対して適応応答を示すと考えられ、fMLP 濃度勾配のもとでアクチン重合阻害された場合でも細胞内の PI3K 活性の勾配が生じることから、細胞全長にわたる誘引分子の濃度差に基づいた方向決定の仕組みがあることが示唆されている。

細胞性粘菌と好中球（ヒト）は進化的には離れた種であるものの、いずれも G タンパク質共役受容体により誘引分子を受容し、Ras,Rho GTPase または PI3K の活性制御を経て、アクチン重合に駆動された走化性運動を示す。また誘引刺激に対して先導端形成分子である PI3K 動態に類似性が見られることは、細胞性粘菌に限らず、好中球の走化性においても誘引分子の濃度変動に依存した運動が期待される。これまでの好中球の走化性の研究では、走化性応答に関わるシグナル分子やその相互作用について詳しく調べられてきた。一方、動的な誘引分子勾配のもとでの走化性に関しては、フォルミルペプチドの濃度減少に伴って好中球が細胞の前後極性を消失し運動方向を 180 度反転するという報告や[Albrecht & Petty, 1998]、誘引分子濃度が一様に上昇すると運動速度が上昇し、誘引分子濃度が一様に減少すると運動速度が低下することが報告されているが[Geiger et al., 2002]、濃度変動を伴う誘引分子濃度勾配のもとで、好中球が運動方向を決定する仕組みについては詳しく調べられてこなかった。また、濃度変動に対する走化性シグナル分子の応答に着目した研究は少ない。本研究では、時間的に変動する誘引分子勾配場において、好中球が誘引分子の空間差分または濃度の時間変化の影響を受けて運動方向を決める仕組みを探求する。特に各々の先導端分子の役割、誘引分子変動に対する先導端分子の応答に着目し、免疫細胞の走化性に関する基礎的な知見を得ることを目的とした。



### 3. 材料と方法

#### 3.1. HL60 細胞の培養と分化

HL60 細胞は急性全骨髄性白血病患者の前骨髄球細胞の培養細胞株である (Collins et al., 1977, )。ジメチルスルホキシドやレチノイン酸の添加によって好中球様細胞に分化することが知られている。好中球のモデル細胞として走化性が詳しく調べられており、走化性に関わる分子生物学的な知見が多く蓄積されている。本研究で用いた HL60 細胞は RIKEN Bio Resource Center より入手した(RIKEN Cell Bank; RCB #0041)。

#### HL60 細胞の培養

HL60 細胞の培養には体積分率で 10%の非働化した牛胎児血清(Sigma Aldrich 172012, Lot. No. 11D255, または Sigma SF7524, Lot. No. S.BCBV4601)、抗菌・抗生物質(Sigma-Aldrich, A5955)および HEPES を含む Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 培地(WAKO, 189-02145)を用いた (表 3-1)。上記の成長培地を用い 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で細胞を静置培養し、細胞密度は 1.0 x 10<sup>6</sup> cells/mL を超えないように 1-4 日の間隔で継代した。なお、細胞培養に使用する牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) としては、FBS の凍結ストックを 37°Cのウォーターバス中で湯煎にて完全に解凍した後、56°Cで 30 分間保温し、血清中の補体成分の非働化処理を行ったものを用いた。非働化した FBS は 40 mL ずつ分注したのち 30°Cで凍結保存した。

表 3-1 HL60 細胞 成長培地

HL60細胞 成長培地	100 mL
非働化済み FBS	10 mL
100x Antibiotic-Antimicotic Solution(Sigma-Aldrich, A5955)	1 mL
RPMI1640 HEPES含有 (WAKO, 189-02145)	89 mL

#### HL60 細胞の分化誘導

HL60 細胞はジメチルスルホキシドやレチノイン酸の添加により好中球様に分化することが知られている [Collins et al., 1978]。本研究では成長培地にジメチルスルホキシド (Sigma Aldrich #D2650) を 1.3 % (vol / vol)含むように添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で 3-4 日間静置培養した HL60 細胞を実験に用いた。好中球様に分化する PLB-985 細胞の分化誘導後の転写プロファイルは RNAseq で定量した研究では[Rincon et al., 2018]、DMSO による分化誘導後 0,2,4,6 日後の PLB985 細胞の転写プロファイルとヒト初代好中球の転写プロファイルの

Spearman の順位相関係数が、0.75, 0.82, 0.84, 0.84 と増加することが報告されている。順位相関係数という点で、分化誘導 2 日で大きく変化があり、分化誘導 4 日目で頭打ちとなり、分化誘導 4 日目と 6 日目に大きな変化は見られない。個別の mRNA の絶対量には変化がある可能性はある。ヒト初代好中球と比較した時の、DMSO によって分化誘導した HL60 の mRNA の相対量は、FPR1 や LTB4 をはじめとした主要な誘引分子受容体や接着分子、先端端形成に関わる PI3K、Ras/Rho GTPase の GAP および GEF に関して 1/10 から 1 倍の範囲にある [Rincon et al., 2018]。

### 3.2. 遺伝子組み換え用プラスミドベクターの作製

本研究で HL60 細胞の形質転換のために用いたベクターについて以下に記載する。

#### 3.2.1. タンパク質発現用 pEBM Multi ベクター

pEBMMulti ベクター(WAKO, 057-08131)は染色体外環状 DNA として潜伏感染する Epstein-Barr ウイルス(EBV)のゲノム複製機構[Yates et al., 1985]を利用した、タンパク質安定発現株作製のためのプラスミドである [Tanaka et al, 1999; Shibata et al., 2007]。EBV 由来の複製起点となる OriP 配列と EBNA1(EBV Nuclear Antigen 1)遺伝子配列を含んでおり (図 3-1)、宿主細胞内で細胞周期の S 期に 1 度だけ複製され、細胞分裂時に娘細胞に正確に分配されるという性質を持つ。このため、pEBMMulti ベクターは宿主細胞内で長期にわたって保持され、タンパク質安定発現株の作製に利用することができる。以下に作製したプラスミドについて記載する (表 3-2 参照)。なお本研究で用いる制限酵素は全て New England Biolabs 社から購入した。プラスミドのミニプレップには Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (プロメガ, A1460)を用い、マキシプレップには GenElute(TM) HP Plasmid Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich, NA0300)を用いた。構築した全てのプラスミドについて、サブクローニングした塩基配列が正しいことをシーケンス解析により確認した。

#### pEBMNeo Akt-PH-Clover

pcDNA3 Clover(Addgene, 40259)をテンプレートとして PCR 増幅(New England Biolabs, 0530)した Clover を HindIII および BamHI で切断した pcDNA3 Akt-PH-GFP(Addgene #18836)ベクターにライゲーション反応(New England Biolabs, 0202)により結合した (pcDNA3 Akt-PH-Clover)。

続いて、pcDNA3 Akt-PH-Clover をテンプレートとして PCR 増幅した Akt-PH-Clover を XhoI, NotI で切断した pEBMMultiNeo(WAKO, 057-08131)にライゲーション反応により結合した。

#### pEBMNeo Lifeact-mTurquoise2

pLifeact-mTurquoise2(Addgene, 36201)から XhoI および NotI を用いて切り出した Lifeact-mTurquoise2 を NotI および XhoI で切断した pEBMultiNeo(WAKO, 057-08131)にライゲーション反応により結合した。

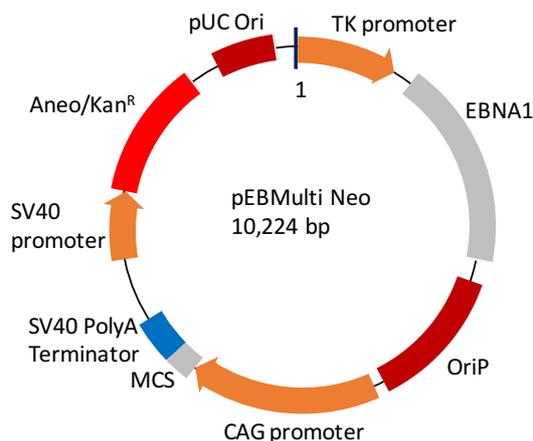


図 3-1 pEBMulti のベクターマップ。EBV 由来の EBNA1 タンパク質と複製起点 OriP を含むため、宿主細胞の細胞周期に合わせて染色体外で複製され、娘細胞に分配される。

### 3.2.2. タンパク質発現用 PiggyBac ベクター

本研究ではタンパク質安定発現株の作製のために、PiggyBac トランスポゾンを用いたプラスミド (PiggyBac ベクターと呼ぶ) を用いた。このベクターは京都大学 松田道行教授、基礎生物学研究所 青木一洋教授のご厚意により供与いただいた。

トランスポゾンとは細胞内のゲノム上の位置を転移できる塩基配列である。ゲノム上のトランスポゾンは両端に特異的な逆向きの反復配列を持っており、その配列が転移酵素 (トランスポザーゼ) によって認識されゲノムが切り出され、異なる DNA 配列中に挿入される。PiggyBac トランスポゾン [Yusa et al., 2009] はガに由来するトランスポゾンであり、トランスポザーゼによって切り出された塩基配列はゲノム上のランダムな TTAA 配列に挿入される (図 3-2)。トランスポゾンによってはゲノム上への挿入過程によって挿入箇所の塩基配列の変化を伴うが、PiggyBac トランスポゾンの場合は挿入箇所の塩基配列の変化が起こらないことが知られている。以下に作製したプラスミドについて記載する (表 3-2 参照)。

#### pPBbsr<sup>MCS</sup>

pPBbsrRaichu Cdc42 をテンプレートとして PCR 増幅した IRES (internal ribosome entry site) DNA 断片を EcoRI および BglII で切断した pPBbsrRaichu Cdc42 ベクターに T4DNA ligase(NEB0202 を用いて)ライゲーション反応により結合した。続いて、105°Cに保温したヒートブロックで 10 分間加熱し、アニーリングしたオリゴ DNA (5'-TACGAATTC AAGGGGTACCGGGCCCCTCGAGGGGGTTCGACGGGGGGGGATCCTCAGCGGCC GCTAGGTAGGTAGGAATTCGGA -3' および 5' - TCCGAATTCCTACCTA CCTAGCGGCCGCTGAGGATCCCCCCCCGTCGACCCCCTCGAGGGGCCCGGTAC CCCTTGAATTCGTA-3') を EcoRI を用いて、ライゲーション反応により上述のベクターに結合した。オリゴ DNA はマルチクローニングサイトとして KpnI, Sall, XhoI, BamHI, NotI を含む。

#### pPBbsr YPET および pPBbsr mTurquoiseGL

pPBbsrRaichu Cdc42 をテンプレートとして PCR 増幅した YPET または mTurquoiseGL を KpnI および XhoI を用いて pPBbsr<sup>MCS</sup> にライゲーション反応により結合した。

#### pPBbsr hITSN-tgRFPt-SSPB(WT)

pLL7.0: hITSN1(1159-1509)-tgRFPt-SSPB WT (Addgene#60419)より KpnI および NotI を用いて切り出した hITSN-tgRFPt-SSPB(WT)を pPBbsr<sup>MCS</sup> にライゲーション反応により結合した。

#### pPBbsr mVenusiLID

pLL7.0: Venus-iLID-CAAX (from KRas4B) (Addgene#60419) をテンプレートとして PCR 増幅した Venus-iLID-CaaX を BamHI および NotI を用いて pPBbsr<sup>MCS</sup> にライゲーション反応により結合した。

#### pPBbsr Clover-Cdc42(Q61L)および pPBbsr mRuby2-Cdc42(T17N)

HL60 細胞から RNA を抽出し(プロメガ, AS1270)、逆転写酵素(Invitrogen, 18080051)を用い cDNA を合成した。cDNA をテンプレートとして Cdc42 を PCR によって増幅し、pCR blunt II TOPO(Invitrogen,450245)を用いてクローニングしたのち、PCR により Cdc42 に T17N または Q61L 変異を導入した。

pcDNA3mRuby2(Addgene,40260) をテンプレートとして PCR 増幅した mRuby2 を BamHI を用いて pPBbsr<sup>MCS</sup> にライゲーション反応により結合した (pPBbsr mRuby2)。続いて Cdc42(T17N)を NotI を用いて pPBbsr mRuby2 にライゲーション反応により結合した。

pcDNA3 Clover(Addgene,40259) をテンプレートとして PCR 増幅した Clover を XhoI および NotI を用いて pPBbsr<sup>MCS</sup> にライゲーション反応により結合した (pPBbsr Clover)。

続いて Cdc42( Q61L)を NotI を用いて pPBbsr Clover にライゲーション反応により結合した。

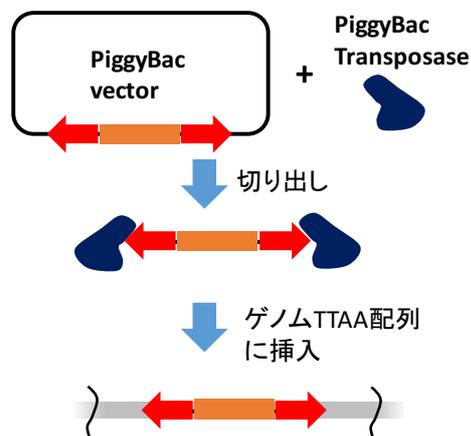


図 3-2 PiggyBac トランスポゾンを用いたゲノムへの遺伝子導入の概要

表 3-2 作製したプラスミドのリスト

プラスミド名称	ベクターバックボーン	インサート DNA
pEBMultiNeo Akt-PH-Clover	pEBMulti Neo	Akt-PH-Clover (pcDNA3 Akt-PH-Clover)
pEBMultiNeo Lifeact-mTurquoise2	pEBMulti Neo	Lifeact-mTurquoise2 (pLifeAct mTurquoise2, Addgene #36201)
pPBbsr	pPBbsr RaichuCdc42	TACGAATTCAAGGGGTACCGGGCCCTCGAGGGGG TCGACGGGGGGGATCCTCAGCGCCGCTAGGTAG GTAGGAATTCGGA (合成オリゴDNA)
pPBbsr YPET	pPBbsr(MCS)	YPET(pPBbsr RaichuCdc42)
pPBbsr mTurquoiseGL	pPBbsr(MCS)	mTurquoiseGL(pPBbsr RaichuCdc42)
pPBbsr mVenus-iLID	pPBbsr(MCS)	Venus-iLID-CAAX (KRas4B) (Addgene60411)
pPBbsr hITSN-tgRFpt-SSPB(WT)	pPBbsr(MCS)	hITSN-tgRFpt-SSPB(WT), (Addgene#60419)
pPBbsr Clover-Cdc42(Q61L)	pPBbsr(MCS)	Clover(Addgene40259)およびCdc42(Q61L)
pPBbsr mRuby2-Cdc42(T17N)	pPBbsr(MCS)	mRuby2(Addgene 40260)およびCdc42(T17N)



### 3.3. HL60 細胞の形質転換

#### 3.3.1. 電気穿孔法による HL60 細胞へのプラスミドの導入

HL60 細胞へのプラスミドの導入は電気穿孔法により以下の手順で行った

<手順>

1. 対数増殖期の細胞（細胞密度  $5-8 \times 10^5$  cells/mL）を遠心（室温、117 rpm、3分、以下本節中ではこの条件と同じ）により回収し、上清をできる限り除いた。5 mL の Opti-MEM (Invitrogen, #31985070) に懸濁後、遠心し上清をできる限り除いた。この操作を 2 回行った。この操作は細胞懸濁液中の血清成分を除くことを目的とする。
2. 細胞密度が  $5-10 \times 10^6$  cells/mL となるように細胞を Opti-MEM に懸濁した。
3. プラスミド DNA を細胞懸濁液と混合し（DNA の混合量は個別に記載）、2 mm 間隙電極キュベット (BioRad #165-2086 または NEPAGENE, #EC-002S<sup>2</sup>) に 100-110  $\mu$ L 分注した。この時、気泡の混入により電極間の電気抵抗が大きくなるように注意する。
4. Super Electroporator NEPA21 (NEPAGENE) を用いて電気穿孔を行った。代表的な電圧条件を表 3-4 に記載する。キュベット間隙の電気抵抗は 0.035-0.040 k $\Omega$  となるようにした。（Poring pulse は短時間高電圧の矩形波であり、細胞膜に孔をあけプラスミドを導入することを目的としている。Transfer pulse は長時間・定電圧の矩形波であり、発生する電場により DNA サンプルを移動させ細胞内への取り込みを促進することを目的としている。）
5. 電気穿孔後、あらかじめ 37°C 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で平衡化させておいた培養培地（20 % FBS および A.A. を含む RPMI 培地）中に懸濁し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養する。この時、細胞が電気穿孔による損傷を受けていることを踏まえて穏やかにピペッティングを行うように注意する。

表 3-3 に示すように電気穿孔のパラメータは 12 個あるが、これらのうち Poring pulse の電圧とパルス幅について HL60 細胞へのプラスミド導入の条件検討を行った。GFP 発現用 pCMVS-EGFP 10  $\mu$ g と  $1 \times 10^7$  cells/mL の細胞懸濁液を混合し、表 3-3 に示す条件で電気穿孔を行ったのち、20 % FBS および A.A. を含む RPMI 培地に懸濁し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 雰囲気

---

<sup>2</sup> NEPAGENE キュベットはステンレス電極、BioRad キュベットはアルミ電極である。2mm 間隙電極キュベットに 100  $\mu$ L の細胞懸濁液を入れた場合、NEPAGENE キュベットの抵抗値が BioRad キュベットの抵抗値 (0.036-0.038 k $\Omega$ ) よりも若干大きい抵抗値自体は NEPAGENE プロトコルの許容範囲内 (0.03-0.05 k $\Omega$ ) である。

下でインキュベートした。形質転換した翌日にセルソーター（ソニー, SH800）を用いて、各条件について単一細胞の蛍光強度を 5000 個の細胞に対して測定した。表 3-3 中の「poring pulse エネルギー」は印加電圧と電流測定値から算出された電力量である。表 3-3 中の「発現率」は計測した細胞のうち、蛍光輝度値が 5000 以上の細胞の割合である。なお閾値は電気穿孔を行わない対象細胞の平均蛍光輝度値の 100 倍超である 5000 とした。表 3-3 中の「GFP 蛍光 最大値」は測定された最大の蛍光輝度値を示し、「GFP 蛍光 平均値」は閾値 5000 を超えた細胞集団における蛍光輝度値の平均値である。Poring pulse のエネルギーが大きいほど、GFP 蛍光強度の平均値と発現率が高くなる傾向が見られた。条件 4-6,9-12 の細胞を蛍光顕微鏡観察を行い、GFP 蛍光を発する細胞の生死を確認した。条件 4, 9 では蛍光顕微鏡観察に十分な蛍光強度をもつ生細胞が見られたが、条件 5,6,11,12 の条件では GFP 蛍光強度は高いものの多くは死滅しており、生細胞が少なかった。本研究では主に 4 の条件（表 3-4）で形質転換を行うことにした。他の細胞種を扱う場合は Poring pulse のエネルギーを変化させて、上限の導入効率を初めて達成できる条件の近くで、さらに詳細に条件検討するのが良い。

表 3-3 電気穿孔法の条件検討

Poring Pulse (Pp)					
電圧	パルス幅	パルス間隔	回数	減衰率	極性
個別に記載	個別に記載	50	2	10	+

Transfer Pulse (Tp)					
電圧 (V)	パルス幅 (ms)	パルス間隔 (ms)	回数	減衰率 (%)	極性
20	50	50	5	40	+/-

条件	Poring Pulse (Pp)			GFP蛍光強度		
	電圧 (V)	パルス幅 (ms)	エネルギー (測定値, J)	平均	最大値	発現率
1	電気穿孔なし			47	7147	0
2	125	2.5	1.91	15426	77632	0.5
3	125	5	3.66	28707	325423	2.6
4	150	5	5.67	32014	382990	10.9
5	175	5	7.75	65389	563331	37.8
6	200	5	10.5	75002	1371719	36.0
7	275	0.5	1.9	13570	98883	1.6
8	275	0.7	2.78	15990	115391	6.1
9	275	1	3.88	23618	282406	12.6
10	275	1.2	4.78	28445	313808	15.9
11	275	1.5	5.73	42275	335745	29.8
12	275	2	7.52	51660	625149	25.1

表 3-4 HL60 の電気穿孔法の条件 (エレクトロポレータ NEPA21)

Poring Pulse (Pp)					
電圧 (V)	パルス幅 (ms)	パルス間隔 (ms)	回数	減衰率 (%)	極性
150	5	50	2	10	+

Transfer Pulse (Tp)					
電圧 (V)	パルス幅 (ms)	パルス間隔 (ms)	回数	減衰率 (%)	極性
20	50	50	5	40	+/-

### 3.3.2. pEBMulti ベクターを用いた HL60 細胞の形質転換

pEBMulti ベクターを用いて形質転換を行う場合は、10  $\mu\text{g}$  の pEBMulti ベクターを  $1 \times 10^7$  cells / mL の細胞懸濁液 100  $\mu\text{L}$  と混合したのち、2 mm 間隙電極キュベットを用いて、電気穿孔を行った。電気穿孔後、細胞を 37°C の 20 % FBS, 50% 調整培地を含む RPMI 培地に懸濁した。電気穿孔の 2 日後から G418(Invitrogen, 11811023)を終濃度が 1 mg/mL となるように添加し薬剤選抜を開始した。薬剤選抜の間、4-7 日に一度培地を交換した。形質転換された細胞が  $1 \times 10^6$  cells 程度得られるまでに要する時間は多くの場合 3-4 週間であった。

### 3.3.3. PiggyBac ベクターを用いた HL60 細胞の形質転換

PiggyBac ベクターを用いて形質転換を行う場合は、PiggyBac ベクターと細胞内で一過的に PiggyBac トランスポザーゼを発現させるプラスミドベクターである Super PiggyBac Transposase expression vector (System Bioscience #PB210PA-1) (図 2-6)を電気穿孔法によって細胞に導入した。典型的には  $1 \times 10^7$  cells / mL の Opti-MEM に懸濁した細胞懸濁液 100  $\mu\text{L}$  に Piggybac ベクター 2  $\mu\text{g}$  と Super PiggyBac Transposase expression vector 0.2  $\mu\text{g}$  を混合したのち、2 mm 間隙電極キュベットを用いて、電気穿孔を行った。PiggyBac ベクターの量は形質転換の結果に応じて、0.5-4.0  $\mu\text{g}$  の間で適宜調整した。電気穿孔後、細胞を 37°C の 20 % FBS, 50% 調整培地を含む RPMI 培地に懸濁した。電気穿孔の 2 日後から Blasticidin(Invitrogen, R210-01)を終濃度が 5-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加し薬剤選抜を開始した。薬剤選抜の間、4-7 日に一度培地を交換した。形質転換された細胞が  $1 \times 10^6$  cells 程度得られるまでに要する時間は多くの場合 3-4 週間であった。なお複数のタンパク質を発現する細胞を作製する場合は、それぞれのタンパク質発現用の PiggyBac ベクター各 2  $\mu\text{g}$  と Transposase expression vector 0.2  $\mu\text{g}$  を細胞懸濁液と混合して、形質転換を行うことで目的の形質転換体を作製した。

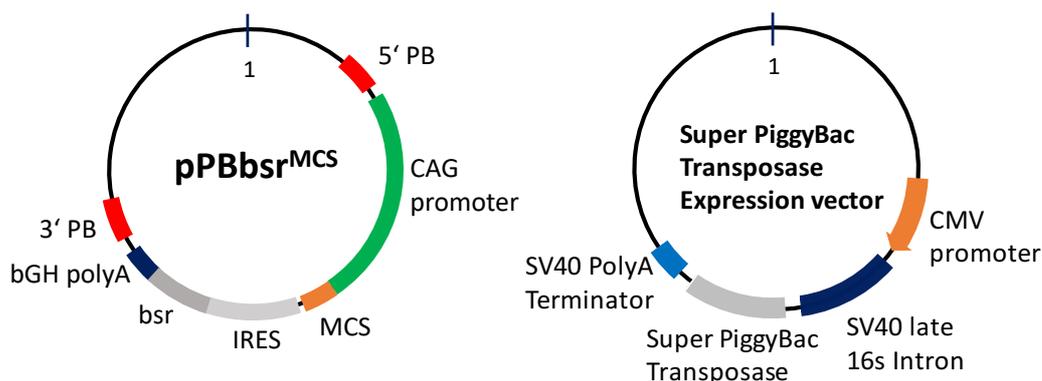


図 3-3 pPBbsr<sup>MCS</sup> (PiggyBac ベクター)およびトランスポザゼ発現ベクターのマップ。

### 3.4. 蛍光プローブ

#### 3.4.1. FRET プローブ

フェルスター共鳴エネルギー移動(Förster Resonance Energy Transfer; FRET)とは、近接した2個の色素分子の間で一方の分子(ドナー)が吸収した励起エネルギーが電磁波の輻射を伴わずに他方の分子(アクセプター)に移行する現象である。アクセプターが蛍光分子である場合には、アクセプターから蛍光が発せられる。2つの蛍光タンパク間での FRET においては両者の距離が 4-6 nm に近接した時に半分の FRET 効率が生じる [Lam et al., 2012]。本研究で用いた Raichu Cdc42 FRET プローブ(図 3-4)は黄色蛍光タンパク質である YPET、PAK1 の CRIB (Cdc42 and Rac Interactive Binding domain) ドメイン(hPAK1 aa 68-150)、アミノ酸リンカー(Ser-Ala-Gly-Gly の繰り返しの 116 アミノ酸)、Cdc42(aa 2-176)、シアン蛍光タンパク質である mTurquoiseGL(CFP)および KRas の C 末 169-188 アミノ酸を連結した融合タンパク質である [Komatsu et al., 2012]。分子内の Cdc42 が活性化されると、そのエフェクター分子の PAKCRIB と結合し、YFP と CFP が物理的に近接することによって蛍光分子間での励起エネルギーの授受が行われ (FRET)、445 nm の励起に対して CFP 蛍光が低下し YFP 蛍光が上昇することにより、融合タンパク質の発する蛍光スペクトルが長波長側に変化する特徴を持つプローブである。

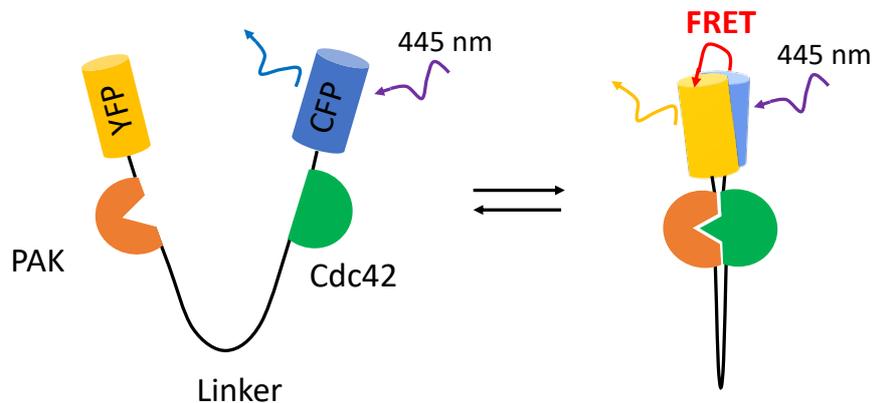


図 3-4 Raichu FRET プローブの構造

不活性型 Cdc42 はエフェクター分子 (PAK) と結合せず、CFP-YFP 間の距離が離れているため CFP から YFP へのエネルギー移動の効率が低い。活性型 Cdc42 はエフェクター分子 (PAK) と結合し、CFP-YFP 間の距離が短くなるため、CFP から YFP へのエネルギー移動 (FRET) の効率が上昇する。(Komatsu et al., 2011 をもとに作図)

### 3.5. 蛍光顕微鏡

倒立型顕微鏡 (IX81 または IX83, Olympus) に共焦点ユニット (CSU-X1 または W1, Yokogawa)、EMCCD カメラ、対物レンズ、電動ステージ、電動シャッター、レーザーが搭載された蛍光顕微鏡を用い、MetaMorph (Molecular Device) を用い蛍光顕微鏡の制御と画像取得をおこなった (表 3-5、表 3-7)。蛍光観察における励起波長、ダイクロイックミラーおよび蛍光フィルターの組み合わせを表 3-6、

表 3-8 に記す。ダイクロイックミラーは励起光を透過させ、それ以外の波長の光を反射する特性を持つ光学素子である。励起光 (レーザー光) を透過し、サンプルからの蛍光を反射することにより、蛍光検出光路と励起光の入射する光路を分けることができる。蛍光フィルターは赤外光から紫外光領域の特定の波長領域の光だけを透過させる特性をもった光学素子である。蛍光フィルターは励起光よりも超波長側にある対象の蛍光分子の蛍光を選択的に透過させるものを選択し、測定対象の蛍光波長とは異なる蛍光や励起光散乱光が検出されることを防ぐために用いる。生細胞観察は主に蛍光顕微鏡 1 で行なったが、局所的な光刺激を行う実験では FRAPPA ユニット (Andor) を搭載した蛍光顕微鏡 2 で行なった。FRAPPA ユニットには入射光をミラーで反射させて顕微鏡に送る光路 (By-Pass モード) と

ガルバノミラー (X,Y 方向の2つ) が設置されて走査型の光照射を行う光路(FRAPPA モード)があり、同じレーザー光源を用いて蛍光観察に加えて、サンプルに対して局所的な光照射を行うことができる。

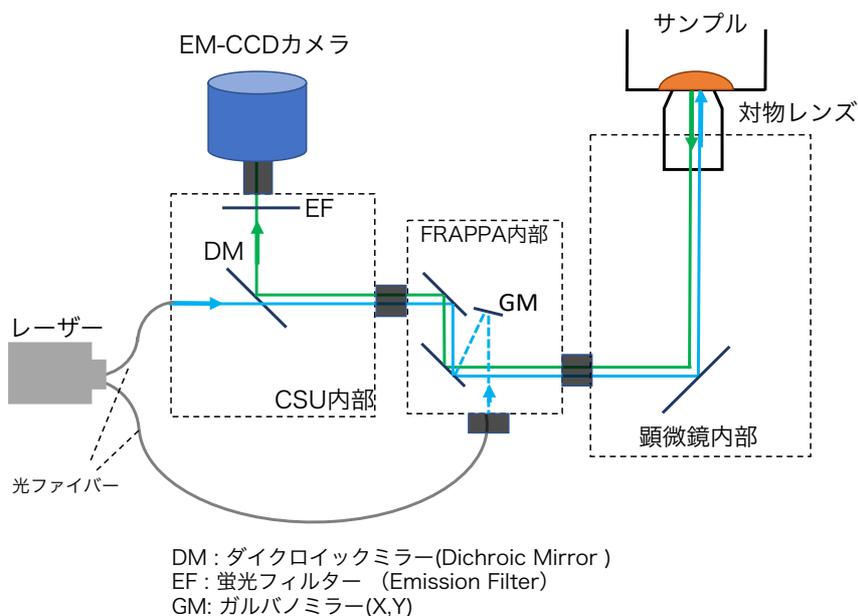


図 3-5 蛍光顕微鏡の模式図

表 3-5 蛍光顕微鏡 1 の構成

装置	詳細
倒立型顕微鏡	IX-81, Olympus
EM-CCDカメラ	Evolve, Photometrics
スピニングディスク型 共焦点ユニット	CSU-X1, Yokogawa
電動ステージ	MD-WELL96100T-META-S, シグマ光機
電動シャッター	MAC5000, Ludl Electronic Products
半導体レーザー (445 nm)	LZ445-PVORSQ-K01 40mW, Vortran laser technology
半導体レーザー (488 nm)	LZ488-PVORSW-K01 50mW, Vortran laser technology
DPSSレーザー (561 nm)	85YCA561nm/25mW, Melles Griot
レーザーコンバイナー	Uniblitz Electronic
対物レンズ	UPlanSApo, 10x, NA 0.40, Olympus UPlanSApo 20x Oil, NA 0.85, Olympus UPlanSApo 60x Oil, NA 1.35, Olympus UApo N, 100x Oil, NA 1.49, Olympus
画像取得・解析ソフトウェア	MetaMorph, Molecular Device

表 3-6 蛍光顕微鏡 1 での蛍光フィルターセット

名称	励起波長	蛍光フィルター	ダイクロイックミラー
赤色蛍光	561 nm	575 nm ロングパス (BA575IF, Olympus)	405nm / 488nm / 561nm透過
緑色蛍光	488 nm	510-550 nm バンドパスフィルター (BA510-550, Olympus)	405nm / 488nm / 561nm透過
黄色蛍光	488 nm	528.5-555.5 nm バンドパスフィルター (FF01-542/27-25, Semrock)	405nm / 488nm / 561nm透過
黄色蛍光(FRET)	445 nm	528.5-555.5 nm バンドパスフィルター (FF01-542/27-25, Semrock)	445nm / 515nm / 561nm透過
青色蛍光	445 nm	457-487 nm バンドパスフィルター (FF02-472/30-25, Semrock)	445nm / 515nm / 561nm透過

表 3-7 顕微鏡構成 2 の構成

装置	詳細
倒立型顕微鏡	IX-83, Olympus
EM-CCDカメラ	iXon Ultra 888, Andor
スピニングディスク型 共焦点ユニット	CSU-W1, Yokogawa
電動ステージ	MD-WELL96100T-META-S, シグマ光機
電動シャッター	MAC6000, Ludl Electronic Products
レーザーコンバイナー	ALC-601(405, 445, 488, 515, 560, 640 nm搭載), Andor
FRAPPAユニット	FRAPPA, Andor
対物レンズ	PlanApo, 60x, NA 1.42, Olympus
画像取得・解析ソフトウェア	MetaMorph, Molecular Device

表 3-8 蛍光顕微鏡 2 の蛍光フィルターセット

名称	励起波長	蛍光フィルター	ダイクロイックミラー
近赤外蛍光	640 nm	665-705 nm バンドパスフィルター (FF01-685/40-25, Semrock)	405nm / 488nm / 561 nm / 640 nm 透過
赤色蛍光	561 nm	580.5-653.5 nm バンドパスフィルター	405nm / 488nm / 561 nm / 640 nm 透過
緑色蛍光	488 nm	502.5-537.5 nm バンドパスフィルター	405nm / 488nm / 561 nm / 640 nm 透過
黄色蛍光	515 nm	528.5-555.5 nm バンドパスフィルター (FF01-542/27-25, Semrock)	445nm / 515nm / 561 nm 透過

### 3.6. チャンバー基質の調製と細胞の準備

走化性実験および細胞遊走の観察には、市販のマイクロ流体デバイス  $\mu$ slide (Ibidi,80311) を用いた。好中球様 HL60 細胞は細胞外基質を接着・遊走をするため、走化性実験および細

胞遊走の観察ではこの  $\mu$ slide 内部をフィブロネクチン (Corning 社 354008) でコーティングした。具体的には、4°C保存の固形フィブロネクチン 1 mg を室温(約 25°C)に戻し、室温中で超純水(MilliQ)1 mL を加えて 1 時間静置したのち、穏やかに混ぜ 15  $\mu$ L ずつチューブに分注した。これをストック溶液として-80°Cで保存した。標準のフィブロネクチン溶液は、ストック溶液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて 150  $\mu$ g/mL に希釈したものを使用時ごとに調製した。コーティングに用いるフィブロネクチン溶液の濃度は 0, 10, 50, 150 および 200  $\mu$ g/mL の濃度のうち、細胞が基質から剥がれず、かつ強接着により細胞重心運動が妨げられないと濃度として、150  $\mu$ g/mL を選択した。フィブロネクチン溶液の  $\mu$ slide チャンバー内部にこのフィブロネクチン溶液 100  $\mu$ L 注入することで満たし、室温で 1-3 時間静置したのち、フィブロネクチン溶液を除き、新しい PBS を 200  $\mu$ L 注入し、抽出することで洗浄とし、これを 3 回繰り返した。洗浄後のデバイスはただちに走化性実験・細胞遊走実験に用いた。なお、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline; PBS)については、表 3-9 の組成で調整し、塩酸を加えて pH を 7.4 とし、オートクレーブ滅菌(120°C, 20 分間)したものを用いた。

上記の作業の後、分化誘導した HL60 細胞を遠心(200G, 3 分, 室温)によって回収し、上清を取り除き HBSS(Wako, 082-09365)または 1 nM fMLP を含む HBSS に細胞を懸濁し、細胞懸濁液 100  $\mu$ L を上記のフィブロネクチンコートしたチャンバーに導入し走化性実験・遊走実験を行なった。なお全ての生細胞観察は 37°Cに保たれた環境で行なった。

表 3-9 リン酸緩衝生理食塩水(PBS)の組成

リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4)	500 mL
塩化ナトリウム	4.0 g
塩化カリウム	0.1 g
リン酸水素ナトリウム 七水和物	1.34 g
リン酸二水素カリウム	0.12 g
超純水	500 mL (メスアップ)

### 3.7. マイクロ流体デバイスを用いた細胞外液性環境の操作

#### 3.7.1. 空間的に伝搬する誘引分子勾配刺激の形成

マイクロ流体デバイス内では流速と流路幅が小さいため、層流が形成される。異なる溶液の境界では分子拡散によって溶質が混合し、流れと垂直な方向に溶質分子の勾配が形成される。この性質を利用し誘引分子の濃度勾配を形成した。 $\mu$ slide 3in1 チャンバー (図 3-6) を使い、送液口 2(Ch 2 と書く)から 50 nM fMLP(Sigma #F3506), 0.4  $\mu$ g/mL Alexa Fluor 594

(Invitrogen #A10438, MW = 758.8)を含む HBSS(+)を送液口 1, 3(Ch1, 3)からの送液を行った。流速の制御には圧力制御装置(MFCS, Fluigen)とシリンジポンプ (Pump 11 Elite, Harvard Apparatus) を用いた。蛍光分子である Alexa 594 は fMLP 濃度の推定に用いる。Ch2 の流速を 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  に設定し、(Ch1, Ch3) の流速を (26, 4)  $\mu\text{L}/\text{min}$  から (4, 26)  $\mu\text{L}/\text{min}$  まで連続的に変化させた (図 3-7, a)。濃度が時間的に増加し、減少する”釣鐘型の進行波刺激”を形成した (図 3-7 b, 図 3-8)。また、流速変化にかかる時間  $T_2 - T_1$  を 120, 600, 1200, 3600 秒と変化させることによって進行波の伝搬速度を制御した。

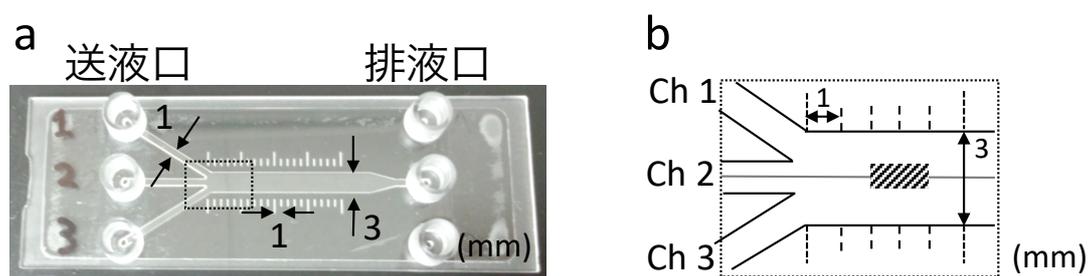
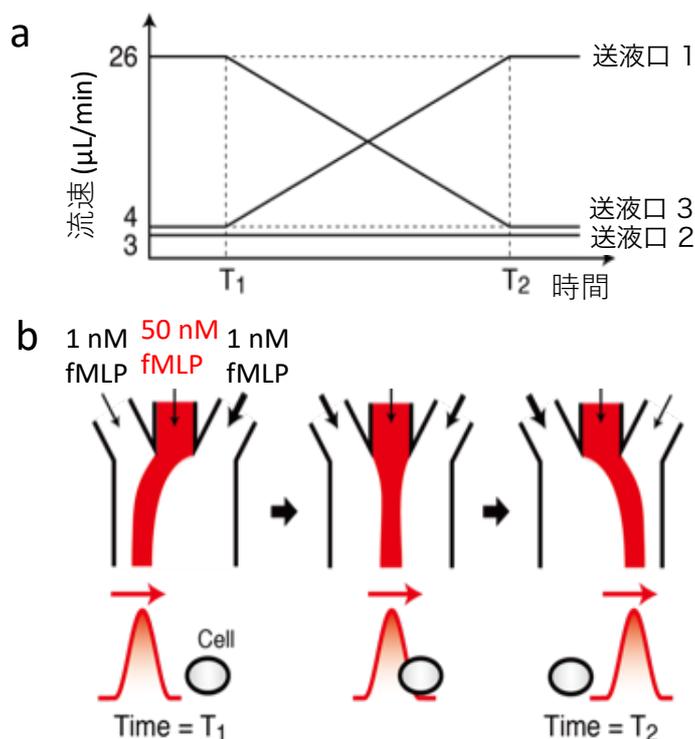


図 3-6 (a) Ibidi  $\mu\text{slide}$  3in1 チャンバー。(b) a の黒点線長方形領域の模式図。観察領域は幅 3 mm の流路の左端から 2-4 mm 3 mm の流路の中央から上下 0.2 mm の領域 (斜線長方形) とした。



### 図 3-7 $\mu$ slide 3in1 チャンバーを用いた進行波刺激の形成

(a) 進行波刺激を形成するための流速の制御。(b) 各時刻において形成される層流の模式図。左右の送液口からの流速を連続的に変化させ、中央の高濃度誘引分子溶液の層流の位置を変化させることによって釣鐘型の進行波が形成される。

#### 釣鐘型濃度勾配の空間的広がり

中央の流路から  $3 \mu\text{L}/\text{min}$ 、左右の流路から  $15 \mu\text{L}/\text{min}$  で送液した時に形成される Alexa594 蛍光輝度の空間分布を示す。撮影した蛍光画像の輝度値の空間的なむらは後述の方法 (3.8.2) で補正した。

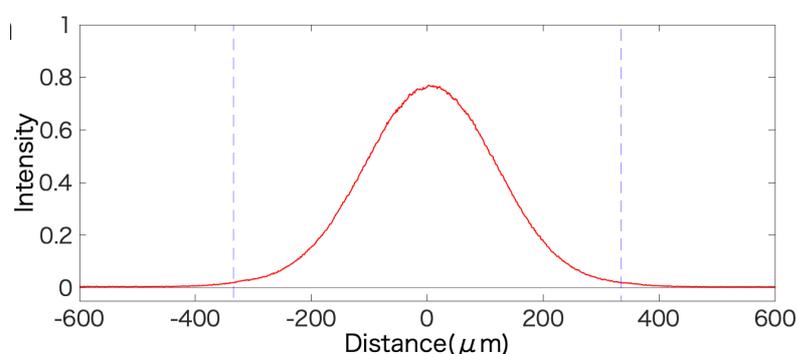


図 3-8

図 3-7 の送液条件における蛍光分子 Alexa594 の代表的な空間分布。

横軸は位置( $\mu\text{m}$ )、縦軸は蛍光輝度の相対値であり Alexa594 溶液で流路を満たした時の蛍光輝度を 1 とした。

#### 3.7.2. 空間一様な誘引分子刺激

$\mu$ slide 3in1 チャンバー (図 3-6) を用い、送液口 2 を閉じ、送液口 1 から HBSS(+)を、送液口 3 から蛍光分子 Alexa594 と誘引分子を含む HBSS(+)をそれぞれ送液した。送液口 1 および 3 からの流速の総量を  $120 \mu\text{L}/\text{min}$  とし、送液口 1 および 3 からの流速比を 1 : 9 から 9 : 1 に切り替えることによって、細胞外の液性環境を置換した。送液にはシリンジポンプ (Pump 11 Elite, Harvard Apparatus) を用いた。流速の切り替えに伴う、図 3-9 (a)の観察領域における Alexa594 の蛍光強度の変化を図 3-9 (b)に示す。6 秒間で観察領域内での溶液が置換されることが確認された。

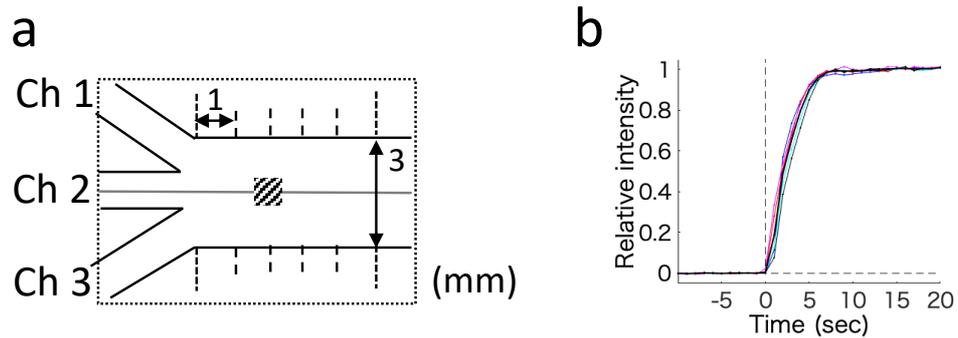


図 3-9 流速切り替えに伴う Alexa594 蛍光強度の変化

(a) 観察領域は幅 3 mm の流路の左端から 2 mm 3 mm の流路の中央の 340  $\mu\text{m}$  四方の領域 (斜線正方形) とした。(b) 観察領域内での Alexa594 の相対蛍光強度の変化。

## 3.8. 画像解析

### 3.8.1. FRET ratio の算出

表 3-10 に示すように蛍光画像の取得条件を FRET-YFP チャンネル、CFP チャンネル、YFP チャンネルと呼ぶ。CFP から YFP への FRET を蛍光顕微鏡を用いて測定する場合、YFP チャンネル側の画像には正味の FRET シグナルに加えて、(1) CFP 蛍光と、(2) 445 nm のレーザーで直接励起された YFP の蛍光が混入している。そこで、後二者のシグナルを差し引き、補正シグナルを以下のように算出した。便宜上、表 3-6 の蛍光観察条件を次のように対応させる。補正後のシグナルを  $FRET_{corr}$ 、FRET-YFP チャンネル、CFP チャンネル、YFP チャンネルで取得した時の蛍光シグナルを  $FRET_{YFP}$ ,  $CFP$ ,  $YFP$  とかく。正味の FRET に相当するシグナルを以下の補正により定めた。

$$FRET_{corr} = FRET_{YFP} - \alpha \cdot CFP - \beta \cdot YFP$$

$\alpha$  は CFP(mTurquoiseGL)のみを発現する細胞をサンプルとした場合の、FRET-YFP チャンネルの 1 細胞の平均輝度値を縦軸に、CFP チャンネルの 1 細胞の蛍光輝度値を横軸にして散布図を作成したときの回帰直線の傾きから算出した (図 3-10 a)。 $\beta$  は YFP(YPET)のみを発現する細胞をサンプルとした場合の、FRET-YFP チャンネルの 1 細胞の平均輝度値を縦軸に、YFP チャンネルの 1 細胞の蛍光輝度値を横軸にして散布図を作成したときの回帰直線の傾きから算出した (図 3-10 b)。なお実際に取得した細胞の蛍光画像では細胞外領域も 0 でない背景輝度値を持つが、視野中に細胞のいない画像を 30 枚取得し、その平均を差し引いた細胞の蛍光画像を用いて上記の補正を行なっている。FRET の指標としてこの補正を適用したシグナル ( $FRET_{corr}$ ) と CFP シグナル ( $CFP$ ) の比 ( $FRET_{ratio}$ ) を用いた。

$$FRET_{ratio} = \frac{FRET_{corr}}{CFP}$$

表 3-10 蛍光画像の取得条件

名称	励起波長	蛍光フィルター	ダイクロイックミラー
YFP チャンネル	488 nm	528.5-555.5 nm バンドパスフィルター (FF01-542/27-25, Semrock)	405nm / 488nm / 561nm透過
FRET-YFP チャンネル	445 nm	528.5-555.5 nm バンドパスフィルター (FF01-542/27-25, Semrock)	445nm / 515nm / 561nm透過
CFP チャンネル	445 nm	457-487 nm バンドパスフィルター (FF02-472/30-25, Semrock)	445nm / 515nm / 561nm透過

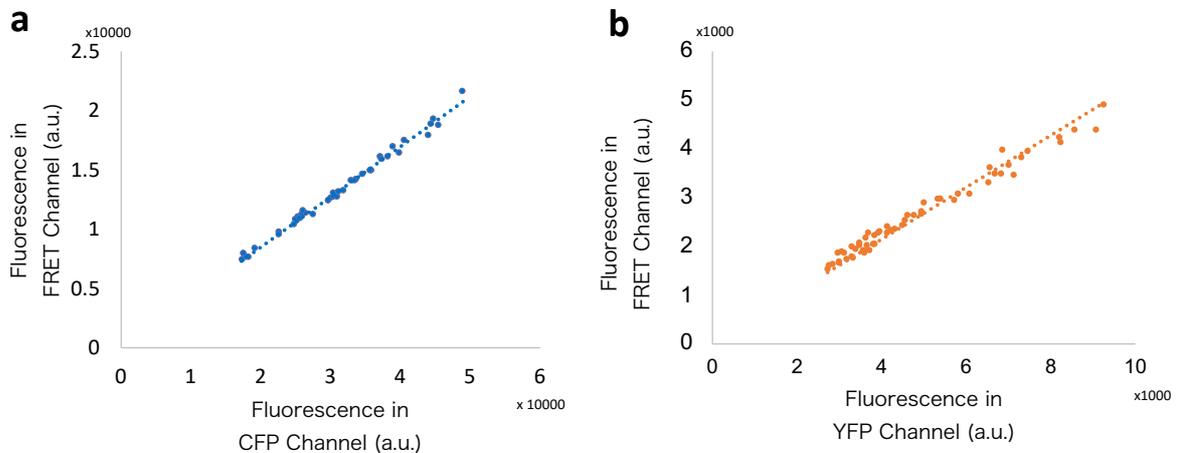


図 3-10 FRET チャンネルへの蛍光の漏れこみの評価

(a) mTurquoiseGL (CFP) 発現 HL60 細胞の CFP チャンネルおよび FRET チャンネルでの蛍光輝度値。(b) YPET (YFP) 発現 HL60 細胞を対象とした場合の、488 nm で励起した場合の YFP チャンネルでの蛍光輝度値および 445 nm での励起による FRET チャンネルでの蛍光輝度値。(a,b の両軸は背景輝度値を差し引いた後の蛍光輝度値である。)

### 3.8.2. 誘引分子濃度の推定と進行波刺激の通過時間の測定

進行波刺激について、誘引分子濃度を以下に示す方法で推定した。また「刺激の通過時間」を算出した。進行波刺激における Alexa594 のタイムラプス蛍光画像（「刺激」蛍光画像と呼ぶ）、観察領域を 50 nM fMLP, 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Alexa 594 を含む HBSS(+)で満たした状態で撮影した蛍光画像（「最大輝度」蛍光画像と呼ぶ）、観察領域を 1 nM fMLP を含む HBSS(+)で満たした状態で撮影した蛍光画像（「背景輝度」蛍光画像と呼ぶ）を用いる。

<手順>

1. 刺激蛍光画像の空間的な輝度のむらを補正するため、図 3-11 に示す計算を行い、補正後画像を作成した。補正後画像は 0 から 1 の間の値をとる。

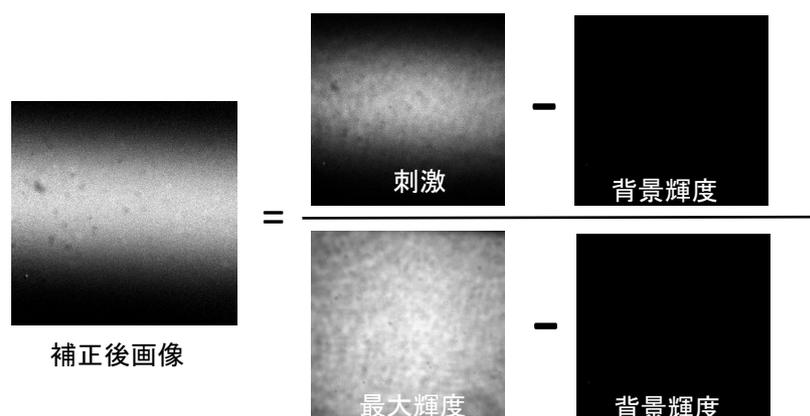


図 3-11 蛍光画像の空間的な輝度のむらの補正方法

2. 1 で得た補正後画像に空間平均化処理を行った。空間平均は対象の点を中心に進行波伝搬方向に 3 ピクセル、その垂直方向に 101 ピクセルとした<sup>3</sup>。
3. 各細胞のトラッキングデータの最初の時刻での位置における補正後画像のピクセル値の時間変化を得た(相対蛍光強度と呼ぶ)(図 3-12 a, b)。値が最大となる点を進行波の頂点と呼ぶ。
4. 進行波の頂点での時刻以前で、相対蛍光強度が閾値(0.02)を超える直前の時刻( $T_i$ )と、進行波の頂点での時刻以後に値が閾値(0.02)を初めて下回る時刻( $T_f$ )の差を刺激の通過時間( $T_{\text{transit}} = T_f - T_i$ )と定める (図 3-12 b)。また濃度増加を伴う時間帯を進行波前面、濃度減少を伴う時間帯を進行波背面と呼ぶ。

<sup>3</sup> 取得した画像は 512 x 512 ピクセルである。

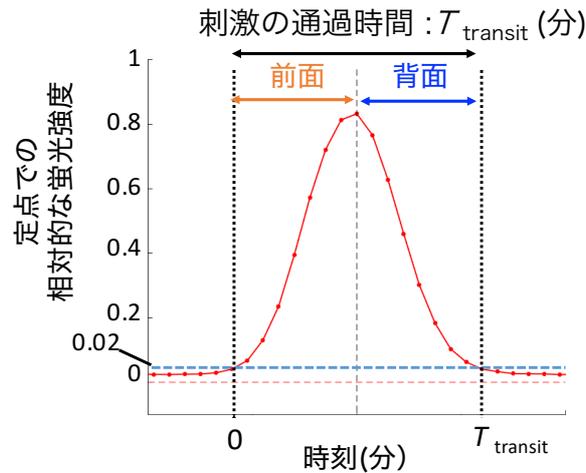


図 3-12 進行波刺激の通過時間の算出方法。進行波頂点の以前で閾値(0.02)を超える直前の時刻と進行波頂点以降で初めて閾値(0.02)を下回る時刻の差を刺激の通過時間とする。進行波刺激の通過時間帯のうち、濃度増加を伴う時間帯を進行波前面、濃度減少を伴う時間帯を進行波背面と呼ぶ。

### 3.8.3. 重心移動のトラッキング

取得した細胞運動の画像で、閾値を引くことによって細胞のマスクを取得することは難しかった。本解析では ImageJ のプラグインである MTrackJ [Meijering, et al., 2012] を用いて、各時刻における細胞の空間座標(x,y)を手動で求めた。細胞の重心をトラッキングした。

### 3.8.4. 蛍光画像からの二値化画像の作成

蛍光顕微鏡画像をもとに細胞内・外の領域についての輝度値を算出するために、細胞の蛍光画像をもとにマスクを作製した。細胞マスクの作成には ImageJ を使い、周辺 1 ピクセルのメディアンフィルター処理を行ったのち、蛍光画像の輝度値ヒストグラムをもとに Li の手法 [Li & Tam, 1998] で閾値を決定し、閾値より高い蛍光輝度値を持つピクセルを 255、閾値より低い蛍光輝度値を持つピクセルを 0 とする二値化を行い、Erode 処理を 1 度行ったものをマスク画像とした。マスク画像を作成したのち、もとの蛍光画像と重ね合わせ、必要に応じてマスク領域と細胞領域が一致するよう修正を加えた画像を最終的なマスク画像として解析に用いた。

### 3.8.5. 細胞境界のトラッキング

細胞運動における局所的な膜の伸長・収縮を可視化・測定するために、細胞のマスク画像をもとに、その輪郭を等間隔に分割し、異なる時刻においてその分割の対応づけを行った。具体的には、細胞輪郭を時計回りに 500 点に分割し、連続するフレームで分割点(Boundary Position)の対応づけを行う (図 3-13 a)。時間的に連続して取得した画像間での分割点の対応づけは、分割点間の距離の二乗和が最小となるように選んだ。この対応づけにより、2 時刻の対応する分割点の距離の差をもとに局所的な伸長・収縮速度、分割点近傍の細胞内のシグナル強度、分割点近傍の細胞外のシグナル強度を算出できる。また細胞の形態の指標として、局所的な膜曲率を算出した。膜分割(N)における曲率は反時計回りに 25 離れた膜分割(N-25)、時計回りに 25 離れた膜分割(N+25)の 3 点を通る円の半径の逆数として求めた (図 3-13 b)。円が細胞の内側から接する場合は曲率の符号を正、円が細胞の外側から接する場合は符号を負とする。この解析には澤井研究室に在籍していた藤森大平氏が作成したプログラム[GitHub; fjmrt/ BoundaryTrack)を用いた。

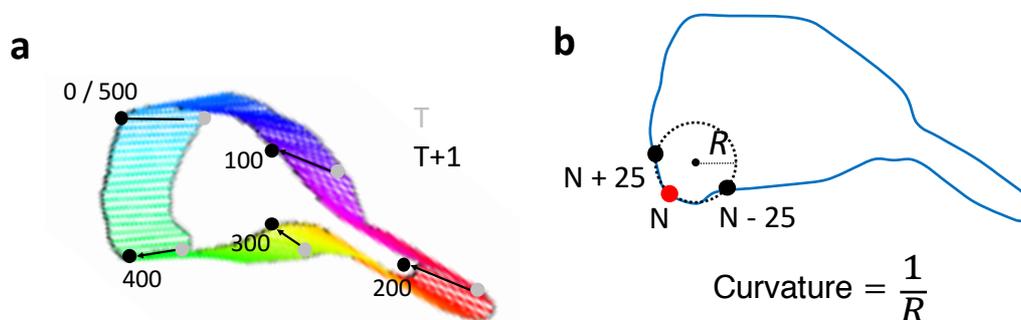


図 3-13 細胞境界のトラッキング

(a)異なる時刻での細胞膜分割の対応。細胞膜を時計回りに 500 点に分割し、連続するフレームで分割点(Boundary Position)の対応づけを行う。時間的に連続して取得した画像間での分割点の対応づけは、分割点間の距離の二乗和が最小となるように選ぶ。(b)曲率の算出方法。ある膜分割(N)における曲率は反時計回りに 25 離れた膜分割(N-25)、時計回りに 25 離れた膜分割(N+25)の 3 点を通る円の半径の逆数として求める。円が細胞の内側から接する場合は曲率の符号を正、円が細胞の外側から接する場合は符号を負とする。



## 4. 結果：誘引分子の進行波刺激に対する好中球様 HL60 細胞の走化性運動

### 4.1. はじめに

従来、好中球は細胞両端での誘引分子の濃度差に基づき細胞内のシグナル分子活性の空間的な違いを生み出すことによって運動方向を決定すると考えられてきた [Servant et al., 2000]。しかし、生体内では細胞外の濃度場は時空間的に変動していることが一般的であると考えられる [Lammerman et al., 2013; Afonso et al., 2012]。これまで細胞外の誘引分子濃度場を正確に再現性高く制御することが困難であったために、動的な誘引分子濃度勾配における好中球の走化性はわかっていない。そこで、細胞外の液性環境を正確かつ再現性高い操作を可能とする微小流体デバイスを用い、誘引分子濃度変動を伴う勾配刺激に対する好中球様細胞の走化性運動を測定した。

### 4.2. fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動

#### 4.2.1. fMLP 進行波刺激に対する重心運動

誘引分子である fMLP (MW = 437.6) の進行波刺激 (3.7.1 参照) に対する細胞の方向性運動について、進行波刺激の伝搬速度依存性を測定した。

$T_{\text{transit}} = 1$  分の進行波刺激に対して (3.8.2)、好中球様 HL60 細胞が誘引分子の高濃度側へ移動する様子は観察されなかった。細胞は進行波刺激投入前には  $18 (\pm 2.6) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さでランダム運動をしていたが、進行波背面 ( $t = 0.5$  分) にて重心速度が低下し、進行波刺激が通過した後 30 秒間の重心速度は  $5.3 (\pm 1.3) \mu\text{m}/\text{min}$  まで低下した (図 4-1, a)。

$T_{\text{transit}} = 4$  分の進行波刺激に対して細胞は、進行波前面において fMLP 高濃度側に向かって平均  $5.5 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さで  $14 \mu\text{m}$  移動した。一方で、進行波背面では高濃度側へは  $2.0 (\pm) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さで  $4.6 \mu\text{m}$  移動した (図 4-1, b)。

$T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波刺激に対して、進行波前面では、細胞重心は fMLP 高濃度側へ平均  $9.6 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  で  $35 \mu\text{m}$  移動した。進行波背面では、細胞は高濃度側に平均  $5.3 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  で  $20 \mu\text{m}$  移動した (図 4-1, c)。個々の細胞に関しては、fMLP 高濃度側への移動する細胞と運動を停止する細胞とが観察された (図 4-2)。

$T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波刺激に対して、進行波前面では fMLP 高濃度側に平均  $8.1 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  で  $77 \mu\text{m}$  移動した。また進行波背面においても、高濃度側に  $7.3 (\pm 0.7) \mu\text{m}/\text{min}$  で  $71 \mu\text{m}$  移動することが観察された (図 4-1, d)。

また、fMLP 進行波に対する HL60 の走化性は刺激前の細胞のランダム運動の方向に依存することが観察された。そこで、刺激前の細胞の運動方向に基づいて分類を行い、それぞ

れについて進行波に対する細胞の軌跡を求めた。刺激前1分間の移動距離が $5\mu\text{m}$ 以下である細胞を”Non-Polar(無極性)”、それ以外の細胞のうち刺激前に進行波に向かって運動していた細胞を”Forward(前進)”、進行波の伝搬方向と同じ方向に運動していた細胞を”Backward(後進)”、進行波の伝搬方向と垂直に運動していた細胞を”Orthogonal(側進)”と分類して図示した。 $T_{\text{transit}} = 4$ 分のfMLP進行波刺激に対しては、後進細胞は刺激前の運動方向に1分程度運動を継続することが見られた。(図4-3 b, 青)。 $T_{\text{transit}} = 7$ 分のfMLP進行波刺激に対しては、濃度の時間増加を伴う間、後進細胞は刺激前の運動方向に1分程度運動を継続した後fMLP高濃度側への移動を示した(図4-3 c, 青)。

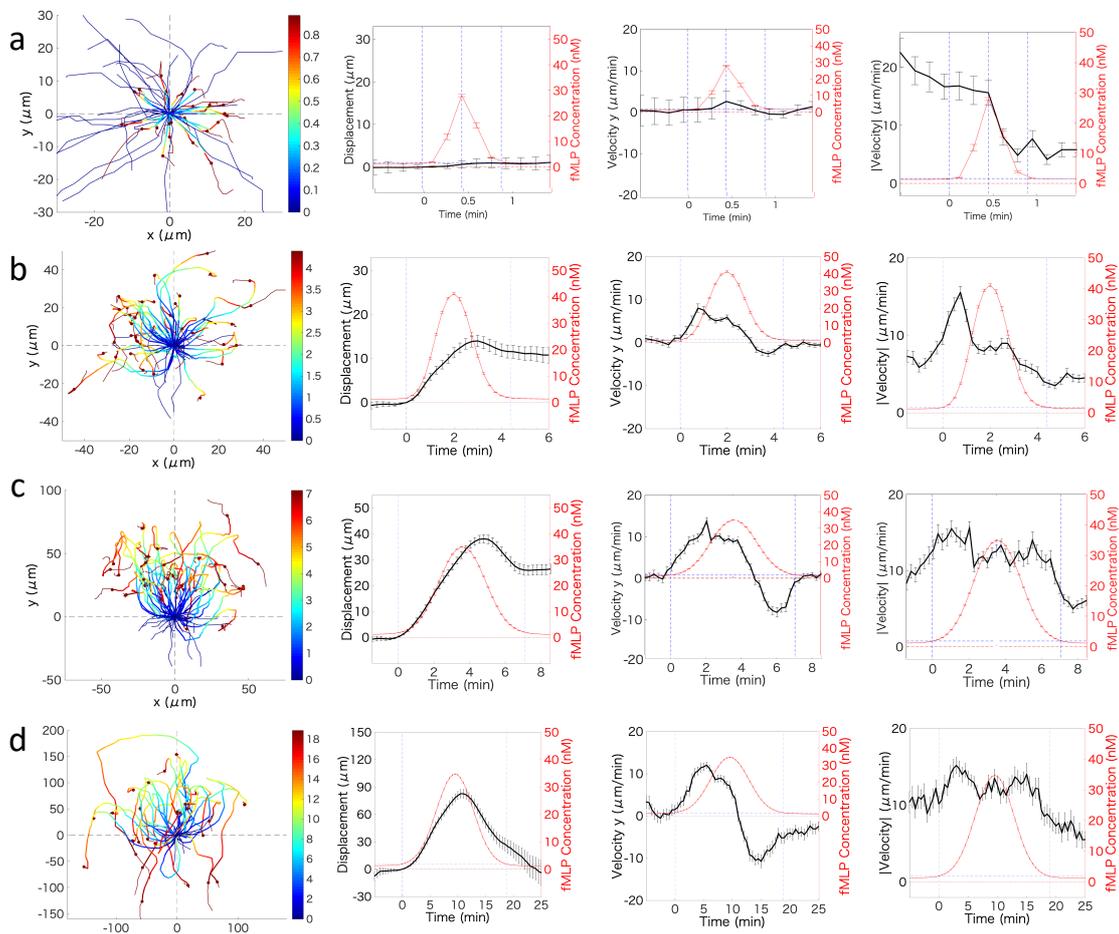
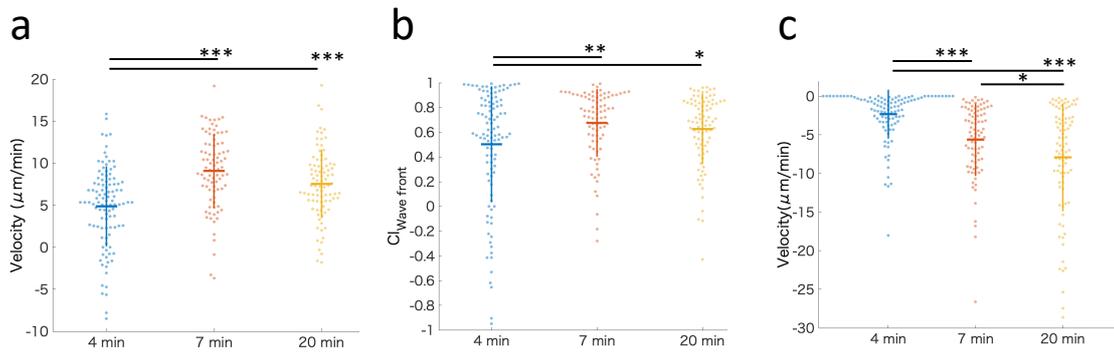


図 4-1 fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動 (a, b, c, d はそれぞれ  $T_{\text{transit}} = 1, 4, 7$  および 20 分の進行波に対応)

(左端) 進行波刺激に対する  $xy$  平面での細胞の軌跡。色は刺激投入からの経過時間 (分) を示す。青細線は刺激投入前の1分間の軌跡、茶細線は刺激終了後の1分間の軌跡を示す。時刻 0 を原点とした。(中央左) 進行波に向かう方向への重心の移動距離。(中央右) 進行

波に向かう方向(図中では y と記載)への重心運動の瞬間速度。(右端) 基質平面上での重心運動の瞬間速さ。両軸グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置における fMLP 濃度の時間変化を表す。瞬間速度は 10 秒間 (a)、15 秒間 (b, c) または 30 秒間 (d) の変位をもとに速度を算出し、単位を  $\mu\text{m}/\text{min}$  に変換した数値を示す。サンプル数は a,b,c,d について順に、 $n = 24, 105, 85, 87$ 。エラーバーは標準誤差。



**図 4-2** fMLP 進行波刺激 ( $T_{\text{transit}} = 4, 7, 20$  分) に対する細胞の走化性運動の特徴づけ。(a) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(b) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の移動距離と平面上での細胞の総移動距離の比。(c) 進行波背面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(アスタリスクはウェルチの t 検定により有意差があると判定されたことを示す。アスタリスクの数に応じて、それぞれ以下の検定基準で有意差が認められたことを示す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。横方向の線分は平均値、縦方向の線分の長さは標準偏差を表す。)

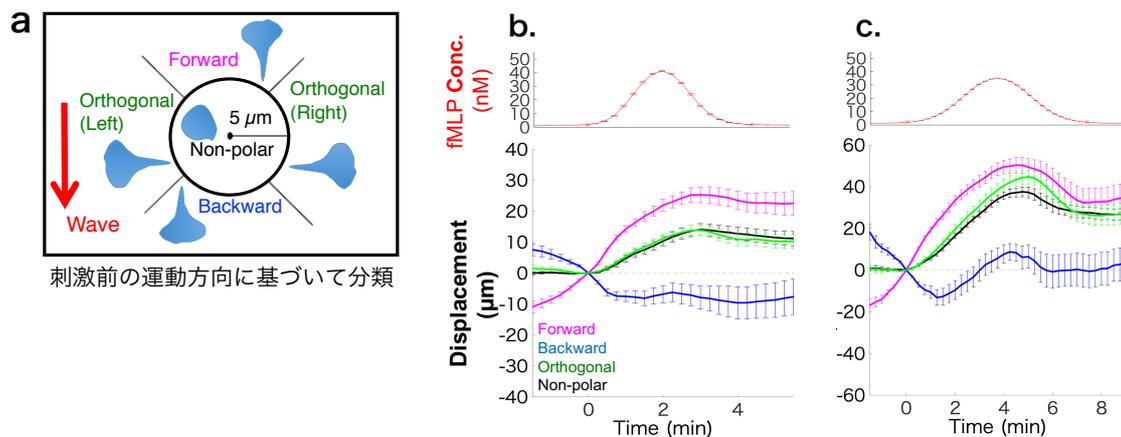


図 4-3 進行波刺激投入前の HL60 細胞の運動極性に依存した fMLP 進行波に対する走化性運動

(a) 刺激投入前の細胞の運動方向に基づいて分類した 5 つのデータ群の概要。(b,c) Alexa594 蛍光輝度値から推定した fMLP 濃度の時間変化 (上)。fMLP 進行波に向かう方向への重心の移動距離(下)。(b)  $T_{Transit} = 4$  分,(c)  $T_{Transit} = 7$  分の場合。細胞数は[Non-Polar, Forward, Backward, Orthogonal] の順に、 $n = [35,18,9,43]$  (b)、 $[32,16,7,30]$  (c)。エラーバーは標準誤差。

## 4.2.2. フロント進行波刺激および濃度反転した進行波刺激に対する細胞の走化性運動

4.2.1 節で示した fMLP 進行波刺激においては、細胞は濃度の時間的な増加に引き続き濃度が時間減少する勾配刺激を受ける。ここでは fMLP 濃度の時間変化と走化性運動の関連を調べるため、濃度の時間増加または減少のいずれかのみから構成された刺激への応答を解析した。具体的な手法としては釣鐘型進行波刺激の実験の系を基本として用い、以下の操作を行った。

中央の送液口を閉じ、左側の送液口から 1 nM fMLP を含む HBSS(+)を、右側の送液口から 50 nM fMLP, 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Alexa Fluor 594 を含む HBSS(+)を送液することによって濃度が時間的に増加する勾配刺激を形成した(図 4-4, a)。この場合、(Ch1, Ch3) の流速を (10, 20)  $\mu\text{L}/\text{min}$  から (20, 10)  $\mu\text{L}/\text{min}$  まで 300 秒かけて変化させた。一方、(Ch1, Ch3) の流速を (20, 10)  $\mu\text{L}/\text{min}$  から (10, 20)  $\mu\text{L}/\text{min}$  と変化させることによって、濃度が時間的に減少する勾配刺激を形成した(図 4-4 b)。

細胞の重心運動を図 4-5 に示す。進行波前側では勾配方向に 10  $\mu\text{m}$  重心移動が見られたことに対し(図 4-5 a)、進行波後側では勾配方向への移動は 5  $\mu\text{m}$  と短かった(図 4-5.b)。

また、左右の送液口から 50 nM fMLP, 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Alexa Fluor 594 を含む HBSS(+)を中央の送液口から 1 nM fMLP を含む HBSS(+)を送液し (Ch1, Ch2, Ch3) の流速を (26, 3, 4)  $\mu\text{L}/\text{min}$  から (4, 3, 26)  $\mu\text{L}/\text{min}$  まで 1200 秒かけて連続的に変化させることによって、谷型の進行波刺激を形成した(図 4-6 a)。濃度反転した進行波刺激に対して、細胞は濃度が時間的に減少する勾配場では高濃度側への移動を示さなかったが、濃度が時間的に増加する勾配場では高濃度側への移動を示した(図 4-6 b)。

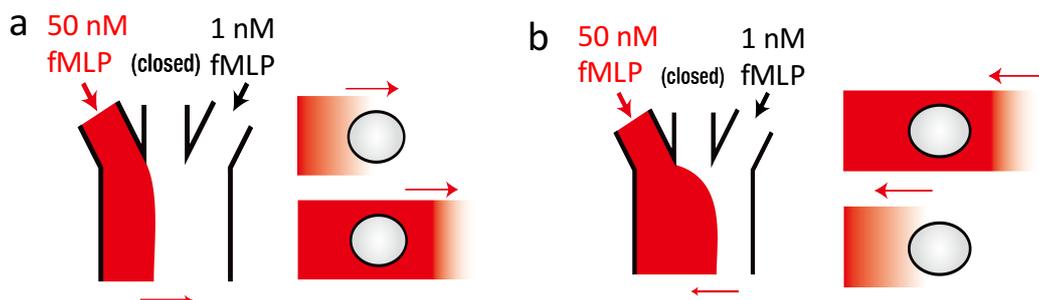
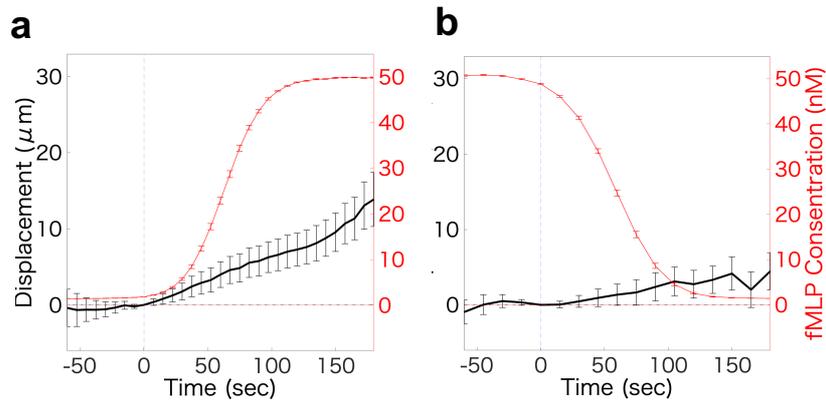
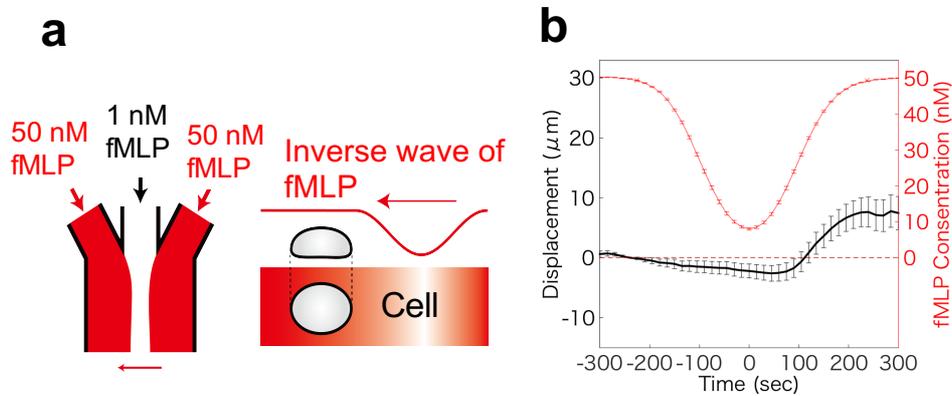


図 4-4 濃度が時間的に増加/減少する勾配刺激

(a) Ch 1 (左側) の流速を増加させ、Ch 3 (右側) の流速を減少させることによって誘引分子濃度の時間増加を伴う勾配を形成する。(b) Ch 1 (左側) の流速を減少させ、Ch 3 (右側) の流速を増加させることによって誘引分子濃度の時間減少を伴う勾配を形成する。



**図 4-5** 濃度が時間的に増加(a)/減少する(b)勾配刺激に対する細胞の重心の移動距離。(高濃度側への変位を正とする) 各グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置における fMLP 濃度の時間変化を表す。サンプル数は a, b の順に、 $n = 25, 30$  細胞。エラーバーは標準誤差。



**図 4-6** 谷型の進行波刺激の形成と細胞の走化性運動 (a) 谷型の進行波を形成する場合の送液方法および細胞が受ける谷型進行波の模式図 (b) 谷型進行波に対する細胞の重心の移動距離。濃度が時間的に減少する勾配場においては勾配方向への走化性運動は見られなかったが、濃度が時間的に増加する勾配場においては勾配方向への運動が確認された。(変位の符号はパネル a の右向きを正とする) グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置での fMLP 濃度の時間変化を表す。サンプル数は  $n = 91$  細胞。エラーバーは標準誤差。

### 4.3. Cdc42 阻害での fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動

好中球様 HL60 細胞の走化性において、先導端分子の 1 つである Cdc42 が果たす役割を考察するため、Cdc42 の選択的阻害剤である低分子化合物 ZCL278 を用い、fMLP 進行波刺激に対する走化性運動・応答を解析した。ZCL278 は Cdc42 に結合し、Cdc42 とそのグアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide Exchange Factor; GEF) である Intersectin (ITSN) との結合を阻害する分子として設計された。Cdc42 と ZCL278 の結合定数は蛍光滴定 (350 nm の Trp 蛍光) では、 $K_d = 6.4 \mu\text{M}$ 、表面プラズモン共鳴法からは、 $K_d = 11.4 \mu\text{M}$  と算出されている [Friesland et al., 2013]。

#### 10 $\mu\text{M}$ ZCL278 存在下での HL60 細胞の走化性運動

Cdc42 阻害剤である ZCL278 を終濃度 10  $\mu\text{M}$  となるように溶液に加え、fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性を測定した (図 4-7, 図 4-8、表 4-1)。

$T_{\text{transit}} = 4$  分の fMLP 進行波刺激に対しては、進行波前面では高濃度側に向かって平均  $1.1 (\pm 0.8) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さで  $1.4 \mu\text{m}$  移動した (括弧内の誤差は標準誤差)。薬剤処理をしない場合では、同等の濃度の時間増加を伴う間に細胞は高濃度側に平均  $5.5 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  で  $12 \mu\text{m}$  移動した。つまり、ZCL278 による Cdc42 活性の阻害により、進行波前面における走化性速度が約 14 % まで低下した (図 4-7, a)。

$T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波刺激に対して進行波前面では誘引分子高濃度側に向かって平均  $4.3 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  で  $14 \mu\text{m}$  移動した。同様の誘引分子勾配のもとで薬剤処理しない場合は平均  $9.1 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  で  $34 \mu\text{m}$  移動した。つまり、ZCL278 による Cdc42 活性の阻害により、進行波前面での走化性速度は約 47 % まで低下した。進行波背面では高濃度側へ平均  $1.4 (\pm 0.2) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さで  $5.2 \mu\text{m}$  重心移動した。(図 4-7, b)。進行波前面における走化性速度はの低下は時間変化の速い  $T_{\text{transit}} = 4$  分の fMLP 進行波刺激の場合により顕著に見られた。

$T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波刺激に対して、細胞は進行波前面において高濃度側に平均  $3.8 (\pm 0.3) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さで  $39 \mu\text{m}$  移動し、進行波背面では高濃度側に平均  $2.9 (\pm 0.3) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さで  $31 \mu\text{m}$  移動した。また、fMLP 進行波投入後、しばらく経過し fMLP 濃度が 5-10 nM となった時点から高濃度側への速度および重心運動速度が上昇することが見られた。薬剤処理をしない場合では、進行波前面・背面での高濃度側への運動速度はそれぞれ、 $8.2 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  および  $7.2 (\pm 0.5) \mu\text{m}/\text{min}$  であった (図 4-7, c)。

$T_{\text{transit}} = 31$  分の進行波刺激に対して、進行波前面では高濃度側への移動が観察された。ただし、高濃度側への運動速度は fMLP 濃度が 10 nM 以下では  $0 (\mu\text{m}/\text{min})$  とは異ならず、ZCL278 存在下では誘引分子低濃度の勾配のもとでの走化性が阻害されることが観察され

た。進行波背面においても高濃度側への移動が観察され、進行波前面と比べて高濃度側に向かって、より長い距離を移動することが観察された (図 4-7, d)。

#### 20 $\mu$ M ZCL278 存在下での HL60 細胞の走化性運動

Cdc42 阻害剤である ZCL278 を終濃度 20  $\mu$ M となるように溶液に加え、fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性を測定した。  $T_{\text{transit}} = 20$  分の fMLP 進行波刺激に対する走化性を観察したところ進行波前面・背面のいずれでも、fMLP 高濃度側へ細胞重心の移動は観察されなかった (図 4-9)。

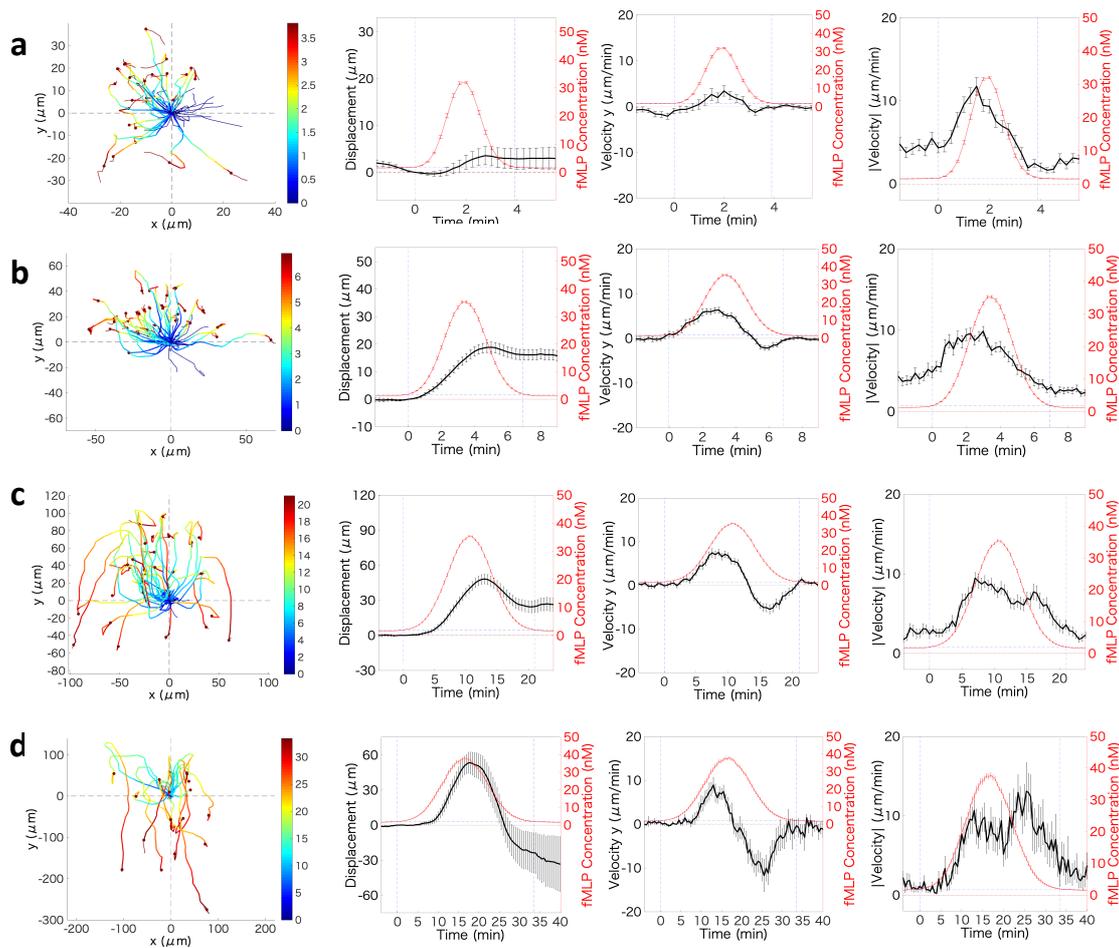


図 4-7 10  $\mu\text{M}$  ZCL278 存在下における進行波刺激に対する細胞の走化性運動 (a,b,c,d, は  $T_{\text{transit}} = 4, 7, 20, 31$  分の進行波刺激に対応)

(左端) 進行波刺激に対する  $xy$  平面での細胞の軌跡。色は刺激投入からの経過時間 (分) を示す。青細線は刺激投入前の 1 分間の軌跡、茶細線は刺激終了後の 1 分間の軌跡を示す。時刻 0 を原点とした。(中央左) 進行波に向かう方向への重心の移動距離。(中央右) 進行波に向かう方向(図中では  $y$  と記載)への重心運動の瞬間速度。(右端) 基質平面上での重心運動の瞬間速さ。両軸グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置における fMLP 濃度の時間変化を表す。サンプル数は a, b, c の順に、 $n = 52, 100, 60, 17$  細胞。エラーバーは標準誤差。

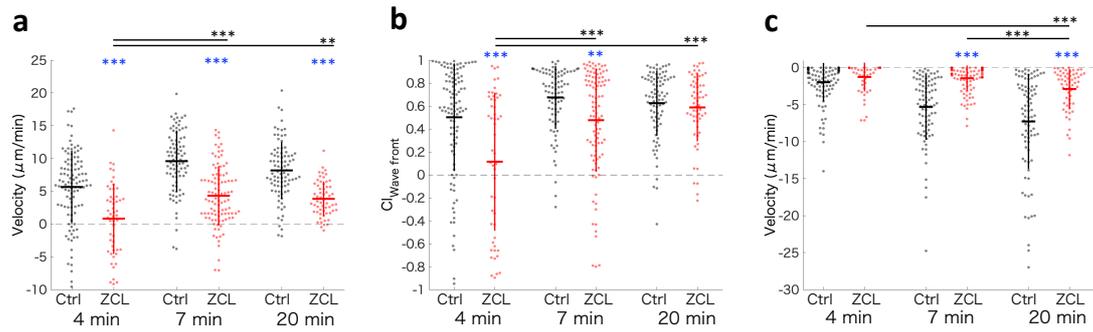


図 4-8 ZCL278(10  $\mu\text{M}$ )存在下での fMLP 進行波刺激に対する細胞の走化性運動。(a) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(b) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の移動距離と平面上での細胞の総移動距離の比。(c) 進行波背面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(アスタリスクはウェルチの t 検定により有意差があると判定されたことを示す。アスタリスクの数に応じて、それぞれ以下の検定基準で有意差が認められたことを示す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。横方向の線分は平均値、縦方向の線分の長さは標準偏差を表す。)

表 4-1 ZCL278(10  $\mu\text{M}$ )存在下での fMLP 進行波刺激に対する細胞の走化性運動

Velocity ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	Wave Front			Wave Back		
	4 min	7 min	20 min	4 min	7 min	20 min
Control	5.5 ( $\pm 0.5$ )	9.6 ( $\pm 0.5$ )	8.1 ( $\pm 0.4$ )	2.0 ( $\pm 0.3$ )	5.3 ( $\pm 0.5$ )	7.3 ( $\pm 0.7$ )
ZCL278	1.1 ( $\pm 0.8$ )	4.3 ( $\pm 0.5$ )	3.8 ( $\pm 0.3$ )	1.2 ( $\pm 0.3$ )	1.4 ( $\pm 0.3$ )	2.9 ( $\pm 0.3$ )

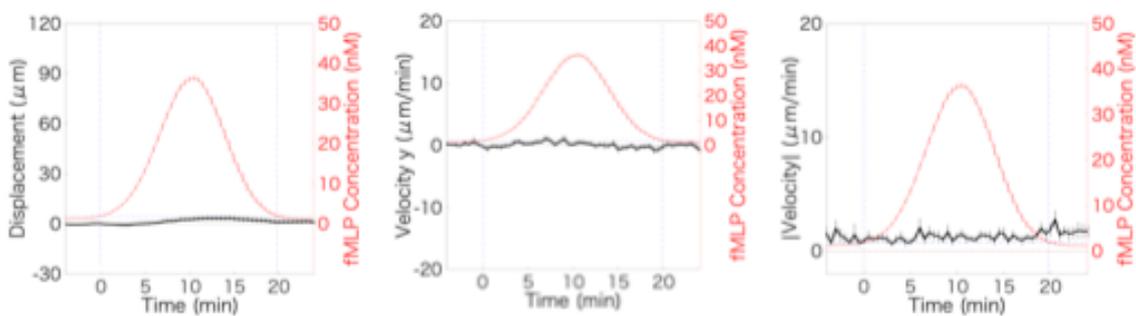


図 4-9 20  $\mu\text{M}$  ZCL278 存在下での fMLP 進行波刺激に対する細胞の走化性運動 ( $T_{\text{transit}} = 20$  分)

進行波に向かう方向への細胞運動の移動距離(左)。 進行波に向かう方向(図中では y と記載)への細胞運動の瞬間速度 (中央)。 基質平面上での細胞運動の瞬間速さ (右)。 各グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置における fMLP 濃度の時間変化を表す。 観察時間中に 10  $\mu\text{m}$  以上動いた細胞をトラッキングの対象とした。(n = 17)

#### 4.4. ROCK 阻害での fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動

HL60 細胞の走化性において、ミオシンモーター活性を制御するタンパク質の 1 つである ROCK (Rho-associated kinase) が果たす役割(図 4-10, Bishop & Hall, 2000; Rient & Ridley, 2003; Tsai et al., 2019)を考察するため、ROCK を選択的に阻害する低分子化合物 Y27632 用い、fMLP 進行波刺激に対する走化性運動を測定した。Y27632 が ROCK の酵素活性を半分に低下させる濃度(Ki)は COS 細胞を対象として 0.14  $\mu\text{M}$  である[M. Uehata, 1997]。

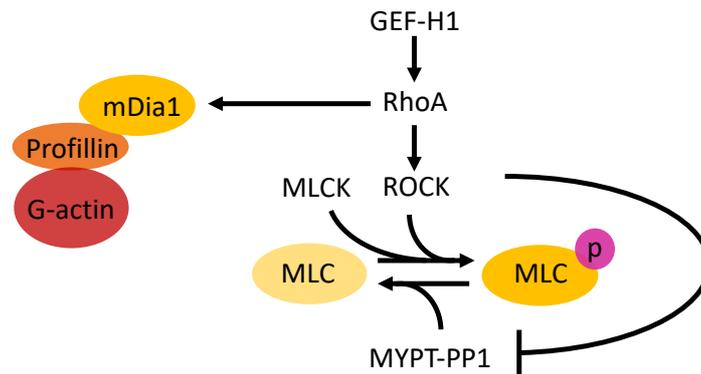


図 4-10 RhoA, ROCK シグナル伝達系の模式図

ROCK は RhoA によって活性化される。ROCK はミオシン軽鎖リン酸化を促進し、ミオシン脱リン酸化を阻害することによって、ミオシン線維の収縮を促す。(MLC;ミオシン軽鎖、MLCK;ミオシン軽鎖リン酸化酵素、MYPT-PP1;ミオシン脱リン酸化酵素複合体)

ROCK 阻害剤である Y27632 を終濃度 20  $\mu\text{M}$  となるように溶液に加え、fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性を測定した (図 4-11、図 4-12、表 4-2)。

$T_{\text{transit}} = 4$  分の進行波に対しては進行波に対して、進行波前面では高濃度側への平均 4.3 ( $\pm 0.6$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。一方、進行波背面では高濃度側への運動速度は 0.7 ( $\pm 0.1$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  であり、ほとんど走化性は観察されなかった (図 4-11, a)。刺激前には細胞はランダムな方向への重心運動を行っていたが、刺激通過後では細胞外誘引分子濃度は刺激前と等しいにも関わらず、細胞の運動速度が 0  $\mu\text{m}/\text{min}$  近くまで低下した。

$T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波に対して、進行波前面では高濃度側への平均 6.4 ( $\pm 0.5$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。一方、進行波背面では高濃度側への運動速度は 1.5 ( $\pm 0.2$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  であり、薬剤なしと比較して有意 ( $p < 0.001$ ) に小さかった。この結果は Y27632 非存在下にて進行波の後ろ側で勾配方向への明確な移動が見られたことと明らかに異なる。刺激前に進行波と同じ方向に運動していた細胞は、進行波の前側で勾配方向に向きを変え、進行波の後ろ側では

勾配方向への運動を示さなかった (図 4-11, b)。

$T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波に対して、進行波前面では高濃度側への平均  $5.8 (\pm 0.3) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。進行波背面では高濃度側への運動速度は  $1.7 (\pm 0.3) \mu\text{m}/\text{min}$  であり、薬剤なしと比較して有意 ( $p < 0.001$ ) に小さかった (図 4-11, c)。

総じて、Y27632 存在下においては、進行波前面では走化性を示したが、進行波背面では進行波の通過時間が遅い場合でも走化性が顕著に低下した。進行波の通過時間によらず、進行波の通過に伴い、細胞の運動の速さが  $0 \mu\text{m}/\text{min}$  まで低下することが観察された。

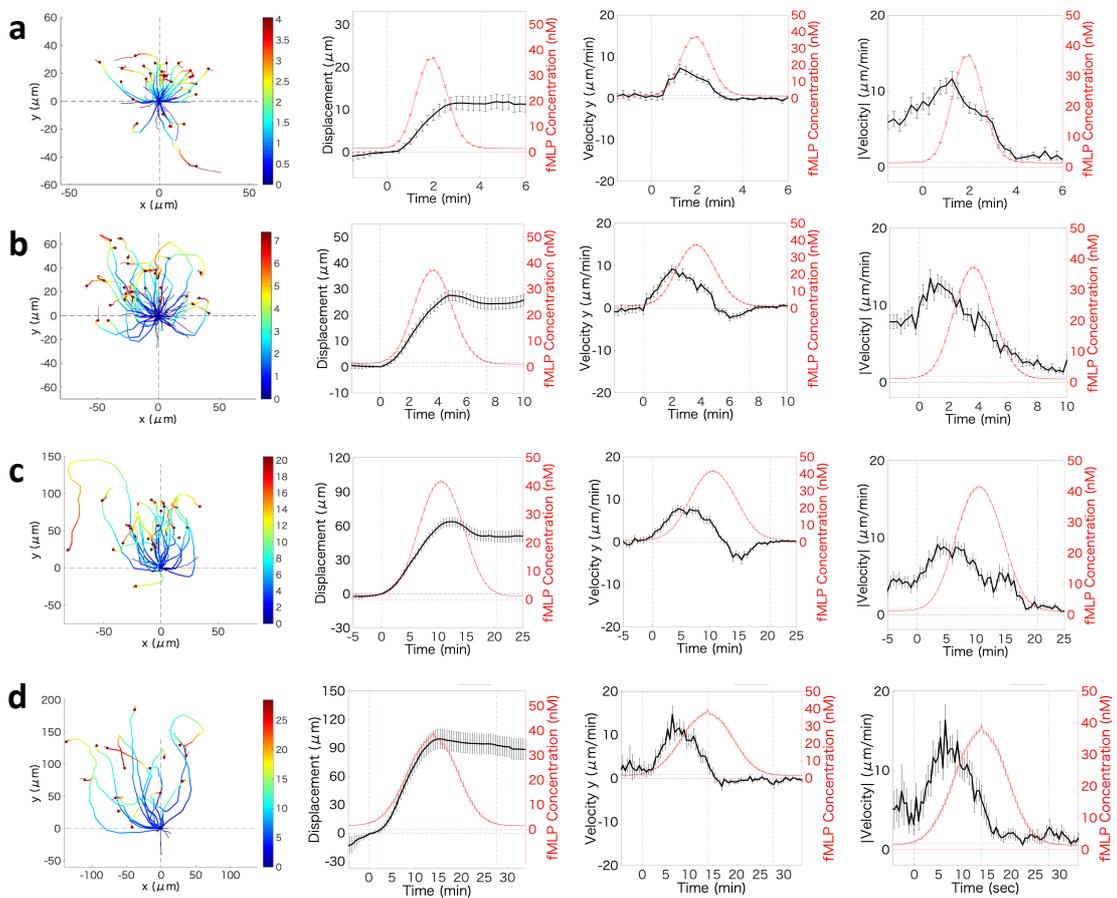


図 4-11 20  $\mu\text{M}$  Y27632 存在下における進行波刺激に対する細胞の走化性運動 (a, b, c はそれぞれ  $T_{\text{transit}} = 4, 7, 20, 28$  分の進行波刺激に対応)

(左端) 進行波刺激に対する xy 平面での細胞の軌跡。色は刺激投入からの経過時間 (分) を示す。青細線は刺激投入前の 1 分間の軌跡、茶細線は刺激終了後の 1 分間の軌跡を示す。時刻 0 を原点とした。(中央左) 進行波に向かう方向への重心の移動距離。(中央右) 進行波に向かう方向 (図中では y と記載) への重心運動の瞬間速度。(右端) 基質平面上での重心運動の瞬間速さ。両軸グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置における fMLP 濃度の時間変化を表す。サンプル数

は a, b, c, d の順に、n = 89, 96, 76, 20 細胞。エラーバーは標準誤差。

表 4-2 20  $\mu\text{M}$  Y27632 存在下における進行波刺激に対する細胞の走化性運動

Velocity ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	Wave Front			Wave Back		
	4 min	7 min	20 min	4 min	7 min	20 min
Control	5.5 ( $\pm 0.5$ )	9.6 ( $\pm 0.5$ )	8.1 ( $\pm 0.4$ )	2.0 ( $\pm 0.3$ )	5.3 ( $\pm 0.5$ )	7.3 ( $\pm 0.7$ )
Y-27632	4.3 ( $\pm 0.6$ )	6.4 ( $\pm 0.5$ )	5.8 ( $\pm 0.3$ )	0.7 ( $\pm 0.1$ )	1.5 ( $\pm 0.2$ )	1.7 ( $\pm 0.3$ )

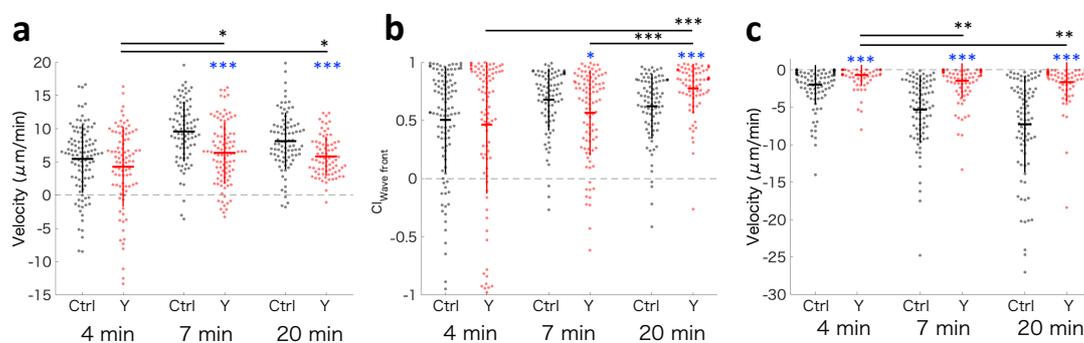


図 4-12 Y-27632(20  $\mu\text{M}$ )存在下での fMLP 進行波刺激に対する細胞の走化性運動。

(a) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(b) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の移動距離と平面上での細胞の総移動距離の比。(c) 進行波背面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(アステリクスはウェルチの t 検定により有意差があると判定されたことを示す。アステリクスの数に応じて、それぞれ以下の検定基準で有意差が認められたことを示す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。横方向の線分は平均値、縦方向の線分の長さは標準偏差を表す。)

#### 4.5. Rac1 阻害での fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動

先導端分子の Rac1 を選択的に阻害する低分子化合物 NSC23766 [Gao et al., 2004] 用い、fMLP 進行波刺激に対する走化性運動を測定した。NSC23766 は Rac1 を選択的に活性化するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF; guanine nucleotide exchange factor) である Tiam1 や TrioN と結合する分子として設計された。NSC23766 は Rho GTPase である Cdc42 や RhoA の活性を阻害しないことが確認されている。文献 [Gao et al., 2004] より NSC23766 と TrioN との結合定数は約 50  $\mu\text{M}$  である。

NSC23766 を終濃度 50  $\mu\text{M}$  となるように加え、fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性を測定した (図 4-13、図 4-14、表 4-3)。

$T_{\text{transit}} = 4$  分の進行波刺激に対して、細胞は進行波前面では高濃度側に 5.0 ( $\pm 0.9$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  の速さで移動し、これは薬剤処理なしの場合と有意な差はない。進行波背面では高濃度側への平均速度は 0.8 ( $\pm 0.2$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  であり、高濃度側への明確な移動は見られなかった。

$T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波刺激に対しては、細胞は進行波前面では高濃度側に平均 6.9 ( $\pm 0.7$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。進行波背面では細胞は高濃度側に平均 2.7 ( $\pm 0.5$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。これは薬剤処理なしの場合の 51% と小さかった。

$T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波に対しては、細胞は進行波前面では高濃度側に 9.1 ( $\pm 0.5$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  で移動し、薬剤処理の場合と有意差は認められなかった。進行波背面では高濃度側に平均 4.1 ( $\pm 0.5$ )  $\mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。これは薬剤処理なしの場合の 56% と小さいことが認められた。

以上をまとめると、Rac1 の阻害により、進行波前面における走化性に影響は認められなかった。進行波背面では、高濃度側への運動速度が約 40-56% に低下した。

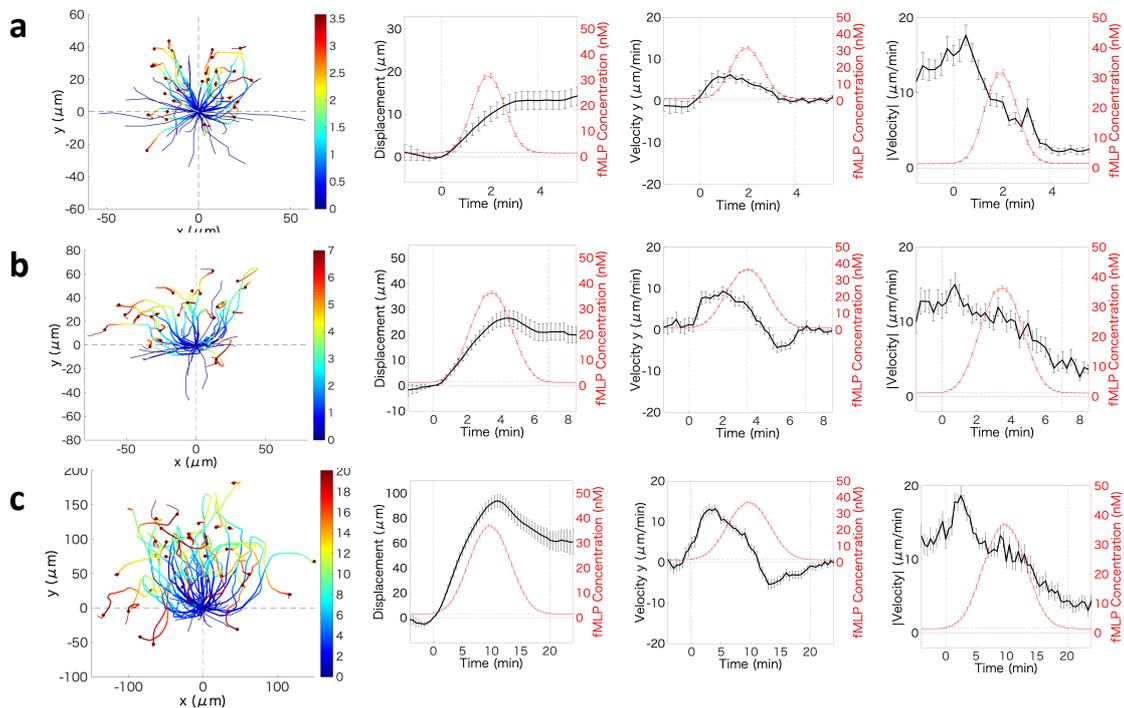
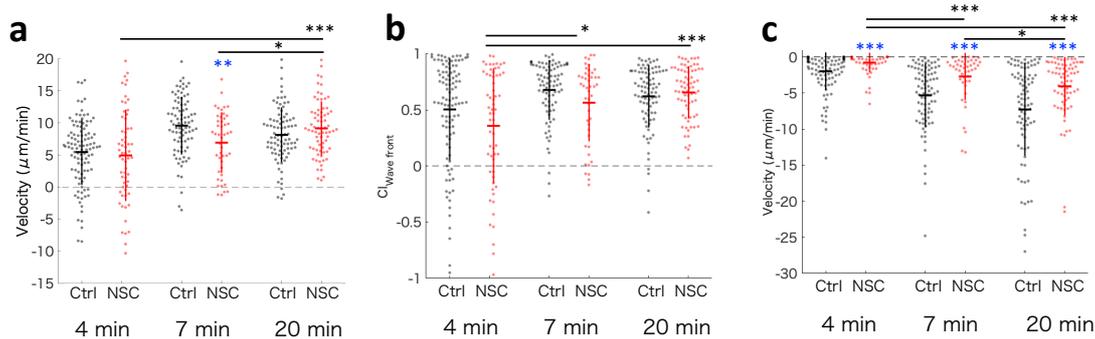


図 4-13 50  $\mu\text{M}$  NSC23766 存在下における進行波刺激に対する細胞の走化性運動(a, b, c はそれぞれ  $T_{\text{transit}} = 4, 7, 20$  分の進行波刺激に対応)

(左端) 進行波刺激に対する  $xy$  平面での細胞の軌跡。色は刺激投入からの経過時間(分)を示す。青細線は刺激投入前の1分間の軌跡、茶細線は刺激終了後の1分間の軌跡を示す。時刻 0 を原点とした。(中央左) 進行波に向かう方向への重心の移動距離。(中央右) 進行波に向かう方向(図中では  $y$  と記載)への重心運動の瞬間速度。(右端) 基質平面上での重心運動の瞬間速さ。両軸グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置における fMLP 濃度の時間変化を表す。サンプル数は a, b, c の順に、 $n = 62, 46, 72$  細胞。エラーバーは標準誤差。

表 4-3 50  $\mu\text{M}$  NSC23766 存在下における進行波刺激に対する細胞の走化性運動

Velocity ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	Wave Front			Wave Back		
	4 min	7 min	20 min	4 min	7 min	20 min
Control	5.5 ( $\pm 0.5$ )	9.6 ( $\pm 0.5$ )	8.1 ( $\pm 0.4$ )	2.0 ( $\pm 0.3$ )	5.3 ( $\pm 0.5$ )	7.3 ( $\pm 0.7$ )
NSC23766	5.0 ( $\pm 0.9$ )	6.9 ( $\pm 0.7$ )	9.1 ( $\pm 0.5$ )	0.8 ( $\pm 0.2$ )	2.7 ( $\pm 0.5$ )	4.1 ( $\pm 0.5$ )



**図 4-14** NSC23766(50  $\mu\text{M}$ )存在下での fMLP 進行波刺激に対する細胞の走化性運動。(a) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(b) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の移動距離と平面上での細胞の総移動距離の比。(c) 進行波背面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(アスタリスクはウェルチの t 検定により有意差があると判定されたことを示す。アスタリスクの数に応じて、それぞれ以下の検定基準で有意差が認められたことを示す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。横方向の線分は平均値、縦方向の線分の長さは標準偏差を表す。)

#### 4.6. PI3K 阻害での fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性運動

HL60 細胞の走化性において、先導端分子の 1 つである PI3K を選択的に阻害する低分子化合物 LY294002 [Vlahos et al.,1994] 用い、fMLP 進行波刺激に対する走化性運動を測定した。LY294002 は PI3K の ATP 結合サイトと結合することで、PI3K を阻害する。LY294002 と PI3K の結合定数は  $1.4 \mu\text{M}$  である [Vlahos et al., 1994]。100  $\mu\text{M}$  の LY294002 存在下で fMLP 依存的なアクチン重合が完全に阻害されることが報告されている [Vlahos et al., 1995]。

PI3K 阻害剤である LY294002 を 50  $\mu\text{M}$  となるように溶液に加え、fMLP 進行波刺激に対する HL60 細胞の走化性を測定した (図 4-15、図 4-16、表 4-4)。

$T_{\text{transit}} = 4$  分の進行波刺激に対して、細胞は進行波前面では高濃度側に  $6.7 (\pm 0.7) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さで移動し、薬剤処理なしの場合と有意差はなかった。進行波背面では高濃度側への平均速度は  $0.9 (\pm 0.2) \mu\text{m}/\text{min}$  であり、高濃度側への移動は見られなかった。

$T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波刺激に対しては、細胞は進行波前面では高濃度側に平均  $9.3 (\pm 0.7) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。進行波背面では細胞は高濃度側に平均  $3.1 (\pm 0.3) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。これは薬剤処理なしの場合の 58%と小さかった。

$T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波刺激に対しては、細胞は進行波前面では高濃度側に  $8.4 (\pm 0.8) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動し、薬剤処理の場合と有意差は認められなかった。進行波背面では高濃度側

に平均  $3.5 (\pm 0.6)$   $\mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。これは薬剤処理なしの場合の 48%と小さいことが認められた。

総じて、 $50 \mu\text{M}$  LY294002 存在下では、進行波前面における走化性運動速度について、薬剤なしの場合と比較して有意差は認められなかった。進行波背面では、薬剤なしの場合と比較して高濃度側への運動速度が低下することが 45-58%に低下することが認められた。

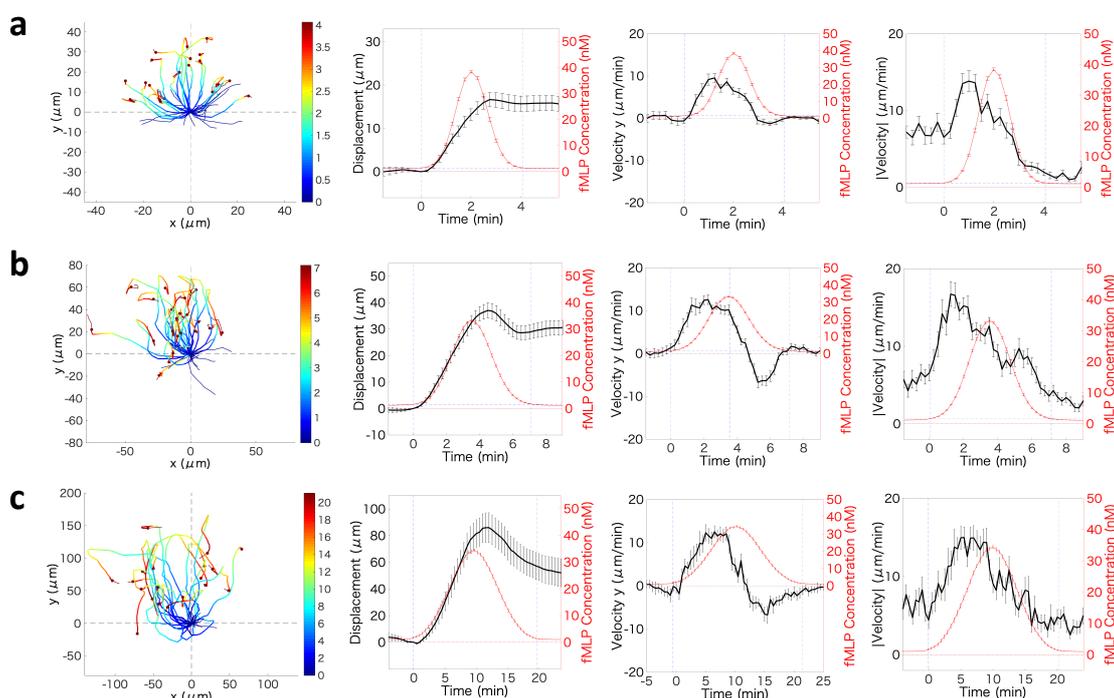


図 4-15  $50 \mu\text{M}$  LY294002 存在下における進行波刺激に対する細胞の走化性運動 (a, b, c はそれぞれ  $T_{\text{transit}} = 4, 7, 20$  分の進行波刺激に対応)

(左端) 進行波刺激に対する  $xy$  平面での細胞の軌跡。色は刺激投入からの経過時間 (分) を示す。青細線は刺激投入前の 1 分間の軌跡、茶細線は刺激終了後の 1 分間の軌跡を示す。時刻 0 を原点とした。(中央左) 進行波に向かう方向への重心の移動距離。(中央右) 進行波に向かう方向(図中では  $y$  と記載)への重心運動の瞬間速度。(右端) 基質平面上での重心運動の瞬間速度。両軸グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置における fMLP 濃度の時間変化を表す。サンプル数は a, b, c の順に、 $n = 43, 48, 20$  細胞。エラーバーは標準誤差。

表 4-4 50  $\mu\text{M}$  LY294002 存在下における進行波刺激に対する細胞の走化性運動

Velocity ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	Wave Front			Wave Back		
	4 min	7 min	20 min	4 min	7 min	20 min
Control	5.5 ( $\pm 0.5$ )	9.6 ( $\pm 0.5$ )	8.1 ( $\pm 0.4$ )	2.0 ( $\pm 0.3$ )	5.3 ( $\pm 0.5$ )	7.3 ( $\pm 0.7$ )
LY294002	6.7 ( $\pm 0.7$ )	9.3 ( $\pm 0.7$ )	8.4 ( $\pm 0.8$ )	0.9 ( $\pm 0.2$ )	3.1 ( $\pm 0.3$ )	3.5 ( $\pm 0.6$ )

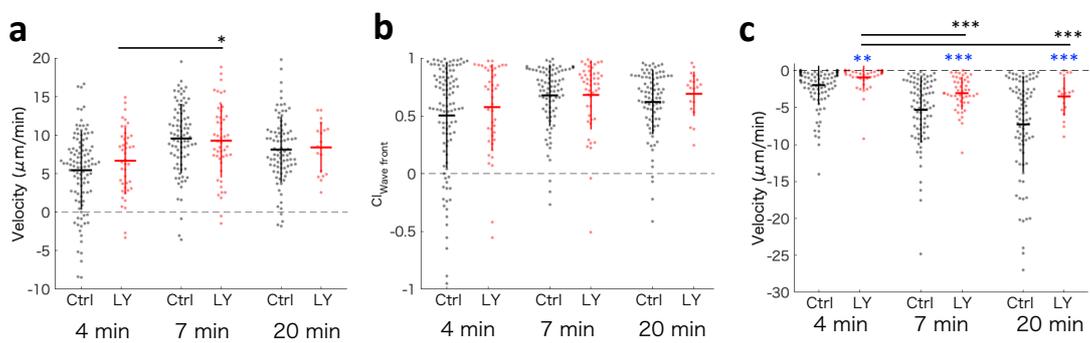


図 4-16 LY294002(50  $\mu\text{M}$ )存在下での fMLP 進行波刺激に対する細胞の走化性運動

(a) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(b) 進行波前面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の移動距離と平面上での細胞の総移動距離の比。(c) 進行波背面での fMLP 高濃度側に向かった細胞の平均速度。(アスタリスクはウェルチの t 検定により有意差があると判定されたことを示す。アスタリスクの数に応じて、それぞれ以下の検定基準で有意差が認められたことを示す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。横方向の線分は平均値、縦方向の線分の長さは標準偏差を表す。)

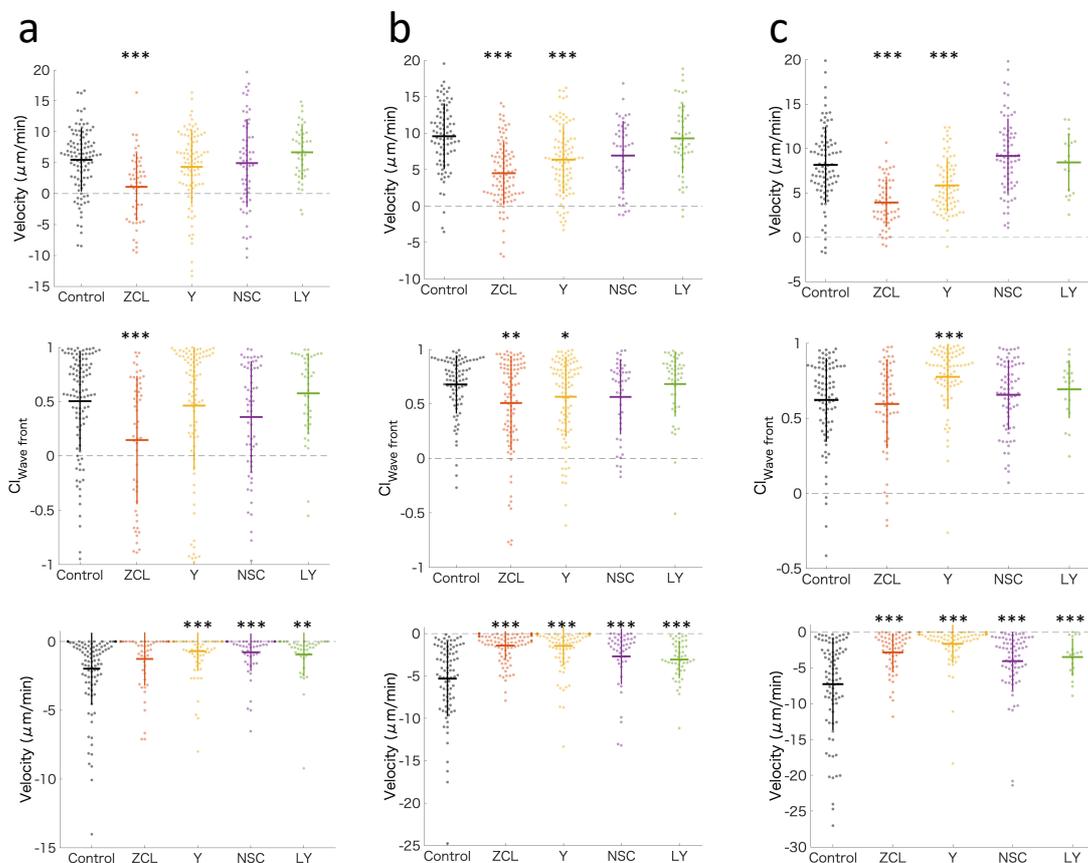


図 4-17 fMLP 進行波刺激に対する細胞の走化性運動。

a, b, c は  $T_{transit} = 4,7$  および 20 分の進行波刺激に対応。

進行波前面での平均移動速度(上段)。進行波前面での fMLP 高濃度側への移動距離と運動軌跡長さの比(中段)。進行波背面での fMLP 高濃度側への平均移動速度 (下段)。

各グラフの横軸は薬剤の種類を表す。Control: 薬剤なし、ZCL: 10  $\mu\text{M}$  ZCL278、Y: 20  $\mu\text{M}$  Y27632、NSC: 50  $\mu\text{M}$  NSC23766、LY: 50  $\mu\text{M}$  LY294002。

(検定にはウェルチの t 検定を用いた。アスタリスクは有意差のあることを示す。青のアスタリスクは同じ時間変化率の薬剤有無の条件で比較した場合の検定結果を示す。\*:  $p < 0.05$ 、\*\*:  $p < 0.01$ 、\*\*\*:  $p < 0.001$ 。横方向の線分は平均値、縦方向の線分の長さは標準偏差を表す。)

## 4.7. LTB4 進行波刺激に対する好中球様 HL60 細胞の走化性運動

### 4.7.1. LTB4 進行波刺激に対する重心運動

好中球は細菌から分泌されるフォルミルペプチド以外の化学物質に対しても走化性を示す。代表的なものとしては補体の C5a、脂質代謝産物のロイコトリエン B4(Leukotrien B4; LTB4、MW = 336.5)、間質細胞から分泌されリンパ球や好中球の遊走を誘起する SDF1(Stromal cell derived factor)があげられる [Gerard et al., 1991; Yokomizo et al., 1997; Feng et al., 1996]。上記の誘引分子に特異的に結合する G タンパク質共役型受容体 GPCR が同定されている。走化性に着目すると、fMLP と LTB4 の反対向きの勾配を逆向きに提示された場合に好中球は fMLP 濃度の高い方向に向かって移動することが報告されており [Byrne et al., 2014]、受容体に結合するヘテロ 3 量体 G タンパク質の違いによって、その下流の反応の量的・質的違いによって走化性応答特性に違いが生まれていると考えられる。また LTB4 は fMLP 刺激を受けた好中球や炎症反応に集合した好中球から分泌される二次誘引分子であり [Aforonso et al., 2012]、生体内の炎症部位に向かって集合する好中球の長距離移動に必要であることが報告されている [Lämmermann et al., 2013]。LTB4 は GPCR である BLT1 のリガンドであり、BLT1 との結合定数は  $K_d = 0.15 \text{ nM}$  であることが報告されている [Yokomizo et al., 1997]。本節では、G タンパク質共役受容体のリガンドであり、fMLP とは異なる走化性誘引分子に対する好中球の走化性を測定し、比較することによって、それぞれの誘引分子による走化性制御の特徴について示唆を得ることを目的とした。そこで、動的な LTB4 濃度勾配に対する好中球様 HL60 細胞の走化性運動の測定を行った。LTB4 進行波刺激における LTB4 濃度の下限は 0 M、上限は 2nM または 20 nM とした。

LTB4 濃度の上限が 20 nM の場合、 $T_{\text{transit}} = 4$  分の進行波刺激に対しては、細胞は進行波前面では、高濃度側に平均  $4.0 (\pm 1.8) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。進行波背面では、高濃度側への平均重心速度は  $-1.5 (\pm 1.6)$  であった (図 4-18 a)。 $T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波刺激に対しては、細胞は進行波前面では高濃度側に平均  $6.5 (\pm 0.8) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。進行波背面では、細胞は高濃度側に平均  $-1.7 (\pm 0.8) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動しており、進行波前面で一定方向への持続的運動が見られた (図 4-18 b)。 $T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波刺激に対しては、細胞は進行波前面では高濃度側に  $7.1 (\pm 1.3) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。進行波背面では高濃度側への平均重心速度は  $0.6 (\pm 1.5)$  であった (図 4-18 c)。

LTB4 濃度の上限が 2 nM の場合、 $T_{\text{transit}} = 4$  分の進行波刺激に対して、細胞は進行波前面では高濃度側に  $3.5 (\pm 1.7) \mu\text{m}/\text{min}$  の速さで移動した。進行波背面での高濃度側への平均速度は  $-0.6 (\pm 1.1) \mu\text{m}/\text{min}$  であり、平均として勾配方向の偏重を受けた運動は見られなかった。個々の細胞については刺激前の運動方向に運動を続けることが観察された (図

4-18 d)。  $T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波刺激に対しては、細胞は進行波前面では高濃度側に平均  $7.6 (\pm 1.7) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。進行波背面では細胞は高濃度側に平均  $-3.5 (\pm 1.1) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動しており、進行波前面での運動方向への継続した運動が見られた (図 4-18 e)。  $T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波刺激に対しては、細胞は進行波前面では、高濃度側に平均  $4.7 (\pm 0.8) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した。進行波背面では、細胞は高濃度側に平均  $4.4 (\pm 1.1) \mu\text{m}/\text{min}$  で移動した (図 4-18 f)。  $T_{\text{transit}} = 7$  分の結果に着目すると、fMLP 進行波刺激に対して、細胞が勾配反転に伴って運動方向を変えること (図 4-1, b) と対照的である。

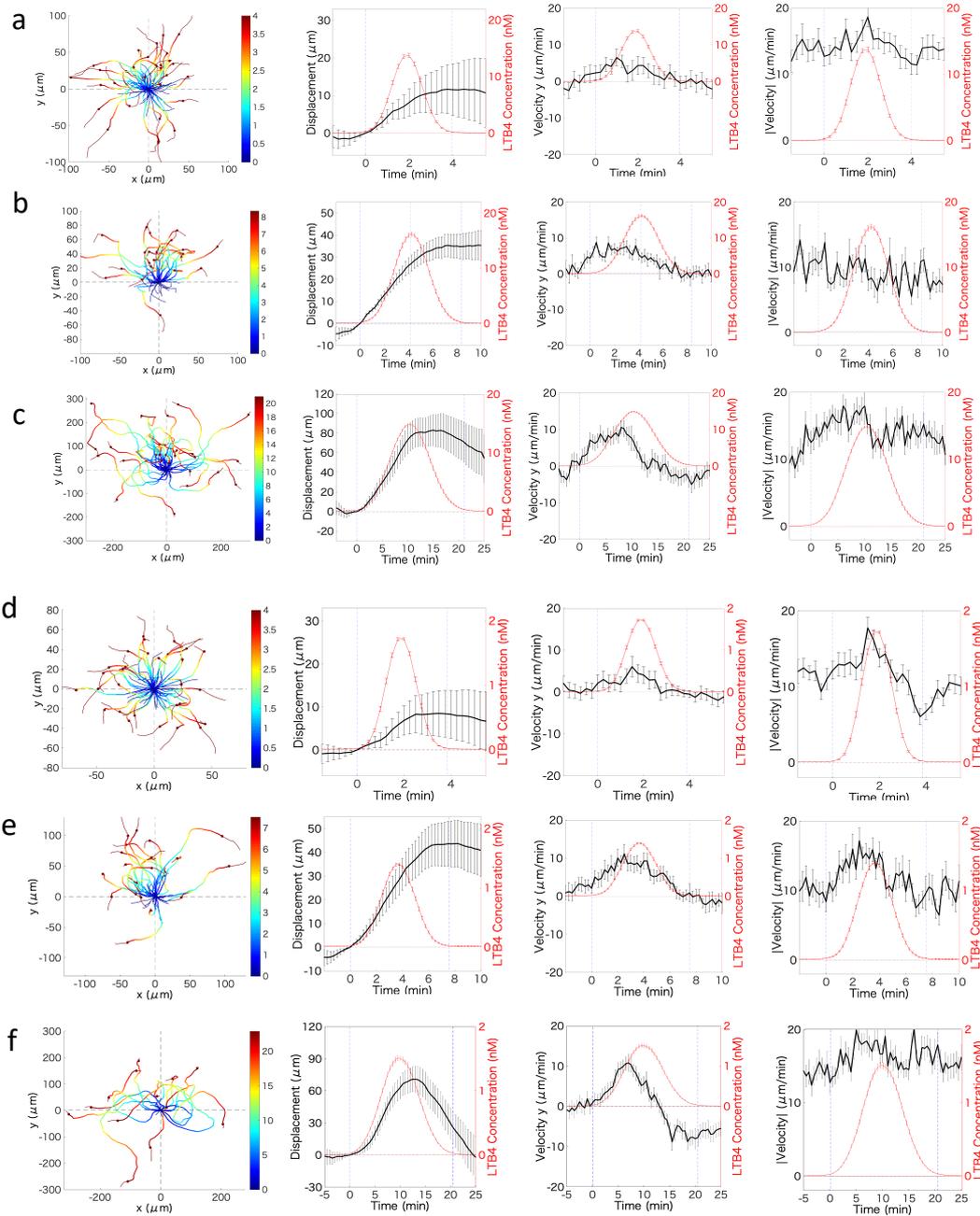


図 4-18 LTB4 進行波刺激に対する細胞の走化性運動

a, b, c は LTB4 の最大濃度が 20 nM の場合であり、d, e, f は LTB4 の最大濃度が 2 nM の場合である。a-f はそれぞれ  $T_{transit} = 4, 7, 20, 4, 7, 20$  分の進行波刺激に対応する。

(左端) 進行波刺激に対する xy 平面での細胞の軌跡。色は刺激投入からの経過時間 (分) を示す。青細線は刺激投入前の 1 分間の軌跡、茶細線は刺激終了後の 1 分間の軌跡を示す。時刻 0 を原点とした。(中央左) 進行波に向かう方向への重心の移動距離。(中央右) 進行波に向かう方向(図中では y と記載)への重心運動の瞬間速度。(右端) 基質平面上での重心運動の瞬間速さ。両軸グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置における LTB4 濃度の時間

変化を表す。エラーバーは標準誤差。サンプル数は a, b, c, d, e, f の順に、n = 31, 22, 28, 30, 22, 50 細胞。

表 4-5 LTB4 進行波刺激に対する細胞の走化性運動

Velocity ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	Wave Front			Wave Back		
	4 min	7 min	20 min	4 min	7 min	20 min
fMLP	5.5 ( $\pm 0.5$ )	9.6 ( $\pm 0.5$ )	8.1 ( $\pm 0.4$ )	0.4 ( $\pm 0.3$ )	2.4 ( $\pm 0.5$ )	5.4 ( $\pm 0.7$ )
LTB4(2nM)	3.5 ( $\pm 1.7$ )	7.6 ( $\pm 1.7$ )	4.7 ( $\pm 0.8$ )	-0.7 ( $\pm 1.1$ )	-3.5 ( $\pm 1.2$ )	4.4 ( $\pm 1.1$ )
LTB4(20nM)	4.0 ( $\pm 1.8$ )	6.5 ( $\pm 0.8$ )	7.1 ( $\pm 1.4$ )	-1.5 ( $\pm 1.7$ )	-1.8 ( $\pm 0.8$ )	0.7 ( $\pm 1.5$ )

#### 4.7.2. 濃度反転した LTB4 進行波刺激に対する細胞の走化性運動

濃度反転した LTB4 進行波刺激に対して、細胞は濃度が時間的に減少する勾配下では高濃度側への移動を示さなかったが、濃度が時間的に増加する勾配下では高濃度側への移動を示した(図 4-19 b)。

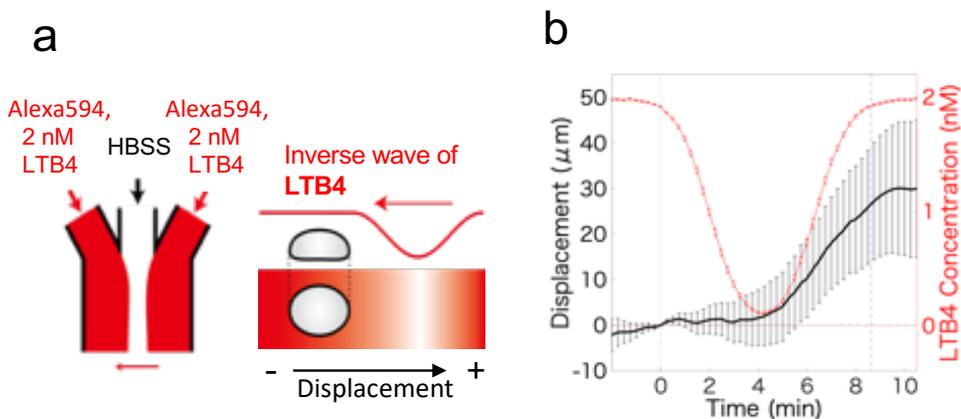


図 4-19 谷型の LTB4 進行波刺激への細胞の走化性運動

(a) 谷型の LTB4 進行波刺激を形成する場合の送液方法および細胞が受ける谷型進行波の模式図 (b) 谷型の LTB4 進行波刺激に対する細胞の重心の移動距離。LTB4 濃度が時間的に減少する勾配場においては高濃度側への移動は見られなかったが、濃度が時間的に増加する勾配場においては高濃度側への移動が確認された。(変位の符号はパネル a の右向きを正とする) グラフ中の赤線(縦軸右)は細胞の重心位置での LTB4 濃度の時間変化を表す。サンプル数は n = 23 細胞。エラーバーは標準誤差。



## 5. 結果：空間的に伝搬する誘引分子 fMLP 勾配刺激に対する HL60 細胞の走化性応答

### 5.1. はじめに

細胞が方向性運動を行う場合、先導端の伸長または後端の収縮を制御する分子活性が空間的に非対称に分布する。一方、細胞が運動極性を持たない場合は、先導端伸長と後端収縮を制御する分子のいずれもが一様に活性あるいは不活性状態をとる。好中球においては、細胞の前方でのアクチン重合・膜伸長を Ras, PI3K, Rac および Cdc42 の活性化が促進することが報告されている。ここでは、上記のうち PI3K および Cdc42 活性の可視化プローブを用いて、fMLP 進行波刺激に対する PI3K、Cdc42 活性および膜伸長の時間空間的な対応関係を蛍光顕微鏡を用いた生細胞イメージングによって測定することとした。

### 5.2. 時空間的に伝搬する誘引分子勾配に対する PI3K 動態

動的な fMLP 濃度勾配における細胞の走化性運動におけるシグナルの情報処理について調べるために、好中球で代表的な先導端分子である PI3K [Servant et al., 2000] の動態の生細胞観察を行った。PI3K 活性は PI3K によって生成されるフォスファチジルイノシトール 3 リン酸に結合する Akt の PH ドメインをプローブ [Meili et al., 1999] として用いた。Akt-PH と蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質を恒常的に発現する HL60 細胞株を作製し、Akt-PH-GFP の細胞内での動態を共焦点蛍光顕微鏡を用いて測定した。焦点面は細胞-基質接着面から 2-3  $\mu\text{m}$  離れた位置とした。

$T_{\text{transit}} = 1$  分の進行波刺激に対して、Akt-PH-Clover の細胞膜全体への移行が観察された。つまり特定の領域への PIP3 の局在は観察されなかった (図 5-1, a)。

$T_{\text{transit}} = 4$  分の進行波刺激に対して、Akt-PH-Clover の動態を観察したところ、進行波前面では高濃度側への Akt-PH-Clover の局在が観察された。しかし、進行波背面では Akt-PH-Clover の膜上への局在は見られず、細胞質中に一様に分布していることが観察された (図 5-1, b)。

$T_{\text{transit}} = 7, 20$  分の進行波刺激に対して Akt-PH-Clover の動態を観察したところ、進行波前面では、高濃度側への Akt-PH-Clover の局在が観察された。誘引分子濃度が最も高くなる地点 (進行波の極大点) では Akt-PH-Clover はより一様に細胞膜に分布した。進行波背面では、濃度勾配が反転した直後に Akt-PH-Clover の局在は確認されなかったが、細胞の形態変化が観察された。その後、fMLP 濃度が約 20 nM まで低下した時点で高濃度側への Akt-PH-Clover の局在が確認された (図 5-1, c)。20 分間で通過する進行波刺激に対して、細胞は先導端と後端の構造を維持したまま滑らかに方向転換する様子 (U ターン) が観察

され、Akt-PH-Clover の持続的な局在が観察された(図 5-2)。

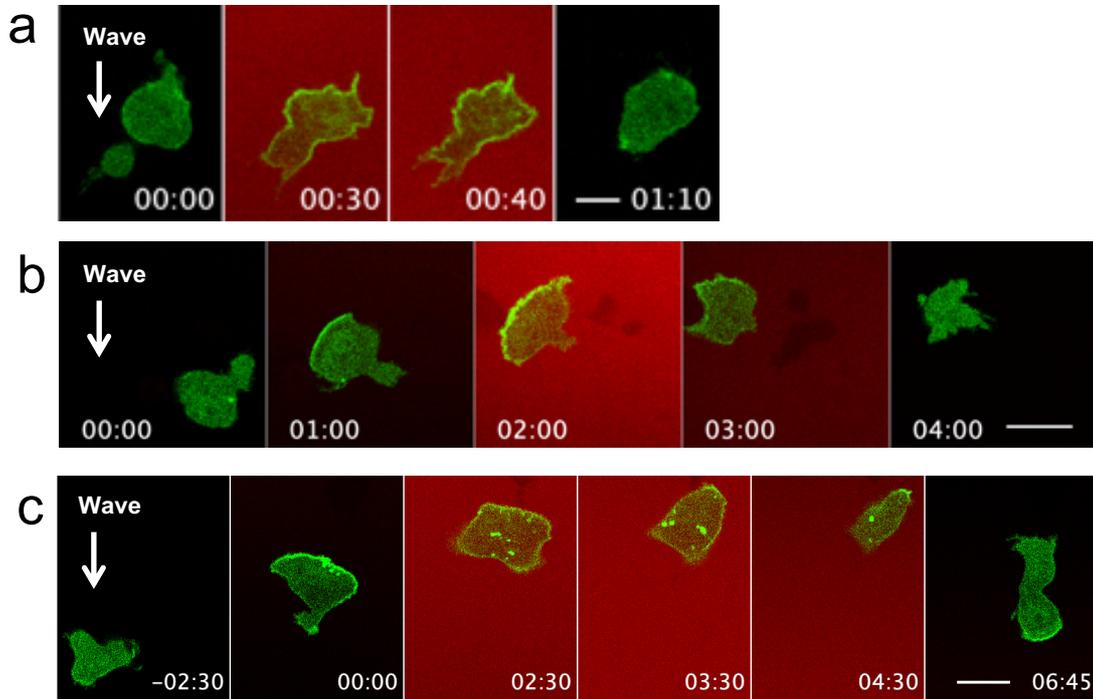


図 5-1 進行波刺激に対する Akt-PH-Clover の動態. パネル内の時間の単位は (分:秒) であり、時刻 00:00 は進行波刺激の開始に対応。

レーザー共焦点蛍光観察(観察面はガラス底面から 2-3  $\mu\text{m}$  の高さに設定した)により取得した Akt-PH-Clover 蛍光画像(緑)および fMLP 濃度推定に用いる Alexa594 蛍光画像(赤)を重ね合わせた画像である(疑似カラー)。

(a)  $T_{\text{transit}} = 1$  分の fMLP 進行波に対して、刺激の頂点で膜上への等方的な局在が見られた。(b)  $T_{\text{transit}} = 4$  分の fMLP 進行波に対しては、刺激前の進行方向(左向き)の膜上への局在が見られるものの、濃度が時間増加する間には高濃度側への Akt-PH-Clover の局在が観察された(時刻 01:00)。一方、濃度が時間減少する間には局在は観察されなかった(時刻 03:00, 04:00)。(c)  $T_{\text{transit}} = 7$  分の fMLP 進行波に対しては、濃度が時間増加する間には高濃度側への Akt-PH-Clover の局在が観察された。進行波の頂点付近(時刻 02:30, 03:30, 04:30 では)では勾配方向への明確な局在は見られなかった。濃度が時間減少する間には再び高濃度側への Akt-PH-Clover の局在が観察された。(スケールバー a: 10  $\mu\text{m}$ , b, c: 20  $\mu\text{m}$ )

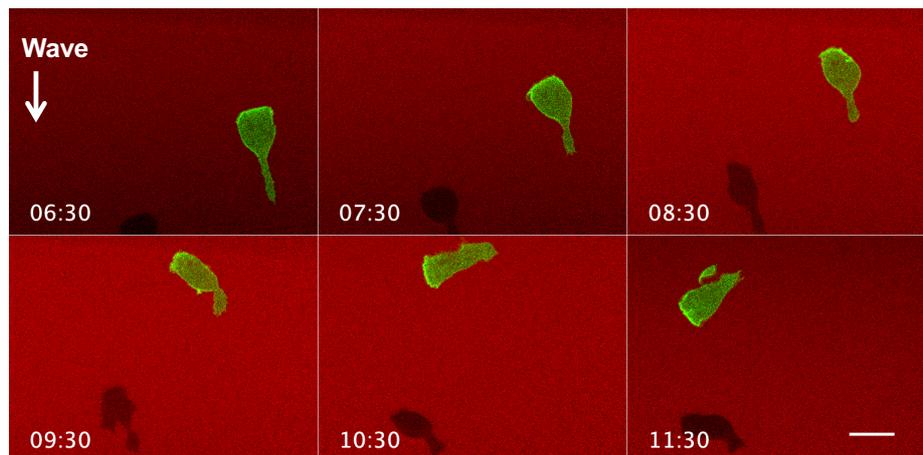


図 5-2  $T_{transit} = 20$  分の fMLP 進行波の頂点付近での細胞の運動と Akt-PH の局在。進行波の頂点付近で細胞は運動を続けるが先導端への Akt-PH-Clover の局在が明確でなくなり(時刻 09:30)、進行波の後ろ側にさしかかるにつれて勾配方向への Akt-PH-Clover の局在が明確に見られるようになった(時刻 10:30 以降)。時刻 0 は fMLP 進行波刺激の投入時刻に対応。(スケールバー 20  $\mu\text{m}$ )

### 5.3. 時空間的に伝搬する誘引分子勾配に対する Cdc42 動態

次に、膜伸長ともっとも連動性が高い先導端分子[Yang et al., 2016]である Cdc42 の活性動態を解析した。Cdc42 活性の測定には FRET プローブ (RaichuCdc42) [Itoh et al., 2003; Komatsu et al., 2012]を用いた。この FRET プローブは、N 末から C 末に向かって黄色蛍光タンパク質である YPET、PAK1 の CRIB (Cdc42 and Rac Interactive Binding domain) ドメイン(hPAK1 aa 68-150)、アミノ酸リンカー(Ser-Ala-Gly-Gly の繰り返しの 116 アミノ酸)、Cdc42(aa 2-176)、シアン蛍光タンパク質である mTurquoiseGL(CFP)および KRas の C 末 169-188 アミノ酸を連結した融合タンパク質である[Komatsu et al., 2012]。分子内の Cdc42 が活性化されると、そのエフェクター分子の PAKCRIB と結合し、YFP と CFP が物理的に近接することによって蛍光分子間での励起エネルギーの授受が行われ (FRET)、445 nm の励起に対して CFP 蛍光が低下し YFP 蛍光が上昇することにより、融合タンパク質の発する蛍光スペクトルが長波長側に変化する特徴を持つプローブである。

$T_{transit} = 1$  分の進行波刺激に対して、細胞全体で一様な活性化が観察された(図 5-3 a,d)。細胞によっては、それまでの後端であった領域で Cdc42 の上昇が小さいことが観察された(図 5-3 e, h)。

$T_{transit} = 4$  分の進行波刺激に対して、進行波前面では高濃度側での Cdc42 活性化が確認さ

れた。一方で進行波背面では、Cdc42 活性が一様に低下し、Cdc42 活性が局所的に上昇する領域は確認されなかった(図 5-4 a, d)。運動極性を持つ細胞においては、fMLP 進行波刺激に投入に伴って、細胞の前方広範囲の領域で Cdc42 活性が上昇することと膜伸長速度が低下することが観察された。また進行波通過後に、Cdc42 活性が fMLP 進行波刺激以前よりも低下することが多く観察された(図 5-4 e, h)。

$T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波刺激に対しては、進行波前面では高濃度側での Cdc42 の活性化が確認された。進行波背面では、仮足を高濃度側に向かって膜伸長する細胞と(図 5-5 a, d)、広範囲に Cdc42 活性が低下し運動を停止する細胞と、高濃度側に向かって膜伸長を起こす細胞が観察された(図 5-5 e, h)。

$T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波刺激に対して進行波前面では、Cdc42 活性が先端端を中心に広範囲に上昇したのち、部分的に活性が低下し、Cdc42 活性の高い領域と低い領域が生じ、Cdc42 活性化が高い方向に向かって膜伸長が見られた。進行波背面においても、高濃度側への Cdc42 の局所的な活性化と膜伸長が観察された(図 5-6 a, d、図 5-6 e, h)。

重心を通る進行波の伝搬方向に垂直な直線で細胞を 2 つの半球(Front, Rear)に分割し、各半球における fMLP 進行波刺激に対する Cdc42 活性動態の定量を図 5-7 a に基づいて行なった。 $T_{\text{transit}} = 4$  分の進行波に対しては、進行波前面( $t = 0-2$  分)にて  $I_{\text{Front}}$  が上昇し  $I_{\text{Rear}}$  を上回り、進行波背面( $t = 2-4$  分)では Front, Rear のシグナルが進行波刺激以前( $t = 0$  分以前)よりも低下し、再び上昇した。 $T_{\text{transit}} = 7$  分の進行波に対しては、進行波前面( $t = 0-3.5$  分)にて  $I_{\text{Front}}$  が  $I_{\text{Rear}}$  を上回り、進行波背面( $t = 3.5-7$  分)で、 $I_{\text{Front}}$  が低下し、 $I_{\text{Rear}}$  との差が小さくなり、平均値では  $I_{\text{Rear}}$  が  $I_{\text{Front}}$  を上回ることが見られた( $t = 7$  分)。 $T_{\text{transit}} = 20$  分の進行波刺激に対しては、進行波前面・背面での  $I_{\text{Front}}$  および  $I_{\text{Rear}}$  の明確な差は見られなかった。

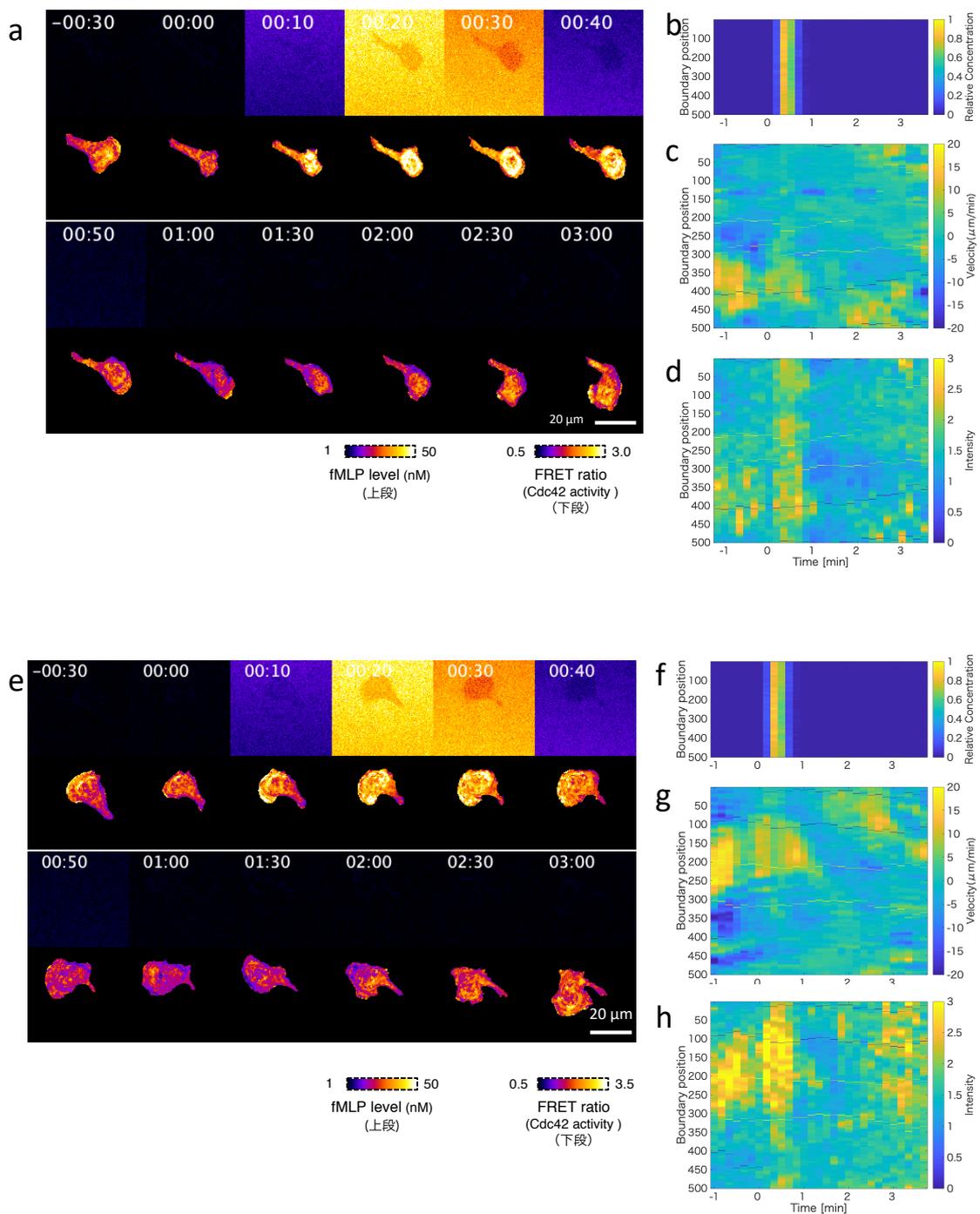
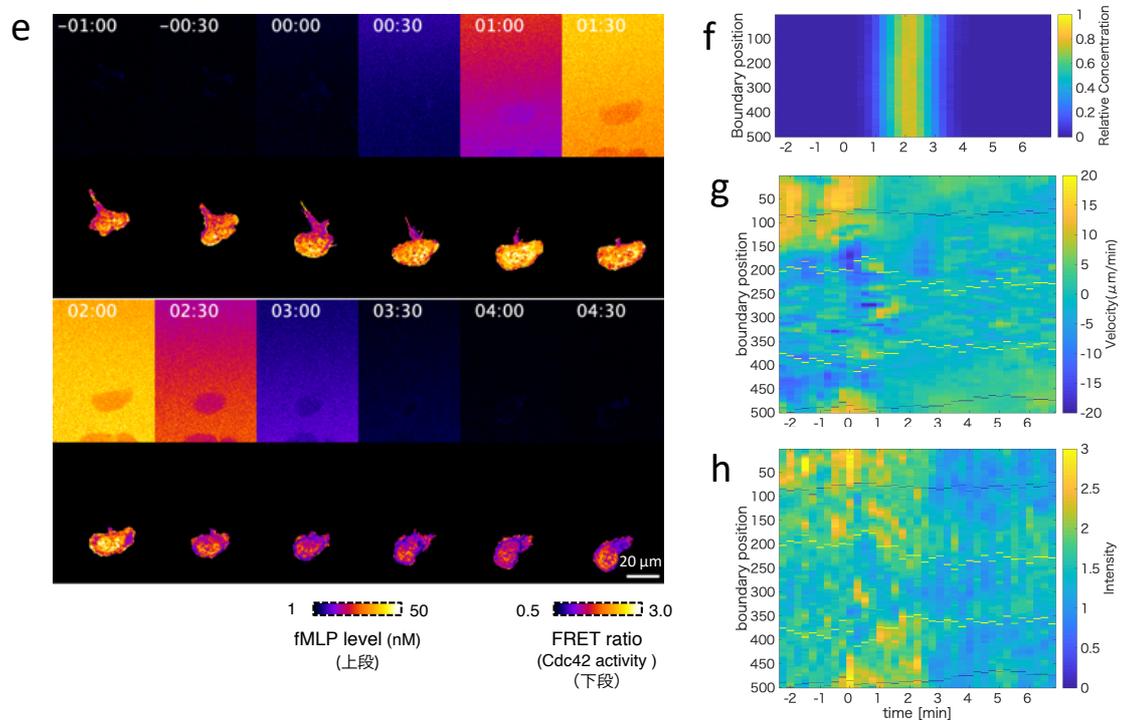
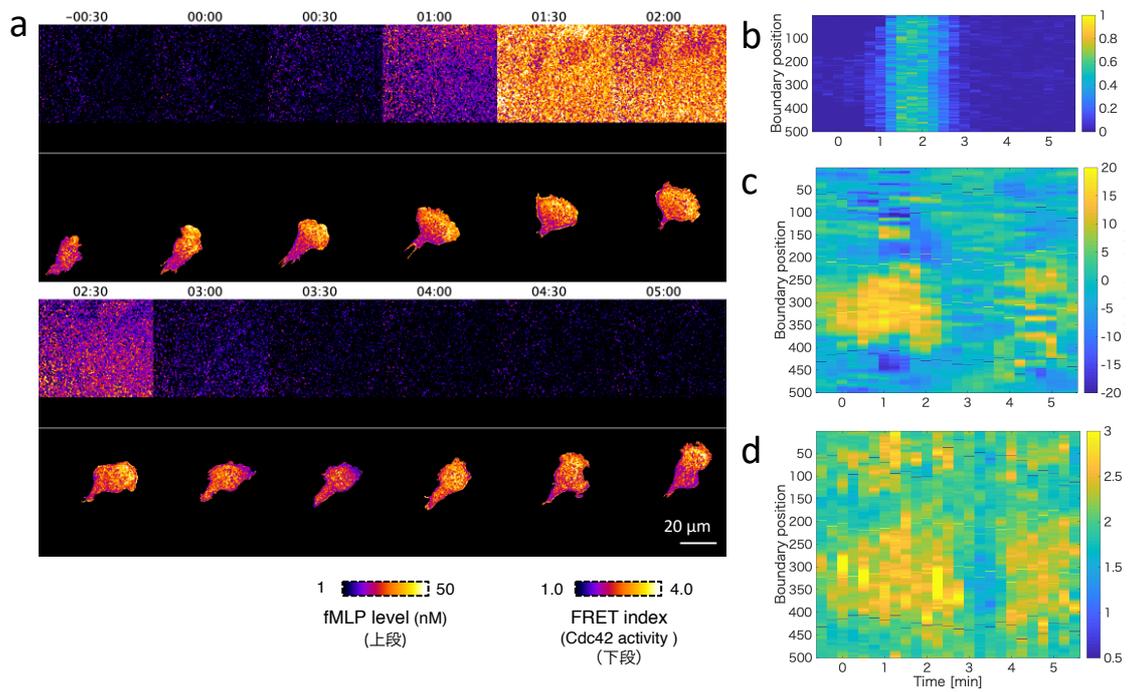


図 5-3 fMLP 進行波刺激 ( $T_{transit} = 1$  分) に対する Cdc42 活性の動態

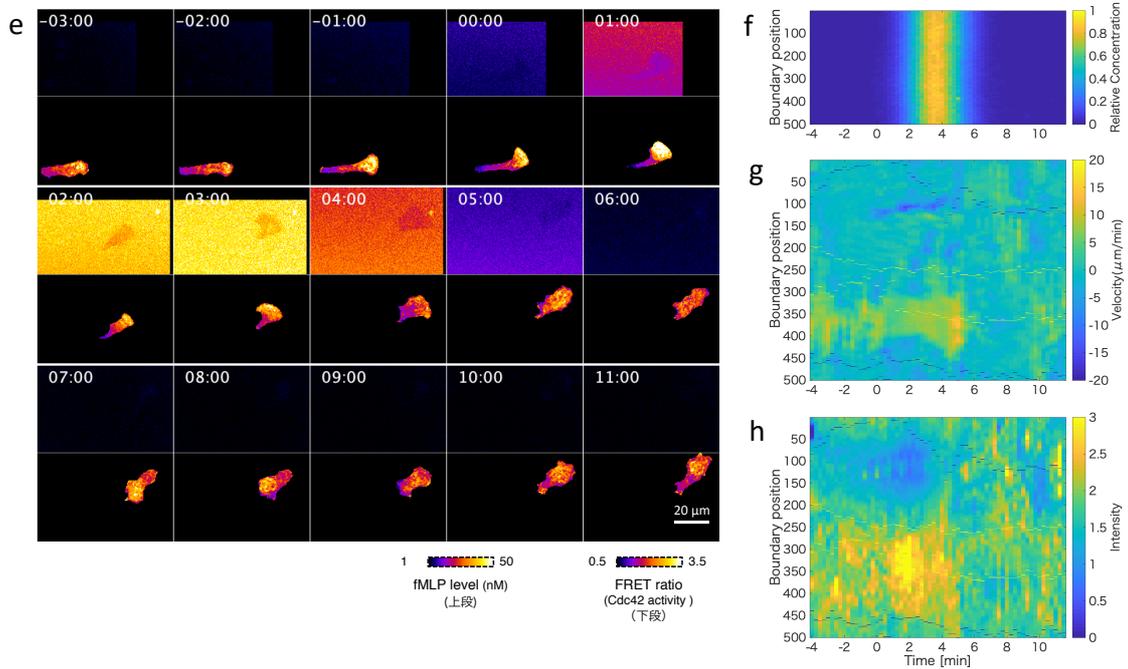
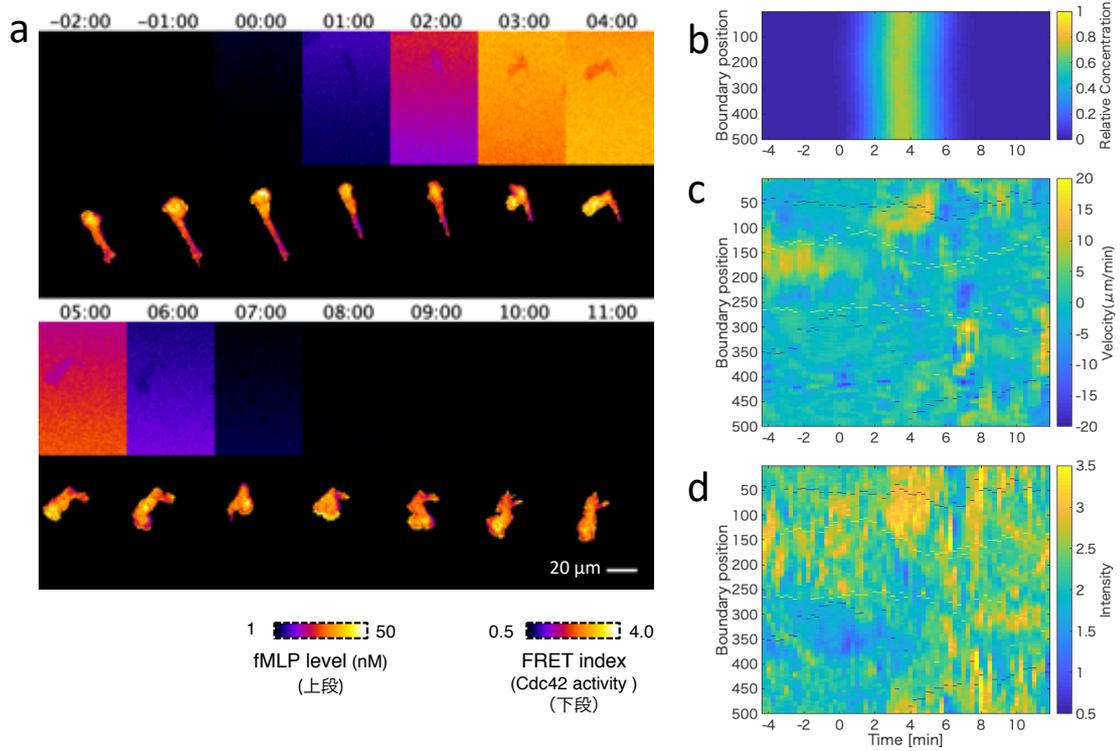
(a,e) fMLP 濃度の指示薬としての Alexa594 の蛍光画像(上段)と細胞領域での RaichuCdc42 プローブの FRET 比 (いずれも疑似カラー)。 (b,f) 細胞端の近傍外側での fMLP の局所濃度。 (c,g) 細胞膜の各分割領域における伸長・収縮速度の時間変化。 (d,h) 細胞膜の各分割領域における Cdc42 活性(FRET ratio)の時間変化。最初の時刻における重心直上にある膜分割領域は境界位置 250 に対応する。 a-d, e-h は異なる細胞サンプルの結果。



**図 5-4** fMLP 進行波刺激 ( $T_{transit} = 4$  分) に対する Cdc42 活性の動態

(a,e) fMLP 濃度の指示薬としての Alexa594 の蛍光画像(上段)と細胞領域での RaichuCdc42 プローブの FRET 比 (いずれも疑似カラー)。 (b,f) 細胞端の近傍外側での fMLP の局所濃度。 (c,g) 細胞膜の各分割領域における伸長・収縮速度の時間変化。 (d,h) 細胞膜の各分割領域における Cdc42 活性(FRET ratio)の時間変化。最初の時刻における重心直上にある膜分割領域は境界位置 250 に対応する。 a-d, e-h は異なる細胞サンプルの結果。

(a) 高濃度側への運動と Cdc42 活性化(00:00 - 02:00)、膜伸長の停止と Cdc42 活性の低下(02:00 - 04:00)、Cdc42 活性が再び上昇すること(04:00 以降)が観察された。(e)運動速度が低下し、細胞の進行方向前側を中心に Cdc42 活性が上昇し(00:00-02:00)、Cdc42 活性が広域に低下した(02:00 以降)。



**図 5-5** fMLP 進行波刺激 ( $T_{transit} = 7$  分) に対する Cdc42 活性の動態

(a,e) fMLP 濃度の指示薬としての Alexa594 の蛍光画像(上段)と細胞領域での RaichuCdc42 プローブの FRET 比 (いずれも疑似カラー)。 (b,f) 細胞端の近傍外側での fMLP の局所濃度。 (c,g) 細胞膜の各分割領域における伸長・収縮速度の時間変化。 (d,h) 細胞膜の各分割領域における Cdc42 活性(FRET ratio)の時間変化。最初の時刻における重心直上にある膜分割領域は境界位置 250 に対応する。 a-d, e-h は異なる細胞サンプルの結果。

(a)高濃度側への移動と Cdc42 活性化が観察された(00:00-03:30)。続いて、それまでの先導端付近から Cdc42 活性の高い仮足を高濃度側に向かった伸張が見られた(03:30-07:00)。 (e) 濃度増加を伴う勾配において高濃度側への運動と Cdc42 の活性化が観察された。濃度減少を伴う勾配においては、1 分程度(03:30-04:30)それまでの運動方向への運動と Cdc42 活性の持続が認められた。

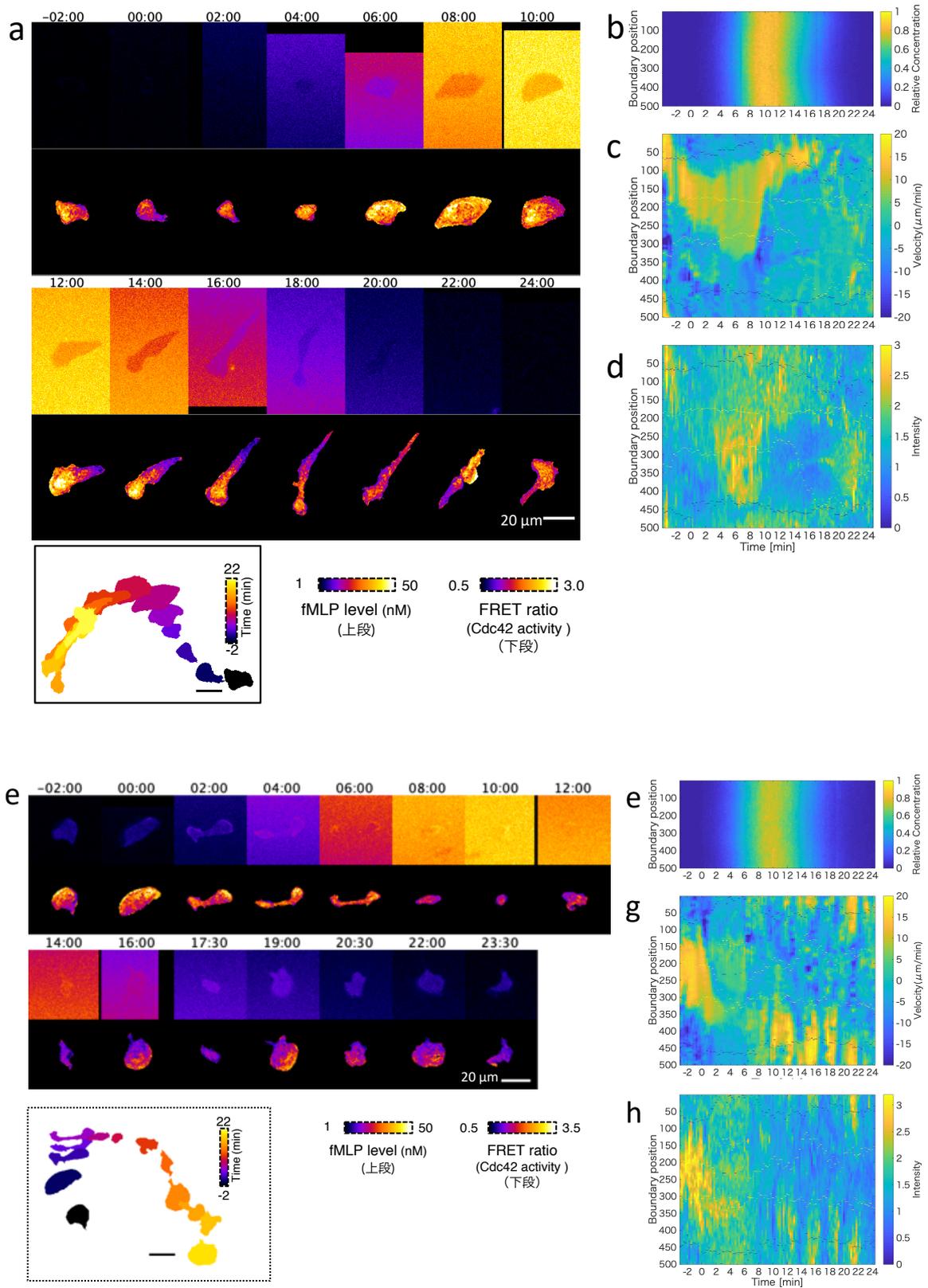


図 5-6 fMLP 進行波刺激 ( $T_{transit} = 20$  分) に対する Cdc42 活性の動態。

a,e) fMLP 濃度の指示薬としての Alexa594 の蛍光画像(上段)と細胞領域での RaichuCdc42 プローブの FRET 比 (いずれも疑似カラー)。 (b,f) 細胞端の近傍外側での fMLP の局所濃度。 (c,g) 細胞膜の各分割領域における伸長・収縮速度の時間変化。 (d,h) 細胞膜の各分割領域における Cdc42 活性(FRET ratio)の時間変化。最初の時刻における重心直上にある膜分割領域は境界位置 250 に対応する。 a-d, e-h は異なる細胞サンプルの結果。

(a)濃度増加する勾配において高濃度側への運動と Cdc42 の活性化が観察された。濃度増加に伴い接着面積と先導端の中心角が大きくなることが観察された。fMLP 濃度が高くなると(08 : 00-)、広範囲にわたり Cdc42 活性化が見られ、部分的に活性が低下し、Cdc42 活性の空間的な差異が生じ、活性の高い方向へ膜伸長し、fMLP 高濃度側に向かって運動した。(e) fMLP 濃度勾配刺激を受け細胞の運動速度が低下し、先導端の中央の伸長が遅くなり、両端で伸長を続け、先導端が接着面から離れ、接着面積が小さくなることが観察された。濃度減少を伴う勾配では高濃度側に断続的に伸長することが観察された。

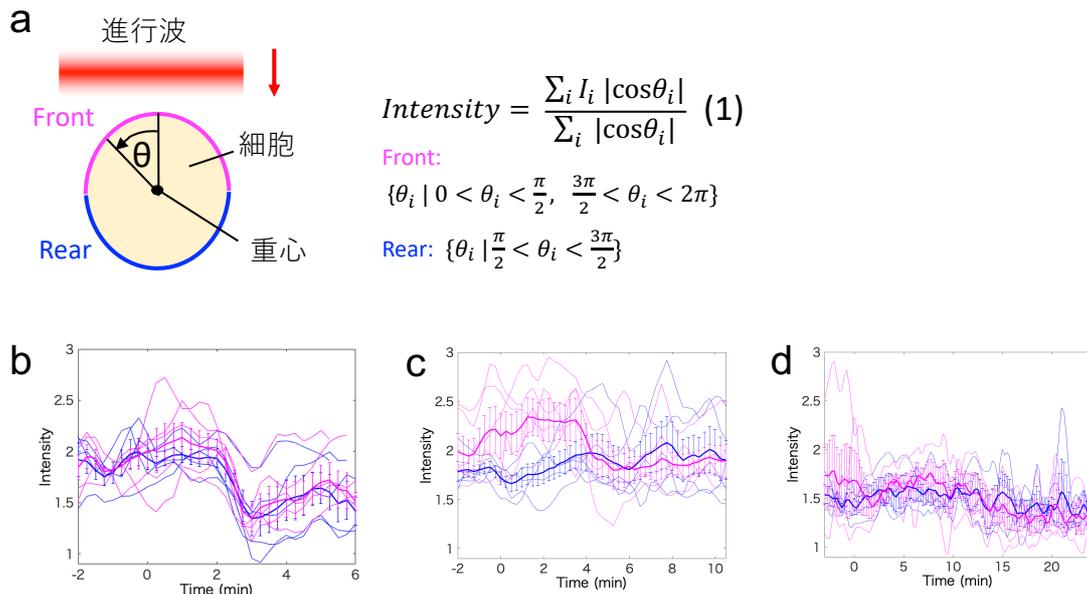


図 5-7 fMLP 進行波刺激に対する Cdc42 活性化応答の定量

(a) 重心から+y 方向に引いた半直線と重心から膜分割を結ぶ線分のなす角  $\theta$  を定め、 $\theta$  に応じて膜上のシグナルを図中(1)式に基づいて算出した。 $0 < \theta < \pi/2$  および  $3\pi/2 < \theta < 2\pi$  の領域での値を  $I_{\text{Front}}$ 、 $\pi/2 < \theta < 3\pi/2$  の領域での値を  $I_{\text{Rear}}$  と呼ぶ。(b-d) 通過時間 4,7,20 分の fMLP 進行波刺激に対する Cdc42 活性化応答における  $I_{\text{Front}}$  (マゼンタ)、 $I_{\text{Rear}}$  (青) の時間変化。細線は各細胞、太線は平均値の時系列を表し、誤差範囲は標準誤差を表す。(サンプル数は通過時間 4,7 および 20 分の進行波刺激について  $n = 5, 5$  および 4 細胞)

#### 5.4. ROCK 阻害での fMLP 伝搬波に対する先導端分子 Cdc42 の応答

Y-27632 存在下において fMLP 進行波に対する走化性は、fMLP 濃度減少の時間スケールが遅い場合であっても、明確に低下することが観察された (図 4-11)。そこで、Cdc42 活性と運動性に関するさらなる知見を得るために、RaichuCdc42 発現株を用い、Y27632 存在下の fMLP 進行波に対する Cdc42 の活性動態を測定した。

$T_{transit} = 4$  分の進行波刺激に対して、進行波前面では高濃度側・低濃度側で Cdc42 活性の上昇が見られた。進行波背面では、Cdc42 活性が低下し始め、活性の低下する速さに空間的な分布の偏りは確認されなかった (図 5-8)。

$T_{transit} = 7$  分の進行波刺激に対して、進行波前面では Cdc42 活性の fMLP 高濃度側への局在が観察された。進行波背面では、先導端における Cdc42 活性が低下し、細胞周縁での Cdc42 活性の差異がほとんど消失した (図 5-9)。

$T_{transit} = 20$  分の進行波刺激に対して、進行波前面では高濃度側で活性が上昇し維持されていた。進行波背面では、細胞全体で Cdc42 活性が低下し空間分布の非対称性は観察されなかった (図 5-10)。

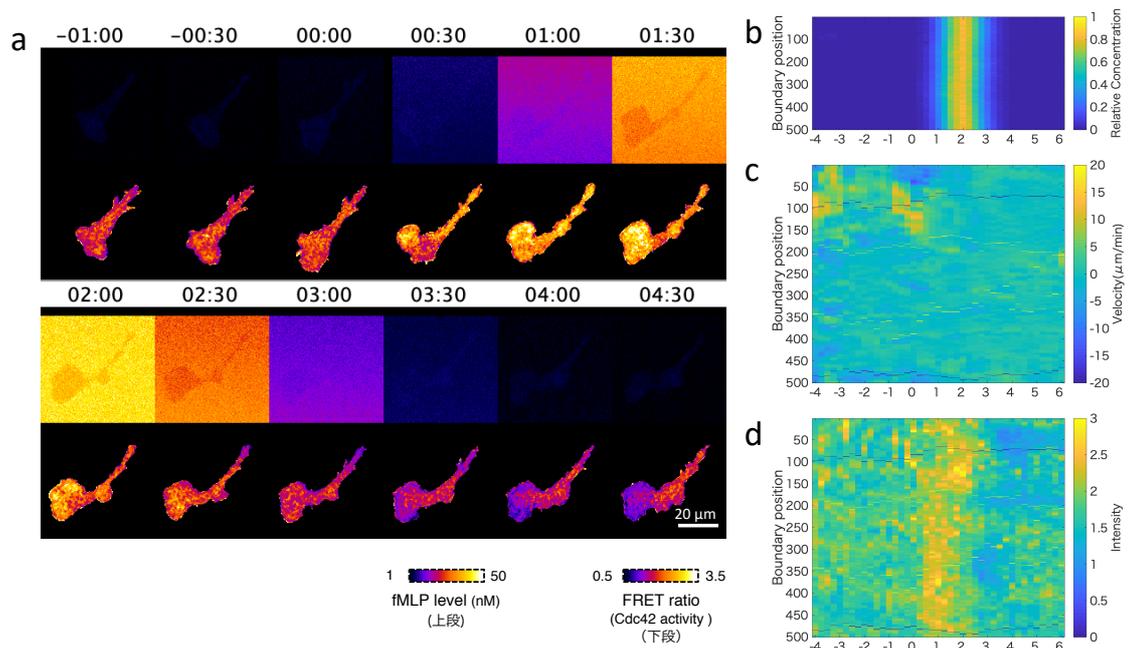


図 5-8 20 μM Y-27632 存在下での fMLP 進行波刺激 ( $T_{transit} = 4$  分) に対する Cdc42 の活性化応答

(a) fMLP 濃度の指示薬としての Alexa594 の蛍光画像(上段)と細胞領域での RaichuCdc42 プローブの FRET 比 (いずれも疑似カラー)。(b) 細胞端の近傍外側での fMLP の局所濃度。(c) 細胞膜の各分割領域における伸長・収縮速度の時間変化。(d) 細胞膜の各分割領域における Cdc42 活性(FRET ratio)の時間変化。最初の時刻における重心直上にある膜分割領域は境界位置 250 に対応する。

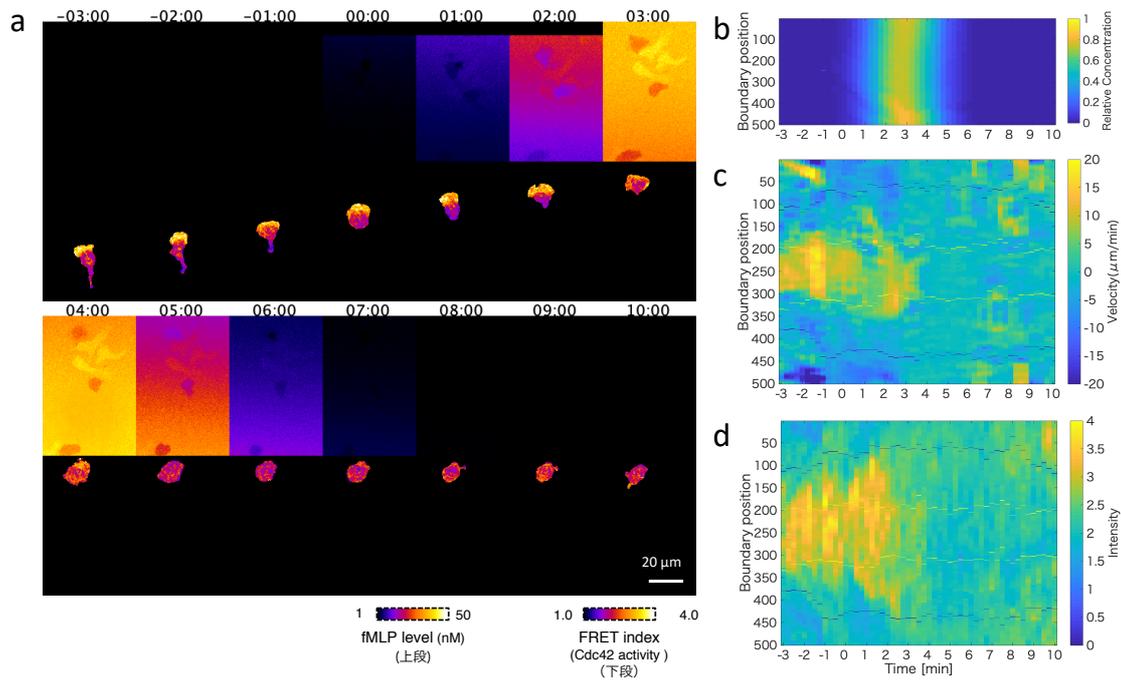


図 5-9 20 μM Y-27632 存在下での fMLP 進行波刺激 ( $T_{transit} = 7$  分) に対する Cdc42 の活性化応答

(a) fMLP 濃度の指示薬としての Alexa594 の蛍光画像(上段)と細胞領域での RaichuCdc42 プローブの FRET 比 (いずれも疑似カラー)。(b) 細胞端の近傍外側での fMLP の局所濃度。(c) 細胞膜の各分割領域における伸長・収縮速度の時間変化。(d) 細胞膜の各分割領域における Cdc42 活性(FRET ratio)の時間変化。最初の時刻における重心直上にある膜分割領域は境界位置 250 に対応する。

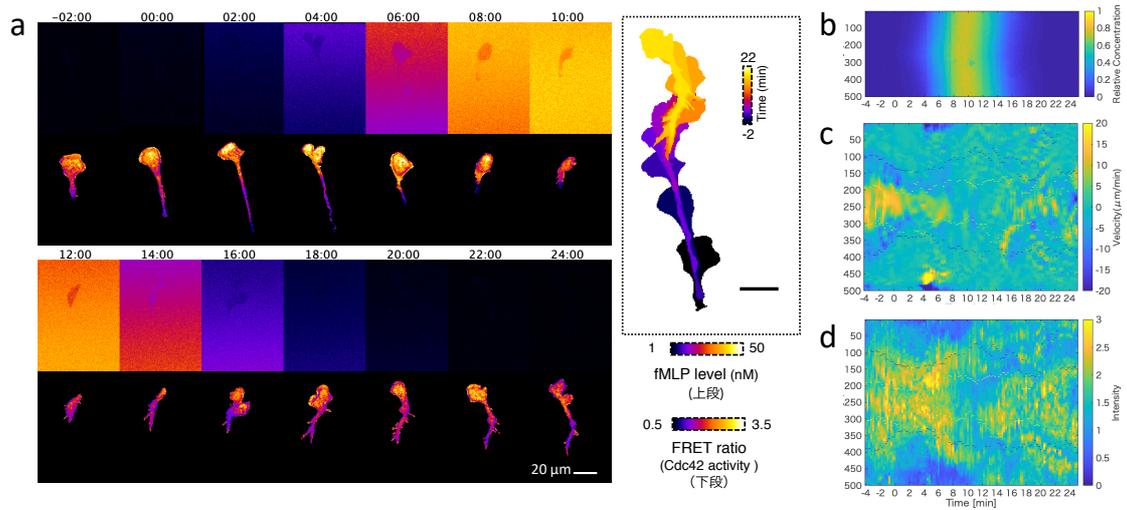


図 5-10 20  $\mu$ M Y-27632 存在下での fMLP 進行波刺激 ( $T_{transit} = 20$  分) に対する Cdc42 の活性化応答  
 (a) fMLP 濃度の指示薬としての Alexa594 の蛍光画像(上段)と細胞領域での RaichuCdc42 プローブの FRET 比 (いずれも疑似カラー)。(b) 細胞端の近傍外側での fMLP の局所濃度。(c) 細胞膜の各分割領域における伸長・収縮速度の時間変化。(d) 細胞膜の各分割領域における Cdc42 活性(FRET ratio)の時間変化。最初の時刻における重心直上にある膜分割領域は境界位置 250 に対応する。



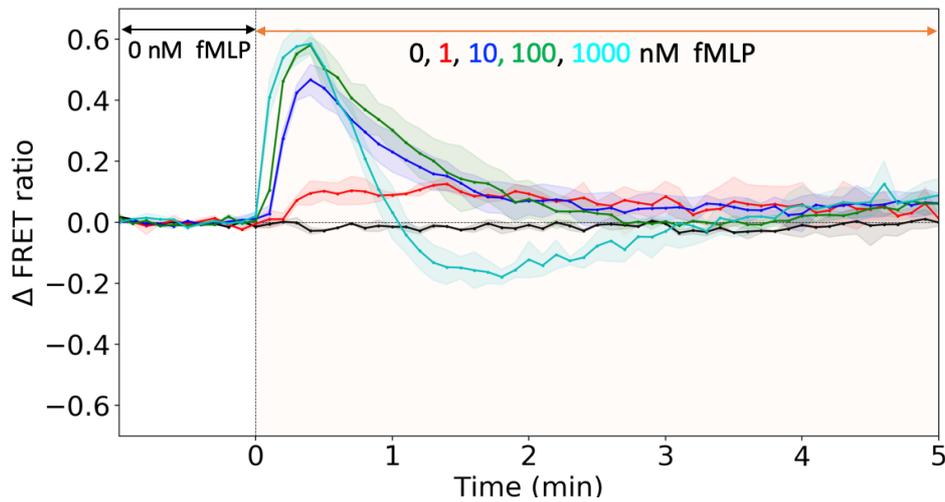
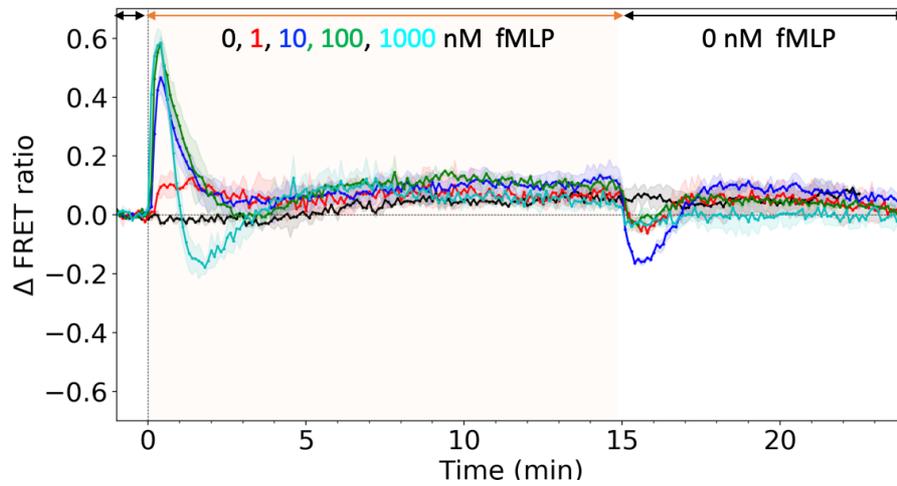
## 6. 結果：空間一様な誘引分子刺激に対する先導端分子の応答

### 6.1. 空間一様な fMLP 刺激に対する先導端分子の応答

#### 6.1.1. fMLP 濃度依存的な Cdc42 の応答

膜伸長との連動性が最も高い Cdc42[Yang et al., 2016]に関して、fMLP 刺激に対する Cdc42 活性の時間変化を測定した。Cdc42 活性の測定には RaichuCdc42 FRET プローブを用い、FRET の絶対定量を行うため交差励起と蛍光漏れ込みの効果を差し引いた量を計算した (3.8.1 参照)。総流量を 120  $\mu\text{L}/\text{min}$  とし、fMLP 溶液と HBSS(+)の流量比を 1:9 で切り替えることによって、時間的に階段状の fMLP 刺激を与えた (3.7.2 参照)。

fMLP の空間一様刺激(時刻 0 分)に対して、Cdc42 は一過的に活性化され定常状態に緩和する様子が観察された (図 6-1)。緩和過程の時間は 10 nM または 100 nM の fMLP 刺激に対しては約 90 秒であり、1000 nM の fMLP 刺激に対しては約 60 秒であった (図 6-2)。1000 nM fMLP 刺激に対しては刺激投入後の一過的な活性化に引き続いて、Cdc42 の活性化レベルが刺激入力前の値を下回ることが観察された(時刻 2-4 分)。このような応答は 1,10,100 nM fMLP 刺激においては見られなかった。また fMLP の濃度減少 (時刻 15 分) に対して Cdc42 の活性化レベルが刺激入力前の値を下回ることが観察され、10 nM から 0M に fMLP 濃度が低下する場合に顕著に現れた。



**図 6-1** 空間一様な fMLP 刺激(0, 1, 10, 100, 1000 nM)に対する Cdc42 の応答  
 時刻 0 分から 15 分までの間 fMLP 刺激を与えた。縦軸は RaichuCdc42 FRET プローブ  
 を用いて測定した FRET ratio であり、時刻 0 の直前 1 分間の平均値からの変化量で表示  
 している。薄色がけは標準誤差を示す。下図は上図の時刻 5 分までのデータを示したもの。  
 データは 15 細胞以上の細胞集団の応答の平均値を取得したもの。(0, 1, 10, 100 および  
 1000 nM の fMLP 刺激について N = 2, 2, 3, 2, 2)

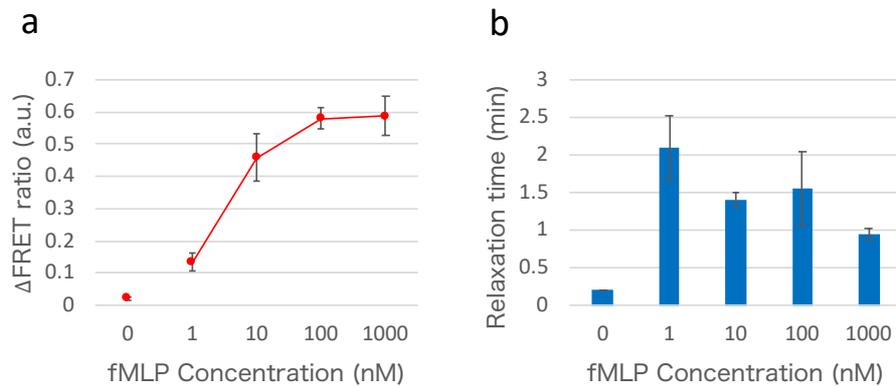


図 6-2 fMLP 一様刺激に対する (a) Cdc42 活性上昇と (b) Cdc42 活性化適応応答の緩和時間の fMLP 濃度依存性。エラーバーは標準偏差を表す。

### 6.1.2. ZCL278 存在下での空間一様な fMLP 刺激に対する Cdc42 の応答

これまでの結果(図 4-9)より、20  $\mu$ M ZCL278 存在下では HL60 細胞の走化性と運動性が完全に阻害された。fMLP の空間一様な刺激に対する Cdc42 応答の ZCL278 依存性を測定することによって、Cdc42 活性と細胞の走化性・運動性の関係を調べることを目的とした。Cdc42 の活性は FRET プローブを用いて測定し、FRET の絶対定量を行うため交差励起と蛍光漏れ込みの効果を差し引いた量を計算した (3.8.1 参照)。

ZCL278 濃度に依存して、刺激前の Cdc42 活性レベルが低下すること、および fMLP 刺激に対する Cdc42 活性の上昇幅が小さくなることが観察された (図 6-3)。10  $\mu$ M ZCL278 存在下での 50 nM fMLP 刺激に対するの応答に着目すると、fMLP 刺激に対する一過的な Cdc42 活性化後(時刻 5-15 分)の活性レベルの定常値が刺激前の活性化レベルを上回っていた。この背後にあるメカニズムとして、一過的な増幅により活性化状態の高い安定状態に到達し、それが維持されている可能性が考えられる。

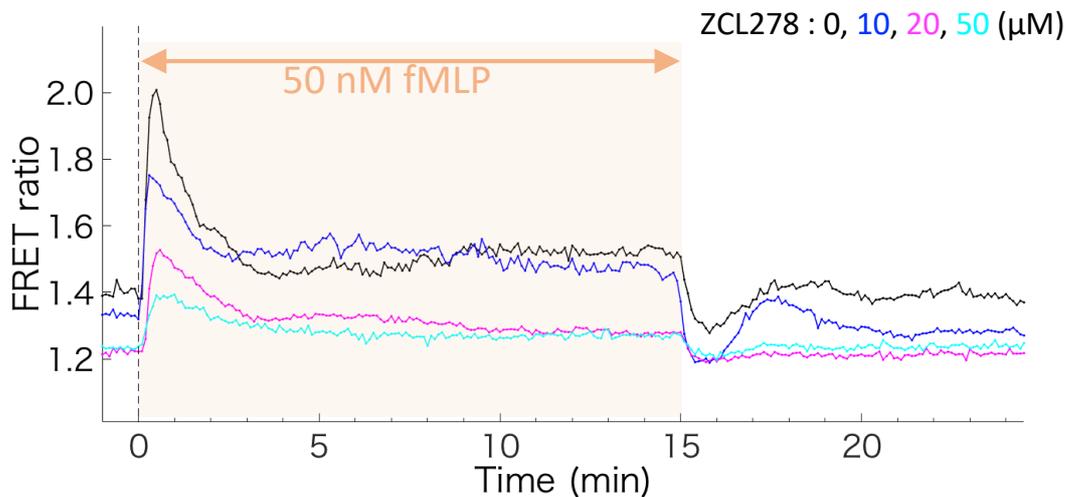


図 6-3 ZCL278 存在下(0, 10, 20, 50  $\mu\text{M}$ )での空間一様な 50 nM fMLP 刺激に対する Cdc42 の応答。

時刻 0 分から 15 分までの間、50 nM fMLP 刺激を与えた時の Cdc42 の活性化応答。Cdc42 活性は RaichuCdc42 FRET プロブを用いて測定した。データは 20 細胞以上の細胞集団の応答の平均値を取得したもの。

### 6.1.3. Y27632 存在下での空間一様な fMLP 刺激に対する Cdc42 の応答

これまでの結果(図 4-11)より、20  $\mu\text{M}$  Y27632 存在下では濃度減少を伴う場合の走化性運動が大きく低下することが観察された。Y27632 の有無によって、fMLP の空間一様な刺激に対する Cdc42 応答を測定し、違いが現れるか否かを調べることにした。Cdc42 の活性は RaichuCdc42-FRET プロブを用いて測定し、FRET の絶対定量を行うため交差励起と蛍光漏れ込みの効果を差し引いた量を計算した (3.8.1 参照)。5 分間、10 分間または 15 分間の空間一様な fMLP 刺激に対する Cdc42 の活性化応答は (図 6-4 a,b および c)、fMLP 刺激に対する Cdc42 活性上昇値、適応応答の緩和過程および fMLP 濃度減少に伴う Cdc42 活性のアンダーシュートの過程に関して、明確な変化は見られなかった。

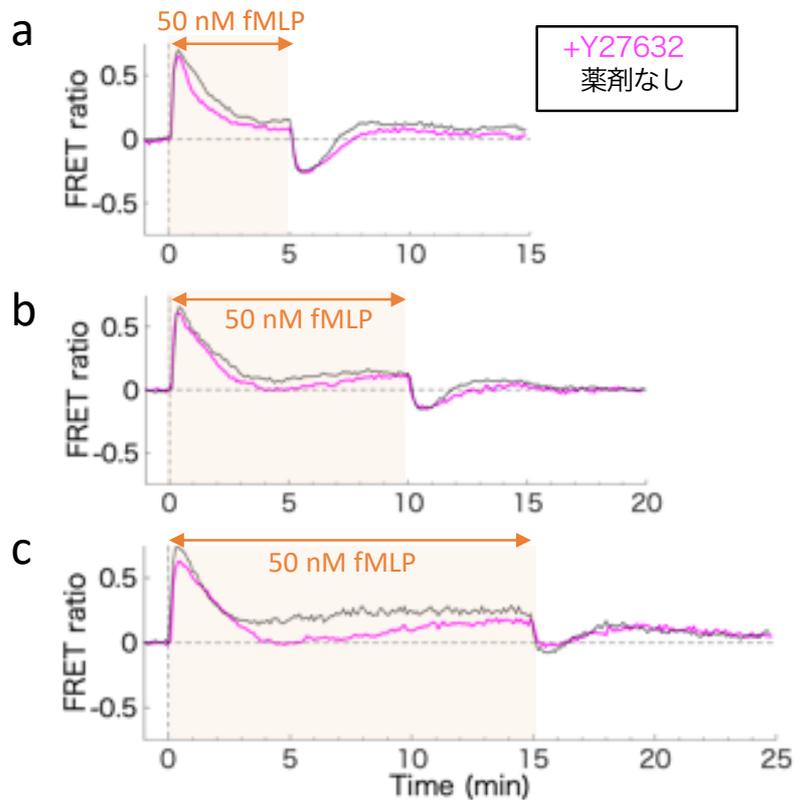


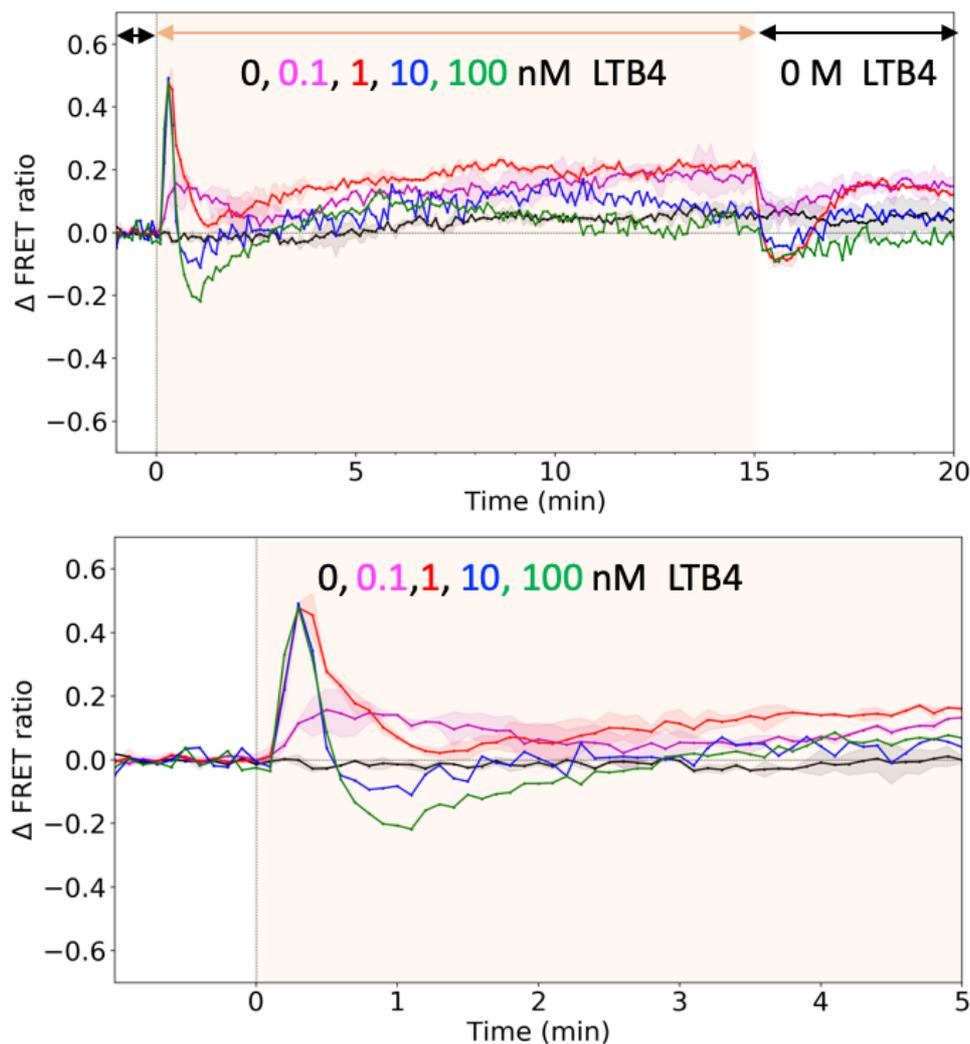
図 6-4 Y27632 存在下(20  $\mu$ M)での空間一様な 50 nM fMLP 刺激に対する Cdc42 の活性化応答。

時刻 0 分から 5 分(a), 10 分(b)または 15 分(c)までの間、50 nM fMLP 刺激を与えた時の Cdc42 の活性化応答(マゼンタの線は Y27632 存在下、黒線は薬剤なしのデータ)。Cdc42 活性は RaichuCdc42 FRET プローブを用いて測定した。データは 20 細胞以上の細胞集団の応答の平均値を取得したもの。

## 6.2. 空間一様な LTB4 刺激に対する先導端分子の応答

空間的に一様な LTB4 刺激に対する Cdc42 活性の時間変化を測定した(図 6-5)。Cdc42 の活性は RaichuCdc42-FRET プローブを用いて測定し、FRET の絶対定量を行うため交差励起と蛍光漏れ込みの効果を差し引いた量を計算した(3.8.1 参照)。1, 10, 100 nM の LTB4 の一様刺激に対して、Cdc42 活性は  $\Delta$ FRET ratio 値にして 0.5 まで上昇し、0.4-0.5 分で刺激前の活性レベルまで緩和した(図 6-6)。これらは 100 nM fMLP 一様刺激後の Cdc42 活性の上昇値の 86%、10, 100 nM の fMLP 一様刺激に対する Cdc42 活性の緩和時間の 37% であった。0.1, 1 nM の LTB4 刺激に対しては一過的な活性化応答のあと、Cdc42 活性が刺

激前より高い値をとること（時刻5-15分）が観察された。LTB4濃度が0Mに低下するときに( $t=15$  min)、Cdc42活性の低下が観察された。このCdc42活性の変化量はLTB4濃度が1 nMから0Mに低下する場合に最も大きかった。LTB4濃度が1,10,100 nMから0Mに低下する場合に平均-0.05まで低下し、0.1 nMから0Mに低下する場合に0.05まで低下した。



**図 6-5** 空間一様な LTB4 刺激(0, 0.1, 1, 10, 100 nM)に対する Cdc42 の応答  
 時刻0分から15分までの間 LTB4 刺激を与えた。縦軸は RaichuCdc42 FRET プローブを用いて測定した FRET ratio であり、時刻0の直前1分間の平均値からの変化量で表示している。薄色がけは標準誤差を示す。下図は上図の時刻5分までのデータを示したもの。データは15細胞以上の細胞集団の応答の平均値を取得したもの。(0, 0.1, 1, 10, および100 nM の LTB4 刺激について N =2, 2, 2, 1, 1)

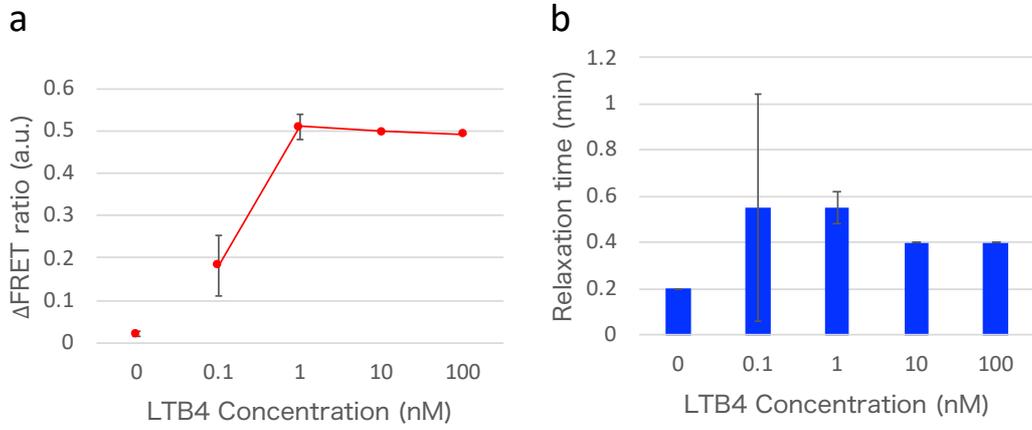


図 6-6 LTB4 一様刺激に対する(a) Cdc42 活性上昇と (b) Cdc42 活性化適応応答の緩和時間の fMLP 濃度依存性。エラーバーは標準偏差を表す。



## 7. 結果：Cdc42 の機能解析

### 7.1. はじめに

好中球の先端端形成に関与する複数のタンパク質 (Artemenko et al., 2014)のうち、代表的な分子として Rho GTPase に分類される Rac, Cdc42 や PI3K がある。好中球様 HL60 細胞を対象として、細胞後方 1/3 の領域に光依存的に PI3K を集積させることに引き続いて、細胞前方での伸長の抑制と、照射領域での伸長が起こることが報告されている [Graziaon et al., 2017]。またゼブラフィッシュの好中球を対象として、光依存的な Rac 活性化を行なった領域への細胞移動が報告されている [Yoo et al., 2010]。PI3K は PIP3 を介して Rac の活性化に関わり、活性型 Rac は WAVE 複合体と結合し、Arp2/3 を活性化して網目状の F-actin 重合を促進する (2.1.3 参照)。Cdc42 は活性型が WASP と結合し、Arp2/3 を活性化して F-actin 重合を促進する [Takenawa et al., 2007]。好中球様 HL60 では WASP や mDia のノックダウン変異体で細胞のランダム方向の重心運動や、走化性運動がほぼ完全に阻害されることが報告されており [Shi et al., 2009; Laylin et al., 2017]、Cdc42 活性が膜伸長に小さくない寄与をしていることが考えられる。本章では Cdc42 活性と膜伸長との因果関係に関して示唆を得ることを目的とし、光遺伝学的手法を用いた細胞内でのタンパク質の集積により、局所的な Cdc42 の活性化を行い、それに引き続く細胞の形態変化を観察した。

また好中球の走化性においては、誘引分子刺激に対する先端端分子の応答に関する知見が蓄積してきているものの、先端端分子の空間的な分布がいかにかに決まるかについての知見はほとんどない。先端端分子の細胞内での非対称な配置が生まれる仕組みに関する示唆を得るため、蛍光タンパク質を融合した Cdc42 の細胞内での分布を観察した。

## 7.2. 光遺伝学を用いたタンパク質膜局在誘導系の構築

光依存的に 2 量体化するタンパク質を用い、照射によって膜上にタンパク質を集積させる系を、好中球様 HL60 を対象に実現することを試みた。植物が光に向かって成長する(光屈性)性質に関与するタンパク質として青色光を受容してフォトトロピンと呼ばれるタンパク質が報告されている [Hsu et al., Science, 1997]。燕麦 (*Avena sativa*) 由来の光感受性をもつフォトトロピンの光・酸素・電位(light-oxygen-voltage;LOV2) ドメイン [Halavaty et al., 2007] の C 末端の  $\alpha$ ヘリックス領域に大腸菌(*E.Coli*)由来の SsrA-7 ペプチドを結合したタンパク質は、光を当てない暗条件では SsrA ペプチドが LOV2 ドメインと結合しており、SsrA の本来の結合タンパク質である大腸菌由来の SspB タンパク質とは結合しないが、青色光が照射されると LOV2 ドメインから SsrA ペプチドが解離し、SspB タンパク質と結合するという性質を持つ [Lungu et al., 2012]。細胞膜移行配列(CAAX)を付加した LOV-SsrA タンパク質、および SspB タンパク質に目的のタンパク質を融合したタンパク質を、細胞に同時に発現させることによって、膜上の局所領域に青色光依存的に注目するタンパク質を集積させることができる。本研究では Guntas らが報告した改良型の光依存的二量体化タンパク質である iLID(improved Light Induced Dimer) [Guntas et al., 2015]を用い、青色光依存的に Cdc42-GEF である Intersectin1 (ITSN1)の DH/PH ドメインを膜上に集積させる実験を行なった (図 7-1)。ITSN1 は DH/PH ドメインで Cdc42 に結合し、Cdc42(WT)およびそれに次いでグアニンヌクレオチド非結合型の Cdc42(T17N)と結合し、GTPase 不全型変異である Cdc42(Q61L)やアクチン骨格制御に関わる Rho GTPase である Rac1, RhoA とは結合しないことが報告されている [Hussain et al., 2001]。

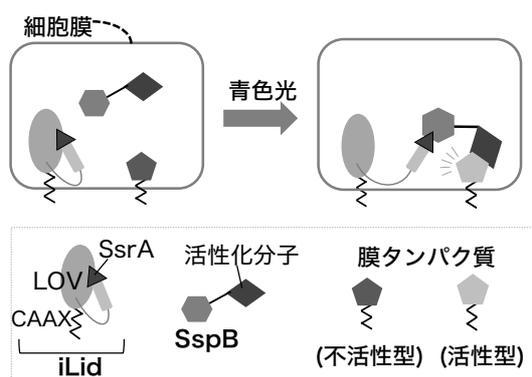


図 7-1 青色光依存的に 2 量体形成するタンパク質を用いた、膜上へのタンパク質集積の誘導(iLID; improved light-induced-dimer)。

### 7.2.1. 488 nm 青色光依存的なタンパク質膜局在の時定数

488nm のレーザーを一様に照射した場合の、細胞質中の ITSN(DH/PH ドメイン)-tgRFPt-SspB(WT) タンパク質の膜上への局在の動態を測定した。ITSN(DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT) は光照射 6 秒後には膜上に移行することが観察された。光照射から約 40 秒は膜局在が最大値の 80%維持され、光照射から約 90 秒後には膜局在は光照射前と同程度まで低下した。

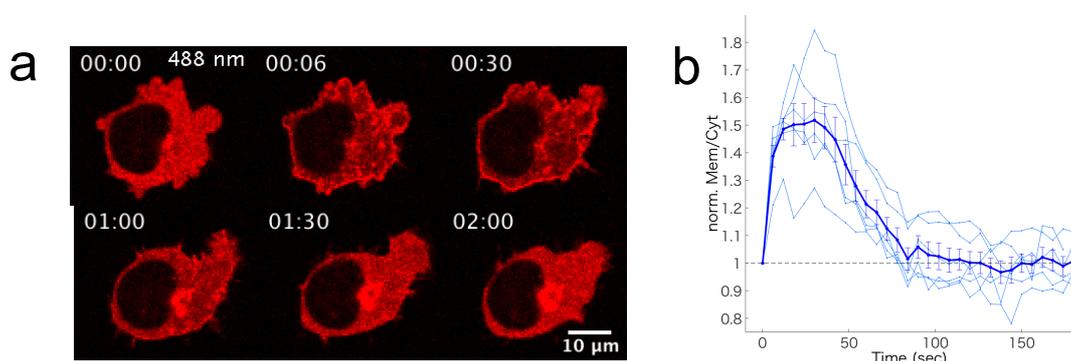


図 7-2 空間一様に青色光(488 nm レーザー)を照射した場合の ITSN(DH/PH ドメイン)-tgRFPt-SspB(WT)タンパク質の膜上への局在動態。(a) 時刻 00:00 に一度だけ青色光を照射した。(b) 細胞質中と膜上での ITSN(DH/PH ドメイン)-tgRFPt-SspB(WT)量の比を算出し、時刻 0 での値を 1 に規格化して図示した。

### 7.2.2. 局所的な光刺激による Cdc42-GEF の集積

488 nm の光照射により ITSN(DH/PH ドメイン)-tgRFPt-SspB(WT)の膜局在の誘導が確認できたため、488 nm レーザーの局所的な光照射によって、膜上の特定の領域へのタンパク質の集積とそれに引き続く細胞の形態変化を実現できるかを検討した。局所的な光照射には、指定した ROI(Region of interest)に集光した光をガルバノミラーを用いて走査式に照射することのできる FRAPPA ユニット(Andor)を用いた。

ランダム運動する細胞を対象にし、細胞の前端部分の進行方向左側に局所的に光照射を 30 秒間隔で行った。局所的な光照射に伴い、その位置の近くにタンパク質が集積と、それに引き続く膜伸長が生じることが観察された(図 7-3)。このことは先端端の進行方向に対して左右の Cdc42 活性の高い側に向かって、細胞が運動方向を変えることを示唆している。(ターニング)

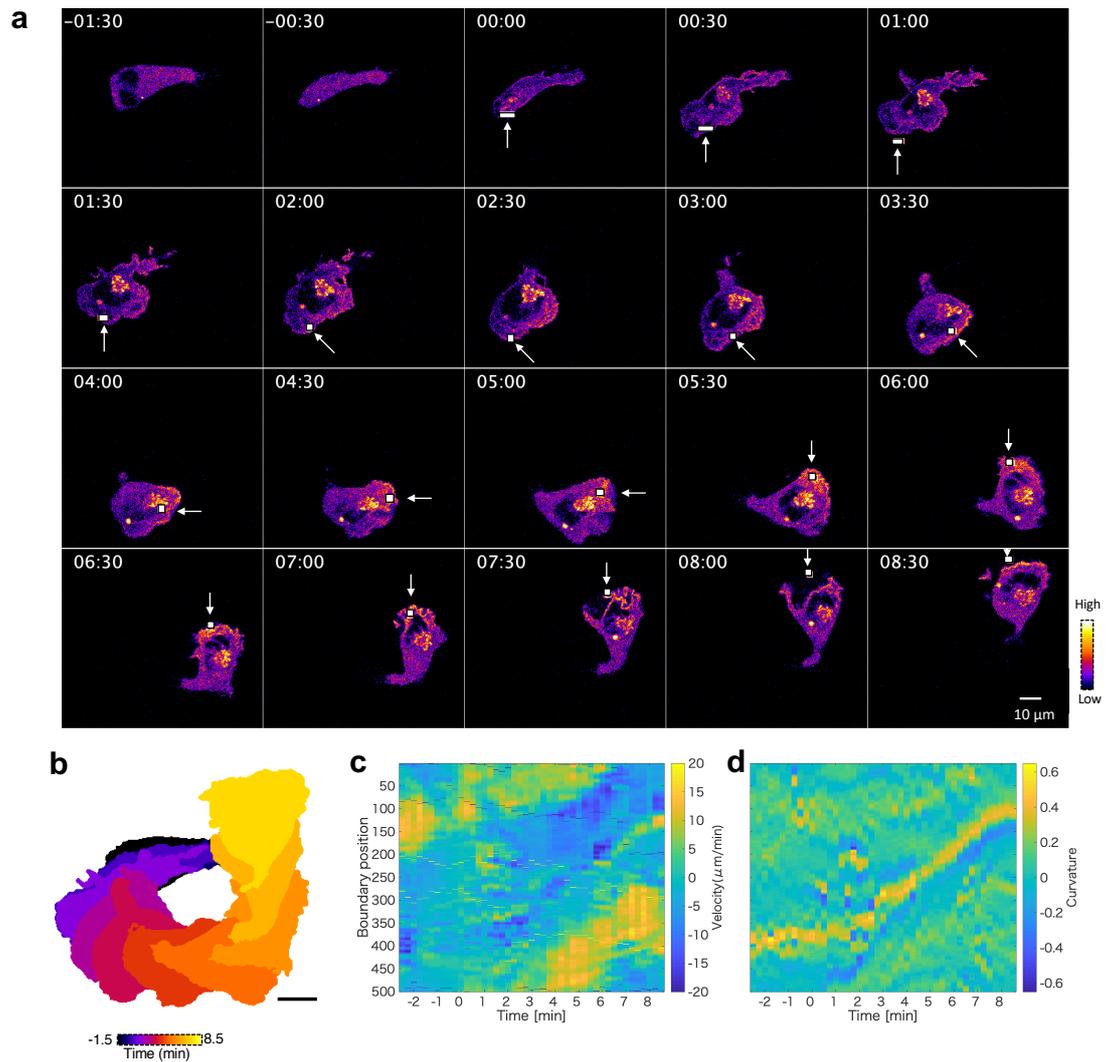


図 7-3 局所的な青色光(488 nm)照射による ITSN(DH/PH ドメイン)-tgRFPt-SspB(WT)の膜上への集積と細胞の形態変化。(a) 時刻0から30秒おきに白枠の正方形内に488 nm青色レーザーを照射することによって、その近傍に ITSN(DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)を集積させた。(b)細胞輪郭の軌跡。(c)局所的な細胞膜の伸長・収縮速度の時間変化 (d)局所的な膜の曲率の時間変化。時刻0以降に細胞の後端に対応する曲率の小さい領域が境界位置400付近から100付近に移動することが観察された。スケールバー10 μm (a, b)。

細胞形状が球形に近く、微小な突起形成を除いて形態変化の少ない細胞を対象として、膜上の領域の局所的な光照射を行なった。光照射に伴い、照射領域付近に ITSN(DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)を集積し、膜伸長が生じることが観察された (図 7-4)。このことはランダム運動をしている細胞でなくとも、Cdc42-GEF を集積させることにより、方向性のある膜伸長を誘導できることを示唆している。(極性形成)

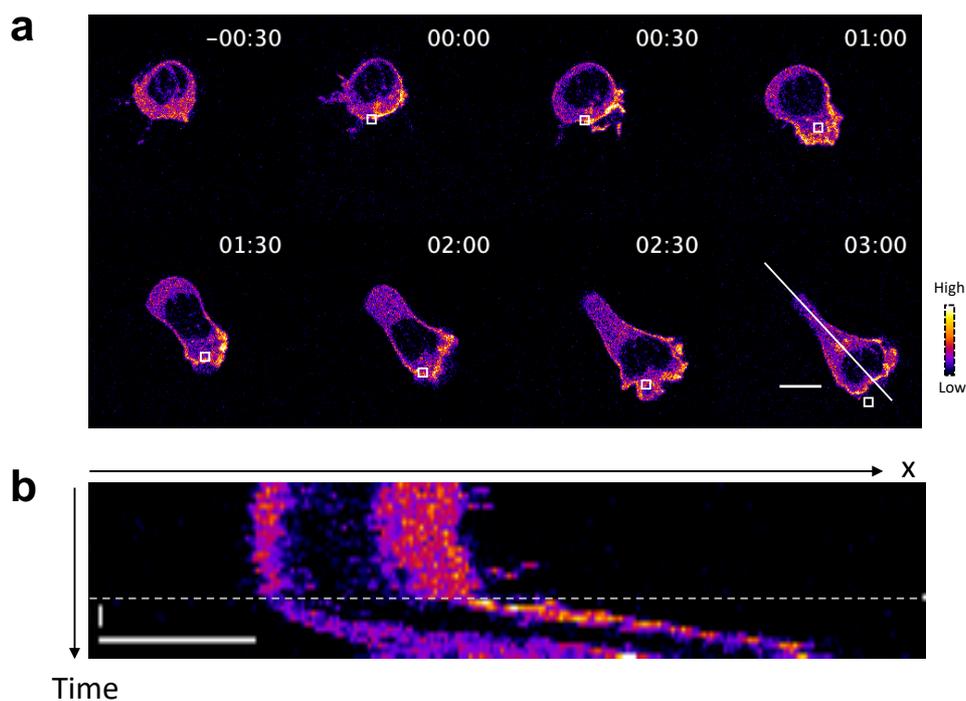


図 7-4 局所的な青色光(488 nm)照射による ITSN(DH/PH ドメイン)-tgRFPt-SspB(WT)の膜上への集積と細胞の形態変化。

(a) 時刻 0 から 30 秒おきに白枠の正方形内に 488 nm 青色レーザーを照射し、ITSN(DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)の集積を誘導した。(b) 図 a の線分上の輝度値の時間変化を表すキモグラフ。点線は局所的な光刺激を始めた時間に対応する。(水平スケールバー 10  $\mu$ m、垂直スケールバー 1 分)

既存の先端端構造を持つ細胞を対象にして、細胞の側方に局所的な光照射を行い、Cdc42-GEF の集積を行った (図 7-5)。光照射から 30 秒程度で Cdc42-GEF の集積部位の近傍から膜伸長が生じることが観察された。(側方仮足の形成)

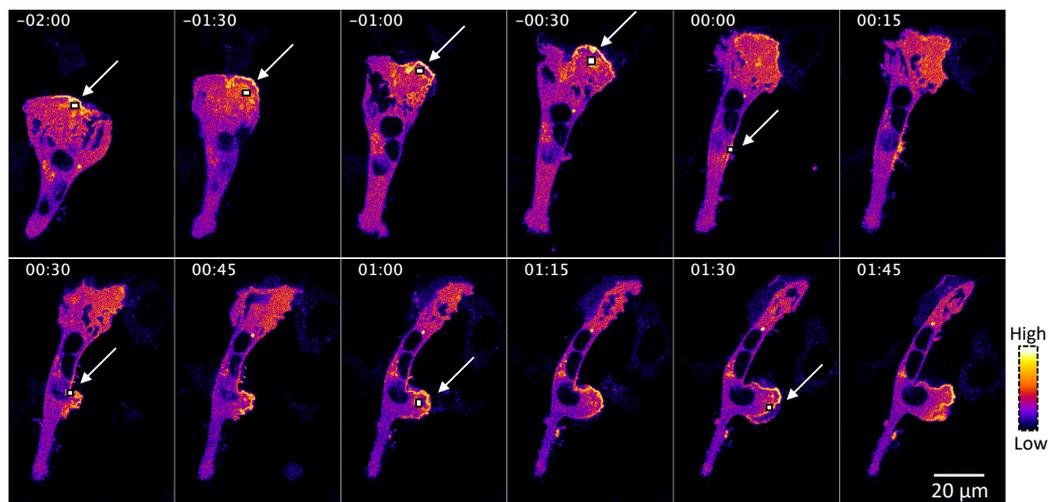


図 7-5 局所的な青色光(488 nm)照射による ITSN(DH/PH ドメイン)-tgRFPt-SspB(WT)の膜上への集積と細胞の形態変化。時刻 0 から 30 秒おきに白枠の正方形内に 488 nm 青色レーザーを照射し、ITSN(DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)の集積を誘導した。

好中球様 HL60 細胞の場合、誘引分子の濃度勾配がない場合でも形態的な前後極性を作り、ランダムな重心運動を示す細胞が観察される。ここでは細胞が自発的に形成する運動極性の向きと、Cdc42 活性の空間的な偏りが一致しない状況を作り出し、その場合に細胞がどちらの情報が優先されるかを検討した。具体的にはランダム運動する細胞を対象として、細胞後端に局所的な光照射を行った(図 7-6)。光照射に伴い細胞後端に ITSN(DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)が集積し、細胞のそれまでの運動方向への速度が低下し、光照射開始から約 2 分かけて、それまで後端であった部分から膜伸長が生じ、先端端が形成されることが観察された。(細胞極性の反転)

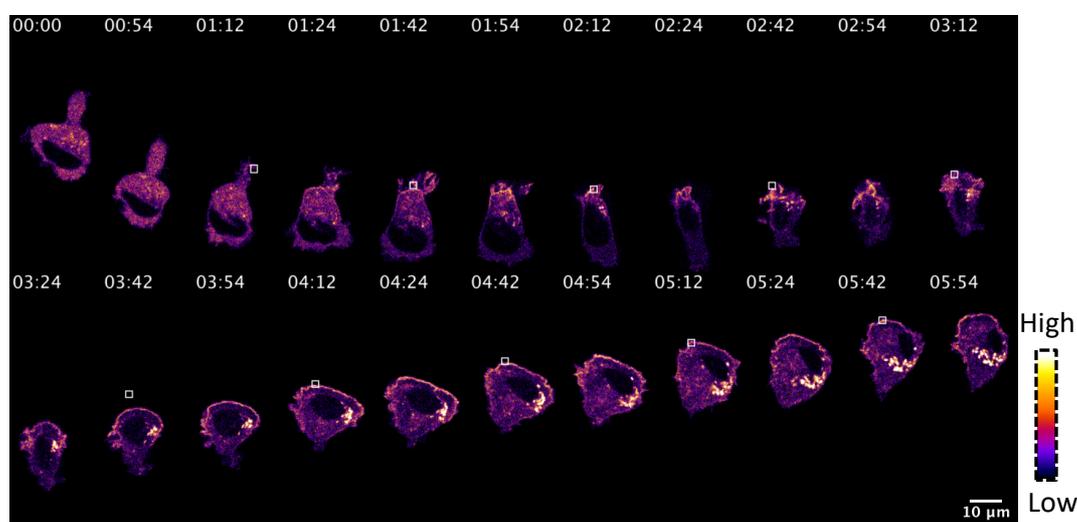


図 7-6 局所的な青色光(488 nm)照射による ITSN(DH/PH ドメイン)-tgRFPt-SspB(WT)の膜上への集積と細胞の形態変化。

時刻 0 から 30 秒おきに白枠の正方形内に 488 nm 青色レーザーを照射し、ITSN (DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)の集積を誘導した。

### 7.2.3. fMLP 勾配下での局所的な光刺激による Cdc42-GEF の集積

好中球様 HL60 細胞は、誘引分子である fMLP 勾配に対しては明確な方向性を持って、走化性運動をする。ここでは、誘引分子勾配という細胞外の入力と、細胞内の Cdc42 活性の空間的な偏りが一致しない場合に細胞がどちらを優先して運動方向を決定するかを検討した。具体的には fMLP の濃度勾配のもとで高濃度側に運動する細胞を対象として、その細胞後端に局所的な光照射を行なった (図 7-7)。光照射に伴い細胞後端に ITSN(DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)が集積し、細胞の fMLP 高濃度側への運動速度が低下し、光照射開始から約 1 分で照射部位から膜伸長が生じた。fMLP 高濃度側への膜伸長はほぼ停止したものの、直ちに接着面からの脱離と退縮は生じず、光照射から約 8 分後に先端端であった部位が接着面から脱離した。このことは、Cdc42-GEF の集積により、fMLP 濃度勾配によって形成されていた細胞極性と反対方向に膜伸長と細胞移動を誘導できることを示している。ただし、fMLP 濃度の傾きの大小や集積する Cdc42-GEF の量の大小によって、濃度勾配が優先される場合、Cdc42 集積が優先される場合、両者が拮抗する場合があると考えられる。

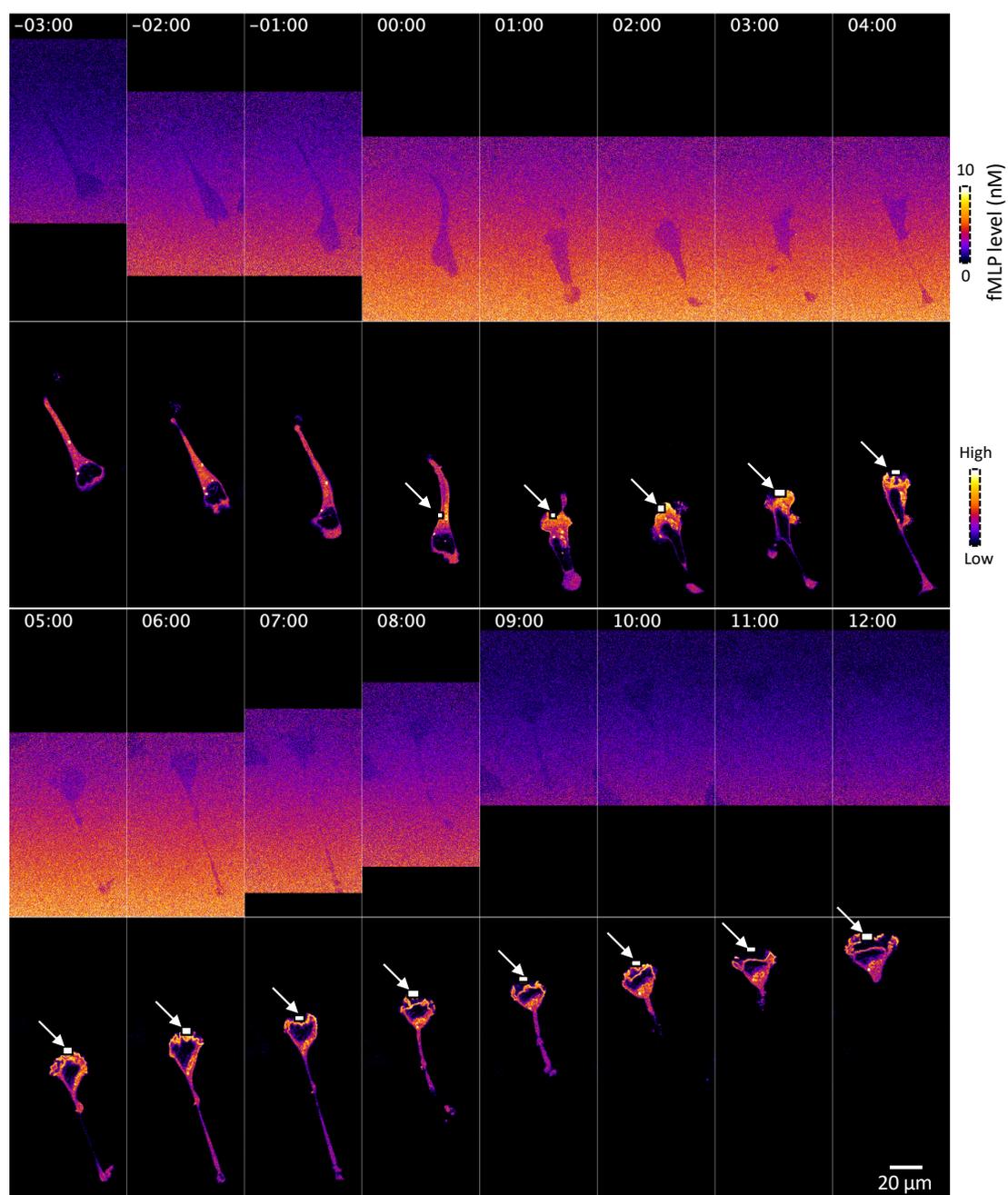
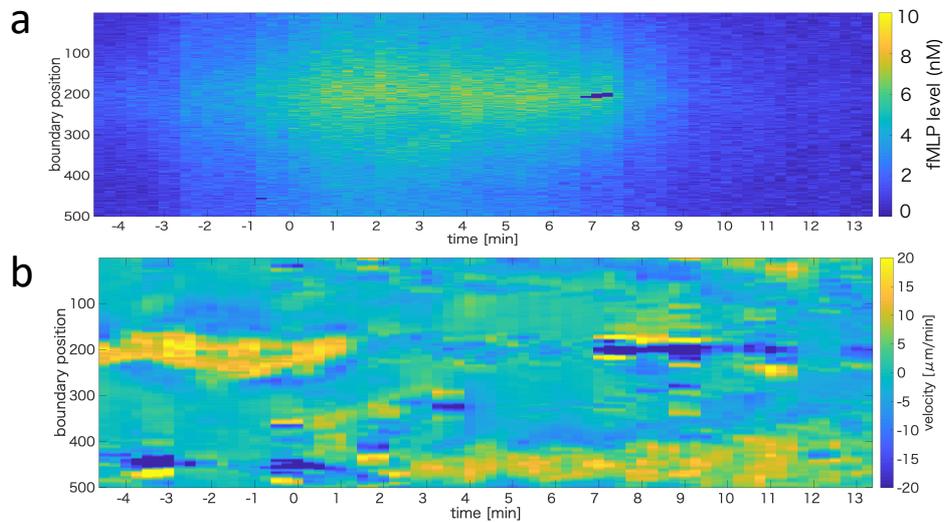


図 7-7 fMLP 濃度勾配下で運動する細胞を対象にして、時刻 0 から 30 秒おきに白枠の正方形内に 488 nm 青色レーザーを照射し、ITSN (DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)を集積させた。上段は fMLP 濃度の指示薬として用いた蛍光試薬 Alexa647 の蛍光画像(疑似カラー)であり、下段は Cdc42-GEF(ITSN1 DH/PH)-tgRFPt-SspB(WT)の蛍光画像(疑似カラー)である。



**図 7-8** 細胞周囲での fMLP 濃度 (a) と局所的な膜の伸長・収縮の動態 (b)。

時刻 0 分までは細胞の膜周縁で fMLP 濃度が最も高い領域(縦軸の境界位置 200 付近)において、伸長速度が最も大きいことが確認される。時刻 0 分以降に境界位置 400-450 に照射により Cdc42GEF を集積させることによって、それまで継続していた方向(境界位置 200 付近)への膜の伸長が停止し、Cdc42GEF を集積させた領域にて膜伸長が見られた。

( $\pm 20 \mu\text{m}/\text{min}$  の速度分布が隣り合っている部分 ([境界位置,時刻]がそれぞれ[450, -3], [450, 0], [200, 7-9]の部分) は、細胞後端が接着面から離れ細胞前方に素早く引き戻される過程に対応する。)

### 7.3. 常活性型 (GTPase defective)Cdc42、優勢阻害型 (Nucleotide-free)Cdc42 の細胞内分布

#### 7.3.1. ランダム運動する好中球様 HL60 細胞の場合

ランダム方向に運動する好中球様 HL60 細胞を対象とし、細胞内の GTPase 機能を欠損した常活性型変異である Cdc42(Q61L)および、グアニンヌクレオチド非結合型の優勢阻害型変異である Cdc42(T17N)の動態を蛍光タンパク質で標識することによって観察した。

Cdc42 は C 末に膜上への結合に必要な脂質修飾を受ける CAAX モチーフを持つため、蛍光タンパク質(mRuby2 または Clover)を Cdc42 の N 末側に付加した。Clover-Cdc42(Q61L)は核を除く細胞質中に分布し、先端端にも分布することが観察された。一方、mRuby2-Cdc42(T17N)は核を除く細胞質中に分布しているものの、先端端における量が極めて少ないことが観察された (図 7-9)。(またこの mRuby2-Cdc42(T17N)が少ない領域は透過光像で区別できる先端端と重複する。) mRuby2-Cdc42(T17N)が図 7-9 に示すように先端端に分布しないことは観察したほとんどで確認されたが、Clover-Cdc42(Q61L)については先端端には分布するものの、集積が明確でない細胞が見られた。先端端分子の Cdc42 の空間的な偏りが(GEF や GAP による)活性化制御に依らず、その状態 (グアニンヌクレオチド非結合型か GTP 結合型) に依って生じることが示唆される。

ランダムな運動をする細胞におけるアクチン重合を、繊維状アクチンのプローブである Lifeact-mTurquoise2 [Julia et al, 2008] を用いて観察したところ、先端端で Lifeact-mTurquoise2 が局在することが観察され、この局在は透過光像で区別される先端端構造(図 7-10 白矢じり)の位置と一致する(図 7-10)。

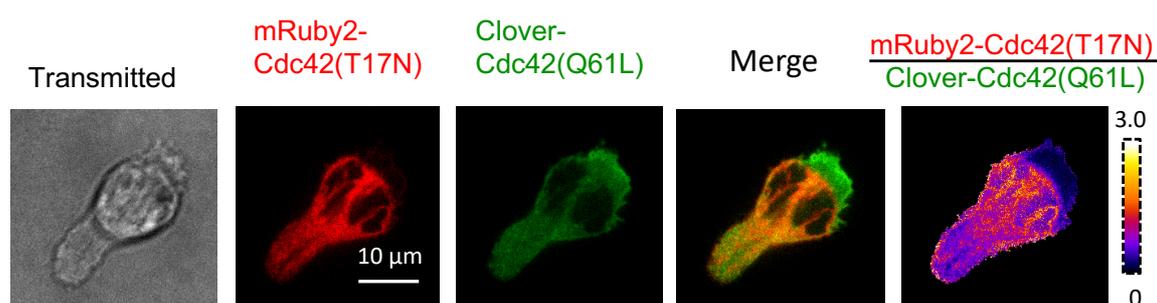


図 7-9 遊走する好中球様 HL60 細胞における Cdc42(T17N)および Cdc42(Q61L)の細胞内分布。

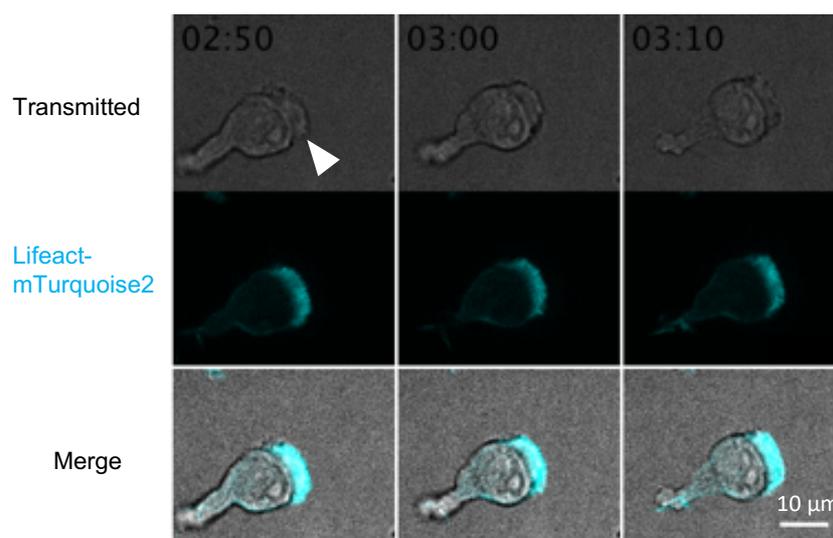


図 7-10 ランダム運動する好中球様 HL60 細胞の透過光像と繊維状アクチンのプローブである Lifeact -mTurquoise2 の細胞内分布。透過光像で確認される細胞の最前端から 2-3  $\mu\text{m}$  までの区画に、Lifeact-mTurquoise2 の局在が見られた。

### 7.3.2. 熱処理した好中球様 HL60 細胞の場合

熱処理した好中球は細胞体の数倍もの長さの仮足伸長を示すことが報告されている [Malawista et al., 1982]。ここでは、48°Cのヒートブロックで15分間保温した細胞を、37°Cの環境に戻し観察した様子を示す。熱処理された細胞では細胞の重心運動は小さいが、仮足の伸長が見られた。伸長領域では mRuby2-Cdc42(T17N)がそれ以外の細胞質領域と比べて少なく、Clover-Cdc42(Q61L)は伸長領域にも存在し、その先端を縁取るように局在していることが観察された。また、細胞が先端を退縮させ、反対側に新しく膜伸長を始める過程において、新しい膜伸長が生じる以前にその付近に、細胞質中の mRuby2-Cdc42(T17N)の量が少ない領域が生じることを観察された。また新規の伸長先端に Clover-Cdc42(Q61L)の局在が伸長とほぼ同時に生じることが観察された。膜伸長の生じる反対側で細胞質中の mRuby2-Cdc42(T17N)の量が少ない領域が必ずしも生じることがないことも観察された(図 7-12、時刻 03:30)。観察された mRuby2-Cdc42(T17N)および Clover-Cdc42(Q61L)の空間分布は固定的なものでなく、膜伸長と同程度の速さで動的に変化していることが示唆される。また、mRuby2-Cdc42(T17N)および Clover-Cdc42(Q61L)の空間分布の変化と膜伸長の因果については判断できないが、両者の間には動的な対応関係があることが示唆される。

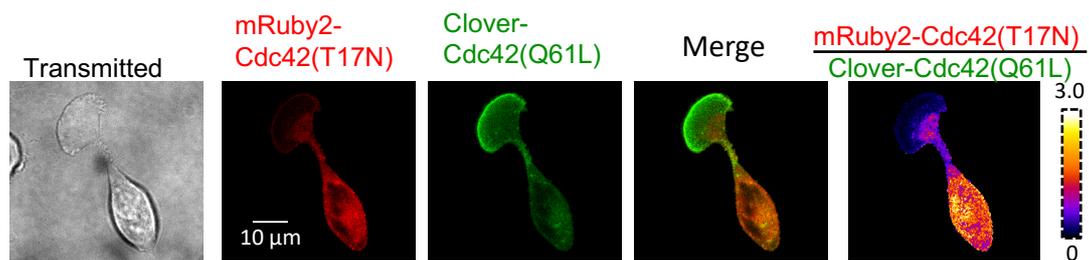


図 7-11 熱処理(45°C、15 分間)した好中球様 HL60 細胞における Cdc42(T17N)および Cdc42(Q61L)の細胞内分布。

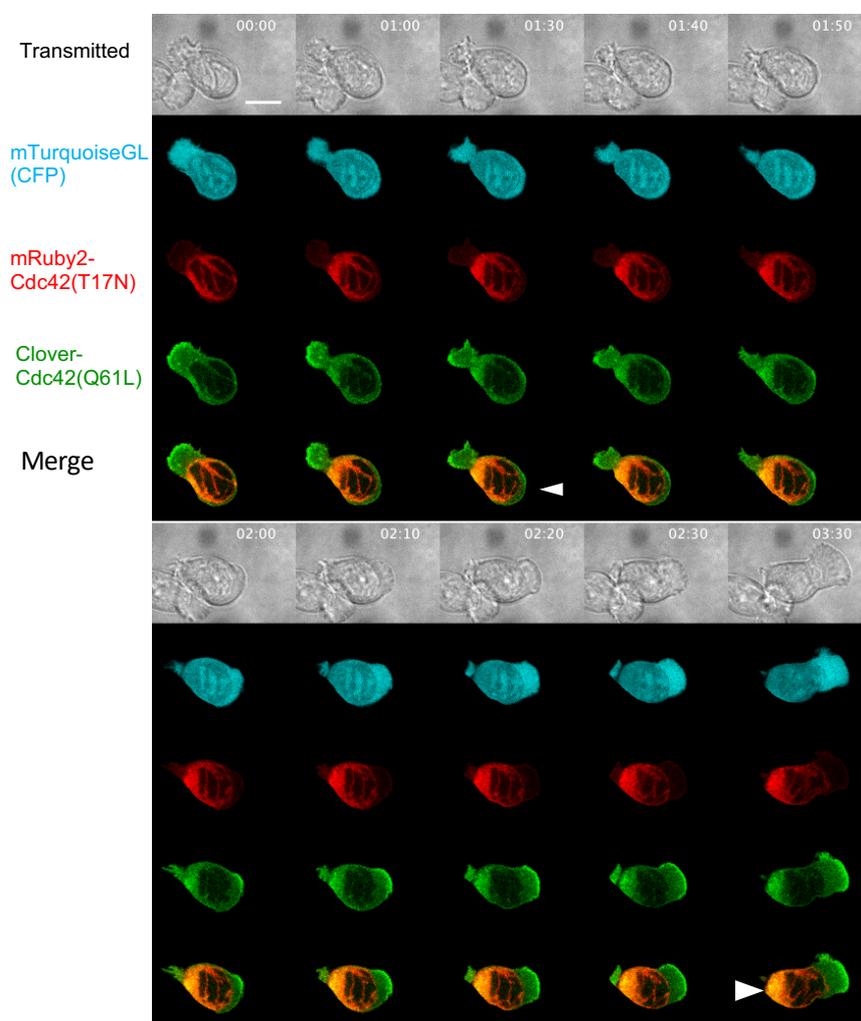


図 7-12 熱処理(45°C、15 分間)した好中球様 HL60 細胞における Ruby2-Cdc42(T17N)、Clover-Cdc42(Q61L)および mTurquoiseGL(CFP)の細胞内動態。最下段は Ruby2-Cdc42(T17N)蛍光画像と Clover-Cdc42(Q61L)蛍光画像の重ね合わせ画像。

新しい膜伸長が生じる以前から、Ruby2-Cdc42(T17N)の細胞質中の量が少ない領域があることが観察された(時刻 01:30、白矢じり)。伸長方向の反対側で常に Ruby2-Cdc42(T17N)の細胞質中の量が少ない領域があるわけではない(時刻 03:30、白矢じり)。スケールバー: 10  $\mu$ m。

### 7.3.3. LatA 処理された好中球様 HL60 細胞の場合

アクチン重合が盛んな領域で mRuby2-Cdc42(T17N)の量が低下していることが考えられた。そこで、アクチン重合阻害剤のラトランキュリン A (LatA) 1  $\mu$ M の存在下にて mRuby2-Cdc42(T17N)および Clover-Cdc42(Q61L)の分布を観察した。LatA 存在下では mRuby2-Cdc42(T17N)および Clover-Cdc42(Q61L)は細胞質中に分布し、LatA なしの場合で観察された空間的な分布の偏りは見られなかった (図 7-13)。このことから、mRuby2-Cdc42(T17N)および Clover-Cdc42(Q61L)の分布の偏りと F-actin 構造の関連があると考えられる。

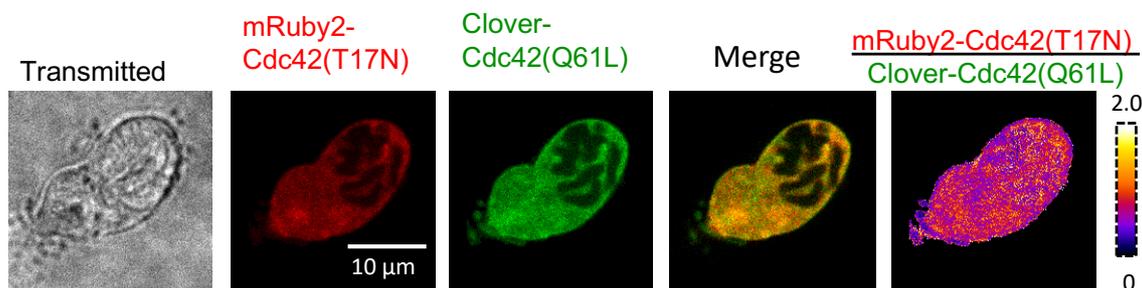


図 7-13 LatA 処理された好中球様 HL60 における Cdc42(T17N) および Cdc42(Q61L)の細胞内分布



## 8. まとめと議論

### 8.1. fMLP 進行波刺激に対する走化性

$T_{transit} = 1$  分の fMLP 進行波刺激に対しては、fMLP 高濃度側への細胞重心の移動は見られなかった(図 4-1, a)。 $T_{transit} = 4, 7$  および 20 分の fMLP 進行波刺激の前面では、高濃度側への重心移動が認められ、 $T_{transit} = 7$  および 20 分の進行波刺激における高濃度側への重心速度は  $T_{transit} = 4$  分の進行波刺激の場合と比較して大きかった(図 4-2)。進行波背面では、進行波の伝搬速度が遅くなるにつれて fMLP 高濃度側への重心速度が上昇することが認められた(図 4-1 b-d, 図 4-2)。また進行波前面・背面での高濃度側への重心速度の差は進行波の伝搬速度が遅くなるにつれて小さくなった。このことから fMLP に対する好中球様 HL60 細胞の走化性運動において、fMLP 高濃度側への運動速度が fMLP 濃度の減少の速さに依存して低下することが示唆される。

先端分子 PI3K および Cdc42 活性を測定したところ、 $T_{transit} = 1$  分の fMLP 進行波刺激に対して、膜周縁部への PI3K 活性のプローブである Akt-PH-Clover の一様な局在が過渡的に見られた(図 5-1 a)。また細胞周縁の Cdc42 活性も同様に空間一様に上昇することが観察された(図 5-3)。このことは  $T_{transit} = 1$  分の進行波で細胞重心の移動がほぼ見られないこととよく対応している。 $T_{transit} = 4$  分の fMLP 進行波刺激の前面にて fMLP 高濃度側に Akt-PH-Clover と活性化型 Cdc42 が局在することが観察された。一方、進行波背面では Akt-PH-Clover と活性化型 Cdc42 の fMLP 高濃度側への局在は見られなかった(図 5-1 b, 図 5-4 a,d)。 $T_{transit} = 7$  分の進行波刺激に対しては、進行波前面・背面のいずれでも fMLP 高濃度側への Akt-PH-Clover と活性化型 Cdc42 の局在が観察された(図 5-1 c, 図 5-5 a,d)。進行波背面では、Cdc42 活性が低下し、fMLP 高濃度側での活性化型 Cdc42 の局在が見られない細胞も認められた(図 5-5 e,h)。実際、 $T_{transit} = 7$  分の進行波刺激に対する重心運動の解析からも、進行波背面において fMLP 高濃度側への移動しない細胞も見られている(図 4-2)。 $T_{transit} = 7$  分の進行波刺激に対する個々の細胞の走化性運動・応答の違いが現れる理由としては、先端形成分子の活性の違いが考えられる。ZCL278 により Cdc42 活性が低下した条件では(図 6-3)、 $T_{transit} = 7$  分の fMLP 進行波刺激に対し、進行波背面での fMLP 高濃度側への移動速度が低下した(図 4-7, 図 4-8)。 $T_{transit} = 20$  分の進行波刺激に対しては、進行波前面・背面のいずれでも fMLP 高濃度側への Akt-PH-Clover と活性化型 Cdc42 の局在が観察された(図 5-2, 図 5-6)。

先行研究によると、好中球の運動速度が fMLP 濃度の増加にともない上昇し、fMLP 濃度の減少に伴い低下することが報告がされている[Geiger et al., 2003]。Geiger らは空間一様に 3.5 分間で fMLP 濃度を 1 nM から 100 nM まで上昇させ、続く 3.5 分間で 100 nM から 1 nM まで減少させる周期刺激に対する好中球の運動を測定し、濃度上昇時に単一の先端

が見られ重心速度が上昇すること、濃度低下時に多方向に複数の仮足を形成し重心速度が低下することを報告している。Geiger らの報告での fMLP 周期刺激の濃度変化率は平均で 28 nM/min であり、本研究の  $T_{transit} = 3$  分の進行波刺激の平均濃度変化率がこれと同等となる。 $T_{transit} = 4$  分の進行波刺激に対して濃度増加する場合で運動速度が上昇し、濃度減少する場合に重心速度が低下することは Geiger らの報告と整合している。Geiger らの実験は空間一様な fMLP 濃度の時間変化であるのに対し、本研究では、fMLP 誘引分子の空間勾配がある場合においても、濃度減少を伴う場合に走化性の低下が見られたことが新規な点である。

## 8.2. fMLP 進行波刺激に対する走化性（阻害剤実験）

### 8.2.1. ZCL278 による Cdc42 阻害の影響

10  $\mu$ M の ZCL278 存在下では誘引分子刺激が無い条件にて Cdc42 活性が低下し、50 nM の fMLP 刺激に対する Cdc42 活性の最大値と変化量のいずれも低下した (図 6-3)。fMLP 進行波刺激に対する走化性運動に関して、以下に薬剤なしの対照実験と比較して異なる点を述べる。進行波刺激の前面・背面のいずれでも、fMLP 高濃度側への移動速度の低下が見られた(図 4-7、図 4-8)。これに関連して、 $T_{transit} = 4$  および 7 分の進行波刺激の背面での fMLP 高濃度側への移動速度に差が見られなかった (図 4-8)。また、高濃度側への移動速度および重心速度の上昇が fMLP 濃度が 5-10 nM となった時点で認められる(図 4-7 c,d)。この結果は、ZCL278 による Cdc42 阻害下では fMLP 刺激への感受性が低下していることを示唆している。このことに関しては、数 nM の fMLP 刺激では Cdc42 活性がほとんど上昇しない、あるいは Cdc42 活性は上昇するが重心運動を引き起こすのに必要な閾値に達しない可能性が考えられる。誘引分子濃度勾配の低濃度域に配置された好中球は高濃度側に運動することによって強度の高い誘引刺激と濃度増加という外部シグナルを受け誘引分子源に到達すると考えられる。一方、低濃度域で走化性運動とランダム運動の小さい細胞は、誘引分子の高濃度域に移動することが少なく、誘引分子源に到達する可能性が小さくなると考えられ、好中球の誘引刺激への追従性能が損なわれている状況であると言える。

### 8.2.2. Y-27632 による ROCK 阻害の影響

Y27632 存在下では、fMLP 進行波刺激に対して、進行波前面での走化性運動速度が薬剤なしの場合と比較して 67-78%に低下した。 $T_{transit} = 4, 7$  および 20 分の fMLP 進行波において、進行波背面での走化性運動速度が 23-35%まで低下し、高濃度側に向かった移動がほとんど観察されなかった (図 4-11、図 4-12)。このことは遅い進行波で見られる進行波背面における走化性運動は ROCK に強く依存した現象であることを示している。Y27632 存在下においても、fMLP 進行波の前面では、先導端分子である Cdc42 の活性化と fMLP 高濃度側への活性型 Cdc42 の局在が観察されたことから (図 5-8、図 5-9、図 5-10)、この時の細胞運動では先導端伸長を駆動力としていると考えられる。進行波背面では、Cdc42 活性が低下し始め、活性型 Cdc42 の局在が消失した。fMLP 濃度の増加により Cdc42 活性が維持されていたこと、および fMLP 濃度の減少によって Cdc42 活性の低下が始まったことが考えられる。濃度減少に伴って、Cdc42 活性が低下する際に Cdc42 活性の空間的な差異が生じにくいことが、濃度減少を伴う濃度勾配における走化性の低下と関連することが考えられる。ROCK はミオシン収縮を促進することが報告されており [Uehata et al., 1997]、濃度減少を伴う場での走化性運動が細胞後端での収縮力に駆動された運動に依存している可能性が考えられる。好中球では外部から誘引刺激を与えない場合にも、網目状のアクチン重合が進行する領域と、ミオシン II に細胞膜近傍が縁取られた領域を確認することができ [Ridley et al., 2003; Tsai et al., 2019]、その構造が細胞の両側(前方と後方)に隔てられた状態が維持され、細胞はランダム運動を示す。それらの2つの領域に局在する分子としては Ras, Rho GTPase, Rho-GEF, Rho-GAP, リン脂質(PIP3, PIP2), PI3K, SHIP およびそれらの下流分子 WASP, WAVE, Formin, Arp2/3, F-アクチン, Moesin, ROCK, MLCK, ミオシン II など多くが知られており、極性形成に至るまでの過程で前方・後方に分布する分子の動的な相互作用があると考えられる。細胞後端にはアクチン・ミオシン、Moesin、RhoA-GEF, RhoA [Wong et al., 2007; Niggli et al., 2008; Liu et al., 2015; Hind et al., 2016; Tsai et al., 2019]が分布している。Moesin をノックダウンされた HL60 細胞は fMLP に対する走化性を示さず、Cdc42 や Rac の活性が誘引分子刺激を行なった場合と同程度に上昇しており、Moesin が Vav1(Rac GEF [Cremasco et al., 2008])または  $\alpha$  PIX(Cdc42-GEF)と結合すること、Moesin と Vav1 または  $\alpha$  PIX(Cdc42-GEF)のダブルノックダウン株では走化性が回復することから、Moesin による Cdc42 または Rac 活性の抑制が走化性に必要であると考えられている [Liu et al., 2015]。また、百日咳毒素存在下で fMLP 高濃度側に後端構造が形成されることから、Gi 依存的な先導端形成分子の活性化に加えて、Gi 非依存に後端形成が活性化されることが報告されている [Xu et al., 2003]。これらは先導端形成分子に抑制的に作用し、細胞後端に局在する分子が走化性に重要な役割を果たすことを示唆しており、先導端がどこに形成さ

れるかという問題に加えて、後端がどこにどのような仕組みで形成されるかという問題も合わせて重要である。特に、ROCK 阻害下にて進行波前面の場合と比べて、背面での走化性運動が顕著に低下したことは、勾配反転あるいは濃度減少を伴う場合の走化性では、ROCK が必要であり、ROCK は先導端分子活性の局在を生じさせること、または細胞後端の収縮による重心移動を駆動することで走化性に寄与している可能性が考えられる。細胞外誘引分子濃度勾配のもとで ROCK 活性の局在が生じるかはわかっていないが、進行波背面での走化性は細胞が自発的に極性を形成する仕組みに負う部分があると思われる。

一方、ROCK 阻害や MLCK (ミオシン軽鎖リン酸化酵素) ノックアウトによって fMLP 受容体である FPR1 の内在化が促進されることが報告されている [Subramanian et al., 2018]。Y27632 の添加により、fMLP の受容体である FPR1 の内在化が薬剤なしの場合と比べて亢進し、受容体シグナルが低下したという可能性がある。ただし、受容体の内在化の程度が薬剤処理をしない場合と比較して、どの程度の違いがあり、その差が方向検出をどの程度押し下げるものであるかを検証する必要がある。リン酸化による内在化が生じない FPR1 (S342D) 変異体 [Liu et al., 2012] を過剰発現した HL60 細胞を対象にすることで、ROCK 阻害による受容体内在化の効果を低減した状態で、fMLP 進行波刺激に対する走化性を測定できると考えられる。

好中球様 HL60 細胞を対象とした研究で、Y27632 処理によって細胞後端に分布する Moesin 分子の局在の持続性が上昇し、同時に運動方向の持続性が上昇することが報告されており [Prentice-Mott et al., 2016]、細胞後端の安定性が細胞の方向転換を妨げている可能性が考えられる。また、細胞性粘菌を対象とした先行研究では、先導端分子によって活性化され、先導端分子を活性化する記憶因子 M を追加し、M に双安定性を与えることによって、先導端分子活性がその履歴に依存する枠組みを提案している [Skoge et al., 2014]。本研究では ROCK 阻害下での fMLP 進行波背面にて、Cdc42 活性の局在の持続は見られなかったことから、Cdc42 活性の履歴依存性(記憶性)があることは考えにくい。一方、先導端分子によって抑制され、先導端形成を抑制する因子  $M_R$  が履歴依存性を持つと考える場合、 $M_R$  による細胞運動の駆動力に応じて、誘引分子の勾配反転に対して細胞の持続的な運動、あるいは反転後の誘引分子高濃度側への運動が抑制されることが考えられる。 $M_R$  の候補としてはミオシン II [Tsai et al., 2019], Moesin [Prentice-Mott et al., 2016], RhoA などが考えられ、ROCK 阻害下にてこれらの分子の fMLP 進行波刺激に対する空間分布の動態を明らかにすることで、上述した可能性を検証できると考えられる。また、濃度減少のみを伴う進行波刺激と釣鐘型進行波刺激背面での走化性運動の違いを調べることで、運動の記憶性と ROCK 阻害下での fMLP 進行波背面での走化性の関連を調べられる。

ROCK 阻害下では、通過時間の遅い  $T_{transit} = 20$  および 30 分の fMLP 進行波に対して、進

行波背面での走化性が観察されなかったことは、走化性に fMLP 濃度の空間勾配だけでなく時間増加が必要である可能性をも示唆している。fMLP 濃度の空間勾配が走化性に十分であるかを明らかにするための方法として、ROCK 阻害下にて fMLP 濃度が空間一様に高い状態から、十分ゆっくりと fMLP 勾配勾配を形成することによって(図 4-4 b)、濃度減少を経て(濃度増加を経ず)形成された fMLP 定常勾配のもとで走化性および先導端分子活性の局在が見られるかを調べることが考えられる。誘引物質濃度勾配を時間変化に基づいて読み取る仕組みとしては、時間増加によって先導端分子活性の明確な前後差[Rappel et al., 2002]が形成され、細胞前方での先導端分子活性の増幅[Mori et al., 2007; Klünder et al., 2013]または細胞後端を形成する分子局在の持続性によって、細胞極性を維持する仕組みが考えられる。PIP3, Rac および F-アクチンの相互作用[Weiner et al., 2002; Wang et al., 2002; Srinivasan et al., 2003; Graziano et al., 2017]は先導端分子活性の増幅に寄与する仕組みと考えられる。Cdc42(Q61L)が先導端に集積すること(図 7-9, 図 7-11, 図 7-12, 図 7-13)は、Cdc42-GAP との相互作用が考えられるが、先導端における Cdc42 活性増幅に関与する可能性も考えられる。

### 8.2.3. NSC23766 による Rac1 阻害の影響

NSC23766 存在下では、fMLP 進行波刺激に対して、進行波前面における走化性に明確な違いは確認されなかった(図 4-13、図 4-14)。Rac1 ノックアウトの初代好中球ではランダム運動速度は野生型と比較して差が見られないが、誘引分子の溶液中の拡散によって形成された安定な濃度勾配 (Zigmond チャンバー) のもとでの高濃度側への移動と細胞極性の配向性が低下したことが報告されている [Sun et al., 2004]。本研究では濃度の時間増加を伴う勾配刺激を与えており、濃度増加によって細胞の方向性運動が補償されている可能性が考えられる。進行波背面では、薬剤なしの場合と比較して高濃度側への運動速度が 40-56% に低下することが認められた(図 4-13、図 4-14)。Rac1 が濃度減少を伴う場合の高濃度側への運動に寄与していることが考えられる。Rac と PI3K との間の相互活性化の経路が阻害され先端伸長の安定性が低下した可能性が考えられる。また走化性運動する好中球様細胞において、細胞の前端から 5  $\mu$ m 後方まで Rac1 活性の高い領域が広がっている一方、Cdc42 活性は細胞の前端で最も高くなることが報告されている [Yang et al., 2015]。Rac1 活性の高い領域が細胞前方でより広範囲であることによって、細胞前方広範囲で Rac1 依存的な網目状アクチンの重合を促進し、細胞の前を安定に維持することに寄与すると考えられる。一方、Cdc42 活性の高い領域が小さいことはより限定された領域でのアクチン重合の促進と膜伸長に寄与すると考えられる。Rac1 阻害によって fMLP 進行波背面での走化性運動が薬剤なしの場合と比較して低下した理由の 1 つとして、Rac1 依存的なアクチン重合の低下が考えられ、Rac1 阻害の有無で F-actin プローブである Lifeact の空間的な分布に違いが見られるかを調べることによって検証できると考えられる。

### 8.2.4. LY294002 による PI3K 阻害の影響

50  $\mu$ M LY294002 存在下では、fMLP 濃度の進行波前面での走化性運動速度について、薬剤なしの場合と比較して有意差は認められなかった。進行波背面では、薬剤なしの場合と比較して高濃度側への運動速度が 45-58% に低下した(図 4-15、図 4-16)。PIP3 産生とそのエフェクター分子 Akt の活性化が約 1/15 まで低下した PI3K  $\gamma$  のノックアウト株では走化性が低下するものの完全には失われない [Sasaki et al., 2000]。一方、PIP3 の脱リン酸化酵素である SHIP のノックアウト株では fMLP に対する走化性が顕著に低下し、PIP3 プローブである Akt-PH の細胞内の局在パターンが消失し、細胞周縁全体でアクチン重合が生じることが報告されている [Nishio et al., 2007]。また PI3K 阻害剤である Wortmannin 存在下では SHIP ノックダウン株の fMLP に対する走化性が回復することから、PIP3 が過剰である

ことが走化性の低下に関与していると考えられている [Nishio et al., 2007]。これらのことから PIP3 を経ない先導端形成のシグナル経路があること、過剰量の PIP3 は細胞周縁全体でのアクチン重合の促進によって、PIP3 に依存しない先導端形成を阻害することが考えられる。また PI3K の阻害剤である LY294002 存在下でランダム運動または走化性運動する細胞の先導端に PIP3 のプローブである Akt-PH の局在が見られないにも関わらず、活性型 Ras, Rac および Cdc42 の先導端での局在に関しては LY294002 の有無によって変化が見られないことが報告されており [Yang et al., 2015]、このことも PIP3 を経ない先導端分子活性制御の経路があることを示している。また Rac と PIP3 生成酵素である PI3K は相互活性化のシグナル経路があるという複数の報告がある。それらの根拠は、RacGEF の PH ドメインが PIP3 と結合し膜上に移送されること [Welch et al., 2002]、PIP3 による Rac の活性化 [Graziano et al., 2017]、膜伸長の促進 [Weiner et al., 2002]、常活性型の Rac による PIP3 の膜局在誘導 [Srinivasan et al., 2003]、アクチン重合阻害剤のラトランキュリン存在下で fMLP 高濃度側への PIP3 (プローブとして Akt-PH-GFP) の局在が低下することである [Servant et al., 2000; Wang et al., 2002]。PI3K 阻害と Rac 1 阻害の効果には類似性が見られたが、その可能性として、上記の PI3K と Rac の協調的な作用が阻害されたことが考えられる。PI3K と Rac1 を同時に阻害した場合に、一方だけの場合と比較して加算的な阻害効果が出るならば、PI3K と Rac1 は好中球の走化性に異なる仕組みで寄与していることが示唆される。PI3K に依存した走化性シグナル経路または PI3K による Rac の活性化が進行波背面での走化性に寄与していることが考えられる。また、Cdc42 の局所的な活性化によって膜伸長が誘導されうることを見てきたが(図 7-3-, 図 7-4, 図 7-5, 図 7-6, 図 7-7)、濃度減少を伴う誘引場での走化性は、ROCK や先導端形成に関わる Cdc42, Rac1, および PI3K が複合的に関与することで実現していると考えられる。

### 8.3. LTB4 進行波刺激に対する走化性

LTB4 進行波に対する好中球様 HL60 細胞の走化性について、fMLP 進行波の場合と異なる点を以下に述べる。

LTB4 濃度の上限が 2 nM または 20 nM のいずれの場合でも、 $T_{transit} = 7$  分の LTB4 進行波刺激に対して細胞は進行波前面では fMLP 高濃度側への移動を示したが、進行波背面では平均として、LTB4 低濃度側に向かってそれまでの移動方向と同じ方向に移動した(図 4-18 b,e)。この結果は  $T_{transit} = 7$  分の fMLP 進行波刺激にて、濃度勾配の反転に引き続いて fMLP 高濃度側に移動したこと(図 4-1 c)とは対照的である。LTB4 の濃度勾配に対して、HL60 細胞は濃度増加を伴う場合には濃度勾配に基づいて運動方向を変えるが、濃度減少を伴う場合には高濃度側に運動方向を変えにくい性質があることが考えられる。LTB4 進行波刺激終了後に濃度上限が 2 nM で  $T_{transit} = 4$  分の進行波刺激の場合を除いて、刺激前と同程度の重心速度が維持されていることは(図 4-18 b-f)、fMLP 進行波にて刺激終了後の重心速度が刺激前よりも低下すること(図 4-1)と対照的である。濃度減少を伴う場合に HL60 細胞が LTB4 高濃度側への運動を示さない仕組みについては 8.4 節にて検討する。

### 8.4. 誘引分子の空間一様刺激に対する Cdc42 応答

細胞性粘菌を対象として、誘引分子 cAMP の一様刺激に対する Ras の活性を Raf1-RBD-GFP を用いて測定した先行研究では、Ras 活性の適応応答の緩和時間が cAMP 濃度によらないこと、cAMP 濃度が低いほど Ras の活性化ピークに達する時間が長くなることが明らかにされ、フィードフォワード型の活性化制御が上記の動態を説明できることが報告されている[Takeda et al., 2012]。

Raichu FRET プローブを用いた先行研究[Yang et al., 2015]にて、光照射により生理活性を持つフォルミルペプチドに変換される fMLP 誘導體 (caged fMLP) を用いた実験にて、一様 fMLP 刺激に対して、Cdc42, Ras, Rac が一過的に活性化され、活性化のピークまでの時間変化に違いが見られないこと報告されている。また好中球様 HL60 細胞を対象として、fMLP 一様刺激に対する PI3K 活性を Akt-PH-GFP をプローブとして測定した結果より、PI3K 活性の動態がフィードフォワード型の制御モデル(図 2-3)で説明できることが報告されている[Tang et al., 2014]。この 2 つの報告では、fMLP 一様刺激に対する先導端分子応答の fMLP 濃度依存性については調べられていない。また fMLP 濃度減少に対する Cdc42 動態は測定されておらず、Akt-PH-GFP の動態にも言及されていない。

本研究では、好中球様 HL60 細胞を対象にして、fMLP の空間一様刺激による Cdc42 活

活性化の fMLP 濃度依存性を測定した。Cdc42 活性は一過的な活性化のあと、刺激前の活性化レベルより 0.1 高い値に収束した。10,100 nM の fMLP 刺激に対して、一過的な活性化応答の緩和時間は約 90 秒であり、1000 nM の fMLP 刺激の場合はより短い約 60 秒であった。fMLP 濃度に依存して、緩和時間が延長しないことから fMLP による Cdc42 活性化制御はフィードフォワード型の制御であると考えられる。1000 nM fMLP 刺激に対する適応の緩和時間が短く、Cdc42 活性が一過的な上昇後に刺激前の値を下回った。fMLP とその受容体 FPR1 (Formyl Peptide Receptor1) との結合定数は約 3 nM であり [Gilbert et al., 2001]、高濃度の fMLP 刺激によって FPR1 の内在化が進行し、fMLP と FPR1 の結合によって伝達されるシグナル強度が実効的に低下した可能性が考えられる。また、1,10,100 nM から 0 M への fMLP 濃度減少に対して、Cdc42 活性が低下し (過減衰)、その程度は 10 nM から 0 M への変化に対して最も大きいことが観察された (図 6-1、図 6-2)。Raichu Cdc42 プロブの FRET 比を指標とした場合、活性化ピーク高さの半分の出力は 1-10 nM の間で現れる。細胞外 fMLP 濃度の変化に対して、濃度減少に対する負の応答と濃度増加に対する正の応答を示すことによって、仮足伸長の停止と新規仮足伸長を交互に実現できることが期待される。

LTB4 一様刺激の場合、1, 10, 100 nM の一様刺激に対して、Cdc42 活性は  $\Delta$ FRET ratio 値にして 0.5 まで上昇し、0.4-0.5 分で刺激前の活性レベルまで緩和した。これらは 100 nM fMLP 一様刺激後の Cdc42 活性の上昇値の 86%、10,100 nM の fMLP 一様刺激に対する Cdc42 活性の緩和時間の 37%であった。LTB4 濃度に依存して、緩和時間が延長しない。このことから LTB4 による Cdc42 活性化制御はフィードフォワード型の制御であると考えられる。また、fMLP は LTB4 と比較して長い時間強く Cdc42 を活性化することが示唆される。fMLP 濃度減少に対して Cdc42 活性は  $\Delta$ FRET ratio 値にして最低-0.2 まで低下したが(10 nM から 0 M への変化において)、LTB4 濃度減少に対してはその値は最低-0.05 であった。

fMLP 刺激に対する適応応答と fMLP 進行波刺激に対する重心運動との関連を検討するため、LEGI モデル [Nakajima et al., 2014] (図 8-1) をもとに進行波刺激に対する先端分子応答の数値計算を行なった (図 8-2 a,c)。パラメータは 10 nM の一様な fMLP 濃度増加に対する Cdc42 FRET ratio 上昇の最大変化量、適応過程の緩和時間の長さ (1.5 分) および一様な fMLP 濃度減少に対する Cdc42 FRET ratio の刺激前からの低下の最大変化量 (図 6-1) を反映した表 8-1 の値を用い、先端分子応答の動態を図 8-2 a に示した。先行研究 [Nakajima et al., 2014] のパラメータのうち、R の活性因子 A の分解速度  $\gamma_a$  および活性因子 I の分解速度  $\gamma_i$  の値をそれぞれ 0.3 倍し、一様刺激に対する適応応答の緩和時間 (過渡的な応答の時間) を延長した。また、抑制因子 I による酵素反応のミカエリス

定数  $K_f$  を先行研究[Nakajima et al., 2014]でのパラメータの 10 倍とし、刺激(S)の低下に対して応答 R が低下する条件とした。また偏微分方程式の数値計算は時間・空間ともに差分法を用いた。空間は 8 分割とし、進行波前面の刺激高濃度側（前方）または低濃度側（後方）での 4 分割の平均を前方・後方の応答 ( $R_+$ ,  $R_-$ ) として、図 8-2 c に図示した。境界条件として、境界での流入が 0 であるとした。通過時間 4 分の進行波前面では  $R_+$  が  $R_-$  を上回りつつ両者ともに上昇し、背面では  $R_+$  と  $R_-$  が低下し、両者の差が小さくなった。通過時間 7 分の進行波前面では  $R_+$  が  $R_-$  を上回りつつ両者ともに上昇し、背面では  $R_-$  が  $R_+$  をわずかに上回りつつ両者ともに低下した。通過時間 20 分の進行波前面では  $R_+$  が上昇して  $R_-$  を上回り、背面では  $R_+$  が低下して  $R_-$  を下回った。

fMLP 進行波刺激に対する Cdc42 活性化動態(図 5-7 b-d)と比較すると、LEGI モデルに基づく数値計算の結果は通過時間 4 分については、進行波前面で Cdc42 活性上昇し、背面で低下することに一致する (図 5-7 b, 図 8-2)。通過時間 7 分については進行波前面で Cdc42 活性の  $I_{Front}$  が  $I_{Rear}$  を上回ることに一致するが、背面で Cdc42 活性の  $I_{Front}$ ,  $I_{Rear}$  の低下は見られずその点は一致しない (図 5-7 c, 図 8-2)。通過時間 20 分については、進行波前面・背面で  $R_-$  の変化が小さい点に一致するが、Cdc42 活性の  $I_{Front}$  の増減が小さい点は一致しない (図 5-7 d, 図 8-2)。

通過時間 4 分の fMLP 進行波背面で高濃度側への移動が見られないことは Cdc42 活性の低下が起り、その過程で Cdc42 活性の空間的な偏りが生じないためであると考えられる。通過時間 7 分の進行波背面では、LEGI モデルで生じる  $R_+$  と  $R_-$  の差はわずかであり、Cdc42 活性についても背面で高濃度側への Cdc42 活性の局在が見られる細胞 (図 5-5 a,d) とそうでない細胞 (図 5-5 e,h) が見られた。Cdc42 活性の局在と膜伸長には対応が見られたが (図 5-5 a, c, d)、背面での走化性や Cdc42 活性の局在は細胞外 fMLP 濃度勾配に加えて、Cdc42, Rac, PI3K および ROCKなどを介した細胞の自発的な前後極性形成に支持されて実現されていることが考えられる。好中球様 PLB985 細胞を対象として、アクチン重合を阻害された場合に Cdc42 活性が細胞内で(細胞質か膜上かは区別されていない)、伝搬し、その伝搬速度の最頻値が 60  $\mu\text{m}/\text{min}$  であり定点での Cdc42 活性変動の周期が 20-30 秒程度であることが報告されており[Yang et al., 2015]、fMLP 濃度減少を伴う過程で Cdc42 活性の早い伝搬が起こっているかも知れない。通過時間 20 分の場合では、通過時間 4,7 分の場合と比較して、Cdc42 活性の前面・背面での変動が小さく、背面での走化性は阻害剤の実験からも Cdc42 だけでなく Rac, PI3K および ROCK が走化性に関与することが考えられる。

また ROCK 阻害下では、進行波背面での走化性がほとんどみらず(図 4-11)、fMLP 一様刺激に対する応答に関して Cdc42 活性化動態に明確な違いは見られなかった(図 6-4)。このことは、fMLP 進行波背面での走化性を理解するためには、細胞外誘引分子刺激による先

導端分子活性制御だけでなく、ROCK に依存した極性形成あるいは Cdc42 活性局在を生じる仕組みがあることが考えられる。

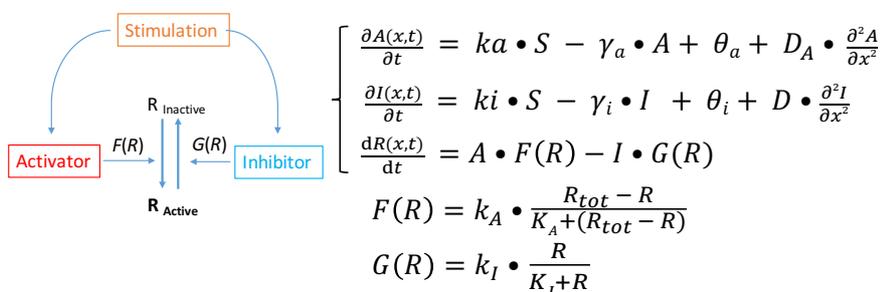


図 8-1 LEGI モデル概要 (Nakajima et al., 2014 をもとに作成、再掲)。

LTB4 の場合、濃度減少に対する Cdc42 活性の変動が小さく、細胞外の LTB4 濃度減少が先導端分子活性に及ぼす影響が小さく、細胞の運動極性の影響が強く現れた運動が現れる可能性が考えられる。 $T_{transit} = 7$  分の LTB4 進行波刺激に対して、濃度減少を伴う勾配において高濃度側への重心移動が平均として見られなかった。この結果に対して、以下が考えられる。1つは進行波の前側で形成された細胞の運動極性（先導端、側方・後端の持続性）と細胞外の LTB4 濃度勾配シグナルのうち前者が上回った可能性である。つまり運動極性は LTB4 の濃度減少によって解体されないこと（シグナル分子の負の応答が起らないこと）、LTB4 の濃度勾配が運動極性の方向を変えるための十分なシグナル強度・時間が不足していたことである。2つ目は、運動極性を持たない細胞においても濃度減少する場合に先導端分子活性が細胞外 LTB4 濃度勾配を反映しない、細胞性粘菌の cAMP 進行波刺激に対する応答(Nakajima et al., 2014)と類似した、仕組みがあることが考えられる。最初に濃度減少を伴う勾配において LTB4 高濃度側への移動が見られず、続く濃度増加を伴う勾配において LTB4 高濃度側への移動が見られたことから(図 4-19)、LTB4 の濃度減少を伴う勾配のもとでの走化性が低下すると考えられ、この結果は後者を支持する。

実際に、一様な LTB4 濃度増加に対する Cdc42 FRET ratio 上昇の最大変化量、適応過程の緩和時間の長さ (0.5 分) および一様な fMLP 濃度減少に対する Cdc42 FRET ratio の刺激前からの低下が小さいこと(図 6-5)を反映した表 8-1 のパラメータを用い、LEGI モデル [Nakajima et al., 2014](図 8-1)をもとに進行波刺激に対する先導端分子応答の数値計算を行なった(図 8-2 b, d)。パラメータは先行研究[Nakajima et al., 2014]での値と  $\theta_a$  および  $\theta_i$  を除いて同じである。通過時間 4,7 分の進行波刺激に対しては、前面にて  $R+$ が  $R-$ を大きく

上回り、背面では  $R_+$ ,  $R_-$  の値が小さく両者の差が小さかった。通過時間 20 分の進行波に対しては、前面にて  $R_+$  が  $R_-$  を上回り、背面では  $R_-$  が  $R_+$  を上回った(図 8-2 d)。本研究では LTB4 進行波刺激に対する Cdc42 応答を取得できていないが、進行波前面で  $R_+$  が  $R_-$  を上回った場合に高濃度側に移動し、進行波背面で  $R_-$  が  $R_+$  を上回った場合に高濃度側に移動すると考えると、LEGI モデルに基づく数値計算の結果(図 8-2 d)と LTB4 進行波刺激に対する細胞の重心運動(図 4-18)には定性的な一致が見られる。

先行研究にて、初代好中球を対象として fMLP 濃度を 10 nM と 0.1 nM の間で 10 秒間隔で切り替える実験にて、fMLP 濃度増加に対して 10% の細胞が 180 度 先端端の向きを変えたことに対し、fMLP 濃度減少に対して 44% の細胞が 180 度 先端端の向きを変えることが報告されている。好中球においてリガンドの受容シグナルは短時間で失われると著者らは述べている。本研究で見られた 10 nM から 0 M への fMLP 濃度変化に対する、Cdc42 活性の一過的な低下は、先端端の向き変えの前の先端端構造の解体に関与すると考えられる。一方異なる細胞の誘引物質刺激に対する応答に着目すると、T 細胞株である CEF 細胞あるいは Jurkat 細胞を対象とし、誘引分子 SDF1 刺激に対して、Rac1, Cdc42 活性の持続的な上昇が見られることが報告されている [Haddad et al., 2001; Nishita et al., 2002]。これは誘引分子刺激に対する応答が適応的であるか否かが、受容体や細胞種別に依存することを示唆している。SDF1 に対する Cdc42 応答に関して活性化の速度、適応応答にかかる時間、濃度減少に対する応答を測定し、fMLP または LTB4 に対する Cdc42 応答と比較することによって、誘引分子の違いに基づく細胞の走化性運動(速度、走化性精度、濃度勾配変化に対する応答性)の違いに関して示唆が得られることが期待される。

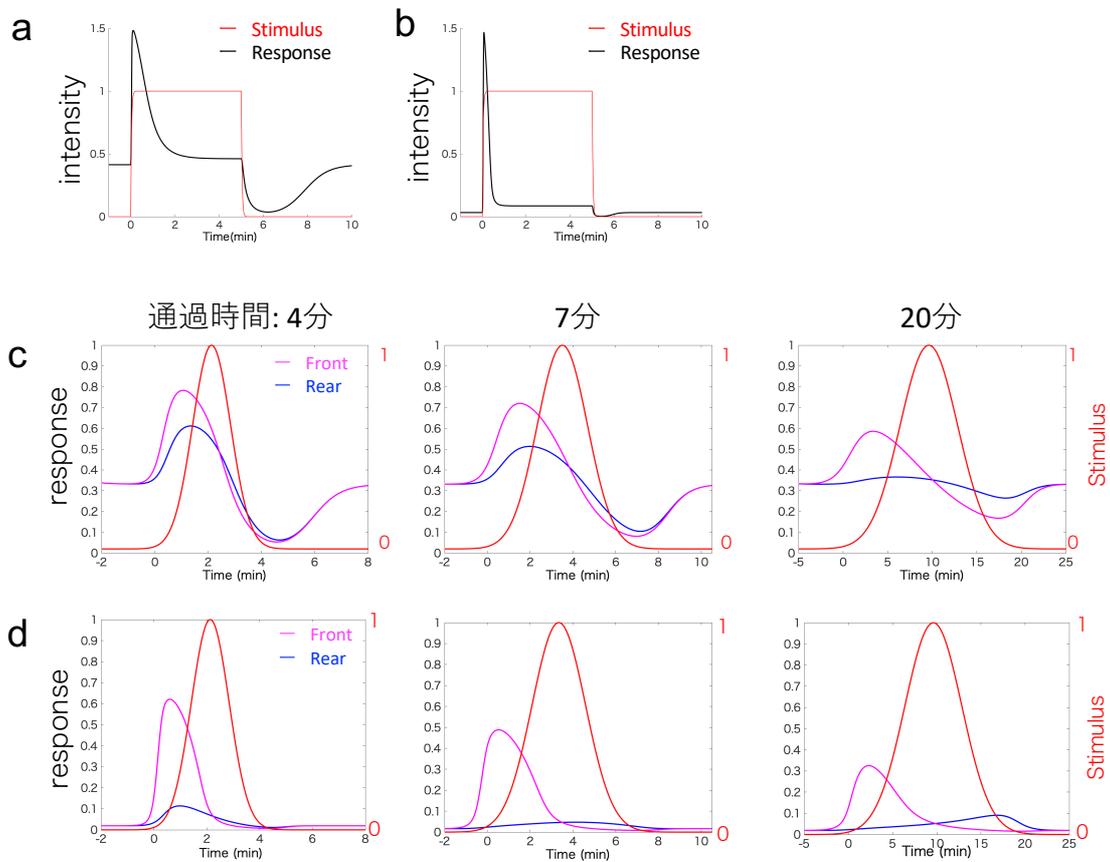


図 8-2 LEGI モデルに基づいた空間一様な刺激または進行波刺激に対する応答のシミュレーション

(a,b) 5分間の空間一様な刺激に対する応答のシミュレーション。黒線は応答、赤線は刺激の時間変化を示す。(c,d) 進行波刺激に対する応答のシミュレーション。赤線は刺激、マゼンタの線は進行波前面での高濃度側(Front)、青線は進行波前面での低濃度側(Rear)における応答を示す。左から進行波通過時間が4,7 および 20 分の場合に対応する。パラメータは (a, c)  $k_a = 2.9 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_I = 0.1$ ,  $\gamma_a = 0.06 \text{ s}^{-1}$ ,  $\gamma_i = 0.03 \text{ s}^{-1}$ , (b, d)  $k_a = 3.3 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_I = 0.01$ ,  $\gamma_a = 0.2 \text{ s}^{-1}$ ,  $\gamma_i = 0.1 \text{ s}^{-1}$ , その他は表 8-1 に記載した共通の値を用いた。(b, d) で用いたパラメータは[Nakajima et al., 2014]での値と  $\theta_a$  および  $\theta_i$  を除いて同じである。

表 8-1 数値計算に用いたパラメータ

パラメータ	値		
$k_a$	2.9 (図 8.1 a,c),	3.3 (図 8.1 b,d),	$s^{-1}$
$k_i$	2.8		$s^{-1}$
$\gamma_a$	0.06 (図 8.1 a,c),	0.2 (図 8.1 b,d),	$s^{-1}$
$\gamma_i$	0.03 (図 8.1 a,c), 0.1 (図 8.1 b,d),		$s^{-1}$
$\theta_a$	0.02		$s^{-1}$
$\theta_i$	0.02		$s^{-1}$
$R_{tot}$	2		-
$k_A$	3		$s^{-1}$
$k_I$	1.6		$s^{-1}$
$K_A$	0.44		-
$K_I$	0.1 (図 8.1 a,c), 0.01 (図 8.1 b,d),		-
$D$	30		$\mu m^2 s^{-1}$
$D_A$	0		$\mu m^2 s^{-1}$
細胞長さ	15		$\mu m$

### 8.5. 光遺伝学を用いた Cdc42-GEF の集積実験

マクロファージ様細胞である Raw264.7 細胞を対象として、Cdc42-GEF である ITSN1 または Rac1-GEF である Tiam 1 を光照射により膜上に集積させることにより、集積させた位置における膜伸長が認められたことが報告されている [O'Neil et al., 2016]。Raw264.7 細胞の場合、局所的な突起構造を形成するもののランダムな重心運動はほとんど見られず、GEF の膜上への集積による細胞の方向性運動の速さを論文の図から算出すると 1-2  $\mu m/min$  であった。

本研究では、10  $\mu m/min$  前後の速度でランダム運動を示す好中球様 HL60 細胞を対象に、Cdc42-GEF の膜上への集積に引き続く細胞形状の変化を観察した。最初に (1) 先端側の片側での Cdc42-GEF の集積に伴い、ランダム運動する細胞の運動方向が Cdc42-GEF の集積した方向へ向きを変えることを観察した。この結果は、先端端における Cdc42 活性の差異が細胞運動方向に偏重を与えられることを示唆している。(2) 球形でランダム運動を示さない細胞を対象にして、Cdc42-GEF の集積により膜伸長が生じることが観察された。このことは Cdc42-GEF の集積により膜伸長という形態変化をも誘導できることを示唆して

いる。(3) 先導端構造が認められる細胞において、細胞の側方に Cdc42-GEF を集積させた場合に、集積位置から膜伸長が生じることが観察された。好中球様 HL60 細胞は、単一の先導端を形成して運動することが高頻度に見られるが、Cdc42 の局所活性が生じることによって、既存の仮足に加えて側方仮足を形成されることが示唆される。(4) ランダム運動する細胞の後端に Cdc42-GEF を集積させた後に、細胞のランダム運動が停止し、Cdc42-GEF の集積位置から膜伸長が生じ、引き続いて重心運動が観察された。このことは、Cdc42-GEF の集積によって、ランダム運動する細胞の運動極性（先導端分子活性や細胞骨格）からの寄与を上回って、方向性運動を誘導できることを示唆している。(5) 誘引分子 fMLP 濃度勾配のもとで高濃度側に運動する細胞の後端に Cdc42-GEF を集積させた場合、fMLP 高濃度側への運動速度が低下と Cdc42-GEF 集積位置での膜伸長と重心移動が観察された。このことは、誘引分子濃度勾配によって生じる細胞内の走化性シグナル分子活性や細胞骨格の配向性を上回って、単一のタンパク質 Cdc42-GEF の集積により膜伸長と方向性運動を誘導できることを示唆している。総じて、局所的な Cdc42 の活性化は細胞の自発的な運動極性や fMLP 濃度勾配下での運動極性を上回って方向性運動を誘起できることが示唆された。このことから、活性型 Cdc42 は細胞の方向性運動を駆動する 1 因子であると考えられ、その細胞内分布が形成あるいは抑制される仕組みを理解することは細胞の方向性運動の理解につながると考えられる。好中球様細胞に関して Rac1 の GEF である Tiam1 を局所的に集積させた場合に、ランダム運動する細胞、形態変化に乏しい細胞および走化性運動する細胞に対して、方向性運動を誘導できるかを調べた研究はなく、Cdc42-GEF を局在させた場合と異なる振る舞いが見られるならば、Cdc42 と Rac の機能的な違いに関して言及できる。Rac の活性化に関わる PI3K $\alpha$ , $\beta$  および  $\delta$  と相互作用する p85 の inter SH ドメイン(PI3K との結合ドメイン)を細胞後方 1/3 に光依存的に集積させることで、前方への移動を妨げることができることが報告されているが[Graziano et al., 2017]、数細胞長にわたる重心移動を誘導するデータは示されていない。また好中球における PIP3 産生をになう PI3K $\gamma$  を局在させた場合には Graziano らの報告と異なる結果が得られるかも知れない。

## 8.6. Cdc42 の活性状態に依存した細胞内分布

グアニンヌクレオチド非結合型の Cdc42(T17N)は細胞前方の伸長領域にほとんど存在しないこと、GTPase 欠損型の Cdc42(Q61L)は細胞前方の伸長領域に分布し、その先端に局在することが観察された。活性型 Cdc42 が先導端に局在する仕組みとして、先導端における

GEF と GTPase 活性化タンパク質 (GAP) に依存した Cdc42-GDP から Cdc42-GTP への変換だけでなく、先導端に局在する分子との相互作用により Cdc42-GTP が先導端に移行・維持される仕組みがあることが考えられる。Cdc42(Q61L)はその GAP と結合することが知られており [Bagci et al., 2019]、先導端に GAP が集積している可能性は考えられる。その場合、Cdc42(Q61L)過剰発現株において RaichuCdc42 FRET プローブを用いた Cdc42 活性あるいは、fMLP 一様刺激に対する Cdc42 応答に違いが現れることが期待される。または Cdc42(Q61L)との結合するタンパク質を質量分析によって調べる方法が考えられる。光遺伝学を用いた Cdc42-GEF の集積実験の結果から、活性型 Cdc42 により膜伸長と細胞の方向性運動が誘起されることが示唆されていることから、Cdc42(Q61L)が先導端に局在を示すことは先導端形成に寄与することが考えられる。また、伸長領域に mRuby2-Cdc42(T17N)が少ないことが観察されたが、この領域にシアン蛍光タンパク質 (mTurquoiseGL) は存在した。mRuby2-Cdc42(T17N)は mTurquoiseGL と比べ 188 アミノ酸だけ大きいとその分子量の違いによって、伸長領域への拡散が阻害される理由を、知る限りで見つけられない。mRuby2-Cdc42(T17N)の伸長領域への流入を阻止する、または伸長領域から排出する仕組みがあることが考えられる。伸長領域に Cdc42(T17N)が少ないことを、先導端での Cdc42-GTP 量に対する Cdc42-GDP 量が少ないことと捉えると、伸長領域では加水分解されて生じた Cdc42-GDP が再び GTP 結合型に変化されやすい環境であることが考えられる。

## 8.7. まとめ

これまで、好中球の走化性において、細胞両端での誘引分子濃度の差に基づいて先導端が形成されることが明らかにされてきた[Servant et al., 2000]。一方で、生体内の炎症反応において好中球の浸潤、炎症部位への集合運動は誘引分子濃度の空間勾配だけでなく、時間的な変動を伴って制御されている [Afonso et al., 2012; Lammerman et al., 2013]。これまで誘引分子の濃度変化が好中球の走化性に与える影響として、誘引分子濃度が空間一様に増加するフェーズで細胞の運動速度が上昇し、濃度減少するフェーズで運動速度が低下することが報告されている [Geiger et al., 2003]。しかし、誘引分子濃度勾配が与えられ、かつ、その濃度が時間的に増減する場合に好中球がいかなる走化性運動を示すかは非自明で、未解決の問題である。本研究では、時間変動する誘引分子濃度勾配における好中球の走化性運動を調べ、誘引分子の空間勾配だけでなく、濃度の時間変化が細胞の極性形成および走化性への影響を明らかにすることを目的とした。

本研究では、誘引分子の濃度変動を伴う空間的に伝搬する勾配刺激（進行波刺激）のもとでの好中球様 HL60 細胞の走化性運動を測定した。その結果、誘引分子 fMLP 濃度の時間減少が早いほど fMLP 高濃度側への細胞の運動速度が低下することが示唆された(図 4-1、図 4-2)。また、生細胞蛍光観察により、fMLP 進行波刺激に対する先導端形成分子である PI3K および Cdc42 活性の時空間動態と細胞の重心移動が対応することが確認された。走化性シグナル分子のうち Cdc42 阻害(ZCL278)、ROCK 阻害(Y27632)、Rac1 阻害(NSC23766)または PI3K 阻害(LY294002)によって、濃度増加を伴う勾配における高濃度側への移動速度が対照の 20-47%、67-78%、72-112%または 97-122%となり、濃度減少を伴う勾配における高濃度側への移動速度が対照の 26-60%、23-35%、40-56%または 45-58%となった(表 4-1, 4-2, 4-3, 4-4)。まとめると、Cdc42 阻害は走化性の運動速度を低下させ、ROCK 阻害は濃度減少を伴う勾配における走化性を大きく低下させた。Rac1 阻害または PI3K 阻害は濃度減少を伴う勾配における走化性を低下させた。誘引分子として LTB4 を用いた場合に濃度減少を伴う勾配において、HL60 細胞が LTB4 高濃度側への運動を示さないことが観察され、好中球様 HL60 細胞にて誘引分子の違いによる走化性運動の違いが確認された。

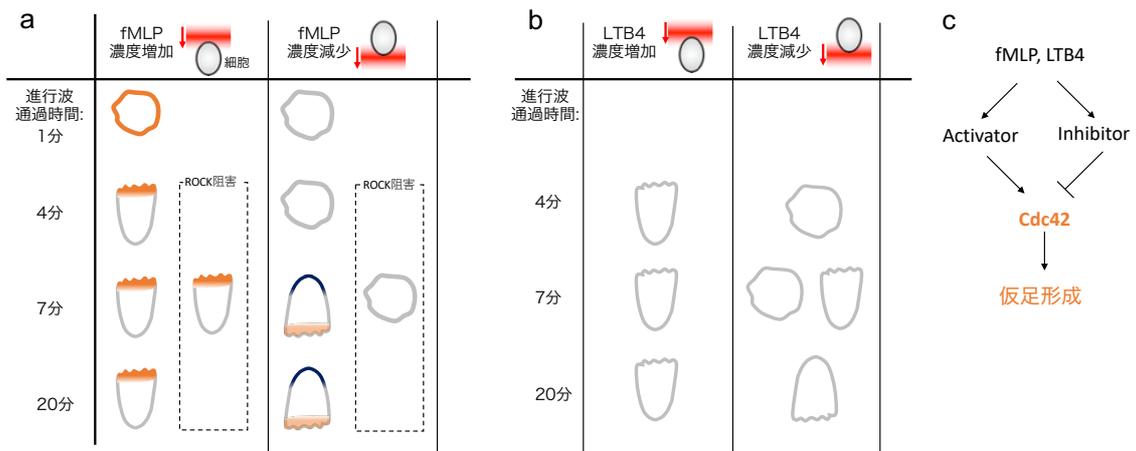
細胞の走化性運動が誘引分子の濃度変化に依存する理由を検討するため、空間一様な誘引分子の増加・減少に対する Cdc42 の活性化応答を測定した。fMLP または LTB4 の一様な濃度増加に対して Cdc42 活性の一過的な上昇が見られ、緩和にかかる時間は fMLP の場合 60-90 秒、LTB4 の場合は約 30 秒であり、濃度依存性は見られなかった。このことから fMLP および LTB4 による Cdc42 活性化制御はフィードフォワード型制御であると考えられる。LTB4 濃度上昇に対する Cdc42 活性の上昇値は、fMLP 刺激の場合の 87%と小さいことが確認された。fMLP 刺激による Cdc42 活性化の持続時間および強度は LTB4 刺激の

場合より大きく、fMLP は細胞外誘引分子として LTB<sub>4</sub> と比べて細胞内のタンパク質活性状態により変調を与えられ考えられる。また fMLP の一様な濃度減少(10 nM から 0 M)に対して Cdc42 活性が刺激入力前の活性レベルよりも低下することが観察され、LTB<sub>4</sub> の濃度減少に対する Cdc42 活性の低下は小さいという結果から、HL60 細胞は fMLP の濃度減少に強く応答することが示唆された。fMLP 進行波刺激において、濃度の時間減少が速いほど走化性運動の低下が見られるのは、fMLP 濃度の減少に対して Cdc42 をはじめとするアクチン重合を促進する分子の活性の低下が起こり、その過程で Cdc42 活性の空間的な偏りが生じないためであると考えられる。また LTB<sub>4</sub> の進行波刺激の場合に、濃度減少を伴う勾配において細胞が走化性運動を示さないことに関しては、濃度減少に伴う Cdc42 活性の低下が小さいために先端形成の阻害効果が小さいこと、fMLP と比較して LTB<sub>4</sub> 誘引作用(細胞外の誘引分子濃度勾配によって、細胞内の先端分子の活性分布を変調する作用)が小さいためであると考えられる。ROCK 阻害下で fMLP 進行波背面での走化性が通過時間によらず低下したこと、fMLP 一様刺激に対する Cdc42 活性化応答は ROCK 阻害による影響を受けないことから、進行波背面での走化性は誘引分子勾配による先端形成に加えて、ROCK に依存した極性形成または活性型 Cdc42 の局在によって実現していることが考えられる。

最後にこれまで測定対象とした Cdc42 活性と膜伸長の因果関係について示唆を得ることを目的とした。光依存的に構造変化を生じ、2量体化するタンパク質の組である、光感受性タンパク質であるフォトトロピンの光・酸素・電位ドメインにポリペプチド SsrA を連結し膜移行配列である KRas Caax モチーフを連結したタンパク質と、SsrA と結合する大腸菌由来タンパク質である SspB に Cdc42-GEF である ITSN1 を結合したタンパク質を発現した細胞を用い、青色光依存的に Cdc42-GEF を膜上に移行させる実験を行なった。局所的な光照射によって Cdc42-GEF の集積を、ランダム運動する細胞の先端領域、球形で仮足形成に乏しい細胞の膜上、ランダム運動する細胞の後端、先端を形成する細胞の側方、fMLP 誘引分子勾配のもとで高濃度側に運動する細胞の後端で実施した場合に、集積位置付近での膜の伸長が観察された。この結果は、好中球の走化性が複数の分子による先端伸長の制御とミオシン収縮の制御および細胞内タンパク質の配置の総体であるもの、多くの場面で局所的な Cdc42 活性により細胞運動が誘導されうることを示唆している。また、細胞内での Cdc42 の空間分布の形成に関する示唆を得るため、GTPase 欠損変異である Cdc42(Q61L)、グアニンヌクレオチド非結合型である Cdc42(T17N)の N 末にそれぞれ蛍光タンパク質を付加したタンパク質を発現する HL60 細胞の生細胞観察を行った。Cdc42(T17N)が細胞前方の伸長領域に分布せず、Cdc42(Q61L)は細胞前方の伸長領域に分布し、先端に強く局在することが観察された。Cdc42 の活性化状態の違いによって、細胞内

での分配が生じることが示唆された。

以上をまとめると、好中球様 HL60 細胞の誘引分子 fMLP および LTB4 に対する走化性が、その濃度減少を伴う場合に低下することが示唆された(図 8-3 a)。PI3K, Rac1, Cdc42 または ROCK の薬剤阻害実験から、fMLP 進行波背面での走化性はいずれの分子を阻害した場合にも低下し、特に ROCK を阻害した場合に顕著に低下した。先導端での膜伸長を制御する PI3K および Cdc42 活性の fMLP 進行波刺激に対する動態を調べたところ、方向性運動と対応が見られたことから、fMLP 濃度が変動する場での先導端分子の時空間動態を特徴付けることを考えた。また光遺伝学的手法を用いた Cdc42-GEF の膜上への集積実験により、局所的な Cdc42 活性化が好中球様 HL60 細胞の膜伸長と方向性運動を誘導する一因子であることを示唆する結果を得たことから(図 8-3 b)、Cdc42 の活性化動態に着目した。誘引分子濃度変化に対する Cdc42 の時間応答性を測定したところ適応応答が観察され、適応時間に濃度依存性は見られないことから、fMLP および LTB4 による Cdc42 活性制御はフィードフォワード型の制御であると考えられた(図 8-3 b)。また、異なる誘引物質 fMLP と LTB4 に対して、Cdc42 活性化の強度および持続時間が異なること、fMLP 濃度減少に対して負の応答が現れることが見出された。これらのうち、fMLP 濃度減少に対する Cdc42 活性の負の応答が、fMLP 進行波背面における先導端形成の抑制に関わることが考えられる。一方、ROCK 阻害下で fMLP 進行波背面での走化性の低下、fMLP 刺激に対する Cdc42 活性化応答は変わらないことから、進行波背面での走化性は誘引分子勾配による先導端形成に加えて、ROCK に依存した極性形成または活性型 Cdc42 の局在によって実現していることが考えられる。LTB4 進行波背面での走化性の低下は LTB4 濃度増減に対する Cdc42 活性の正負の応答が非対称であることによると考えられた。



**図 8-3** (a) fMLP 進行波刺激に対する走化性応答のまとめ。細胞の形状は移動方向を示す。橙は先導端分子(Cdc42 や PI3K)の分布、紺色は細胞後端形成に関わる分子の予想される分布を表現。(b) LTB4 進行波刺激に対する走化性運動のまとめ。細胞の形状は移動方向を示す。(c) fMLP, LTB4 による Cdc42 活性化のフィードフォワード制御と活性型 Cdc42 による仮足形成。



## 謝辞

本研究で用いたプラスミド pPBbsr RaichuCdc42 は京都大学の松田道行教授および基礎生物学研究所の青木一洋教授のご厚意により供与いただきました。ここに感謝申し上げます。

指導教員である澤井哲教授には理想的な研究環境をご提供いただき、大学院過程を通して指導いただき、また多くの貴重なご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

澤井研究室の中島昭彦助教には研究内容、実験方法、データ解析の手法など多くの点でご指導いただきました。厚くお礼申し上げます。

細胞境界のトラッキングには、澤井研究室に在籍していた藤森大平さんが開発された解析プログラムを活用させていただきました。解析プログラムの利用をご快諾頂いたこと、様々なご助言・ご協力をいただきましたことに感謝申し上げます。

澤井研究室の島田 奈央さん、後藤 佳奈子さん、藤城 美奈さん、城川 祐香さん、杉田 登代子さん、中村 充さん、藤森 大平さん、井元 大輔さん、橋村秀典さん、樋渡 翔太郎さん、本田 玄さん、入江 陽一さん、梶ヶ谷 美咲さん、三浦 雄介さん、村山 菜月さんには研究を進めるにあたって、多くのご助言とご協力をいただき、また普段の研究室生活においても様々なところでお世話になりました。ありがとうございました。

本研究を遂行するにあたり、日本学術振興会よりご支援をいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

最後に、これまでの日々の生活を支えてくれた家族と親戚、友人に感謝致します。

## 引用文献

- Afonso, P.V., Janka-Junttila, M., Lee, Y.J., McCann, C.P., Oliver, C.M., Aamer, K.A., Losert, W., Cicerone, M.T., Parent, C.A. (2012). LTB4 Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. *Developmental Cell*, 22(5), 1079-91, 1079-91.
- Albrecht, E. & Petty, H.R. 1998. "Proc. Natl. Acad. Sci., 95(9), 5039-44."
- Allen, W.E., Zicha, D., Ridley, A.J., Jones, G.E. 1998. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J. Cell Biol.*, 141(5), 1147-57.
- Alon, U., Surette, M.G., Barkai, N., & Leibler, S. 1999. Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature*, 397(6715):168{171.
- Andrew, N., & Insall, R.H. 2007. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions. *Nat. Cell Biol.*, 9(2), 193-200.
- Aoki, K., Nakamura, T., Fujikawa, K., Matsuda, M. 2005. Local Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Accumulation Recruits Vav2 and Vav3 to Activate Rac1/Cdc42 and Initiate Neurite Outgrowth in Nerve Growth Factor-stimulated PC12 Cells. *Mol. Biol. Cell*, 16(5).
- Arai, Y., Shibata, T., Matsuoka, S., Sato, M.J., Yanagida, T., Ueda, M. 2010. Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling system for random cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(27),12399-404.
- Aronin, C.E.P., Zhao, Y.M., Yoon, J.S., Morgan, N.Y., Prüstel, T., Germain, R.N., Meier-Schellersheim, M. 2017. Migrating Myeloid Cells Sense Temporal Dynamics of Chemoattractant Concentrations. *Immunity* , 47 (5), 862-874.e3.
- Arriuerloulou, C., Meyer, T. 2005. A local coupling model and compass parameter for eukaryotic chemotaxis. *Dev. Cell*, 8(2), 215-27.
- Artemenko, Y., Lampert, T.J., Devreotes, P.N. 2014. Moving towards a paradigm: common mechanisms of chemotactic signaling in Dictyostelium and mammalian leukocytes. *Cell Mol Life Sci* , 71 (19), 3711-47.
- Berg, H.C. & Brown, D.A. 1972. Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, 239(5374):500{504.
- Bishop, A.L. & Hall, A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* , 348 Pt 2 (Pt 2), 241-55.
- Boulay F., Tardif M., Brouchon L., Vignais P. 1990. Synthesis and Use of a Novel N-formyl Peptide Derivative to Isolate a Human N-formyl Peptide Receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* , 168 (3), 1103-9.
- Byrne, M.B., Kimura, Y., Kapoor, A., He, Y., Mattam, K.S., Hasan, K.M., Olson, L.N., Wang, F., Kenis, P.J.A., Rao, C.V. 2014. Oscillatory behavior of neutrophils under opposing chemoattractant gradients

- supports a winner-take-all mechanism. PLoS One , 9 (1), e85726.
- Camley, B.A., Zhang, Y., Zhao, Y., Li, B., Ben-Jacob, E., Levine, H. and Rappel, W-J. 2013. *Polarity mechanisms such as contact inhibition of locomotion regulate persistent rotational motion of mammalian cells on micropatterns*. Proc. Natl. Acad. Sci., 111 (41), 14770-5.
- Collins, S.J., Gallo, R.C., Gallagher, R.E. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature, 270(5635), 347-9.
- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., Gallo, R.C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5, 2458-62.
- Davidson, A.J., Amato, C., Thomason, P.A., Insall, R.H. 2018. "J. Cell Biol., 217(2), 701-14."
- Devreotes, P.N., Horwitz, A.R. (2015). Signaling networks that regulate cell migration. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 7(8), a005959, a005959.
- Donà, E., Barry, J.D., Valentin, G., Quirin, C., Khmelinskii, A., Kunze, A., Durdu, S., Newton, L.R., Fernandez-Minan, A., Huber, W., Knop, M., Gilmour, D. (2013). *Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient*. Nature, 503( 7475), 285-9, 285-9.
- Farooqui, G., Fenteany, R. (2005). Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. J. Cell Sci., 118, Pt1,.
- Feig L.A., & Cooper G.M. 1988. Inhibition of NIH 3T3 Cell Proliferation by a Mutant Ras Protein With Preferential Affinity for GDP. Mol Cell Biol , 8 (8), 3235-43.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science. 272(5263):872-877.
- Friesland, A., Zhao, Y., Chen, YH., Wang, L., Zhou, H. 2013. Small molecule targeting Cdc42-intersectin interaction disrupts Golgi organization and suppresses cell motility. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A , 110 (4), 1261-6.
- Fritsch, R., De Krijger, I., Fritsch, K., George, R., Reason, B., Kumar, M.S., Diefenbacher, M., Stamp, G., Downward, J. 2013. RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. Cell , 153 (5), 1050-63.
- Fritz-Laylin, L.K., Lord, S.J., Mullins, R.D. 2017. WASP and SCAR are evolutionarily conserved in actin-filled pseudopod-based motility. J. Cell Biol., 216(6), 1673-88.
- Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J., Zheng, Y. 2004. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci., 101 (20), 7618-23.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., Burridge, K. 2011. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. Nat Rev Mol Cell Biol , 12 (8), 493-504.

- Geiger, J., Wessels, D., Soll, D.R. (2003). Human polymorphonuclear leukocytes respond to waves of chemoattractant, like Dictyostelium. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 56(1), 17-44, 17-44.
- Gerard, N.P., and Gerard, C. 1991. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349, 614–617.
- Gilbert T.L., Bennett, T.A., Maestas, D.C., Cimino, D.F., Prossnitz, E.R. 2001. Internalization of the Human N-formyl Peptide and C5a Chemoattractant Receptors Occurs via Clathrin-Independent Mechanisms. *Biochemistry*, 40 (12), 3467-75.
- Goedhart J., von Stetten D., Noirclerc-Savoye M., Lelimosin M., Joosen L., Hink M.A., van Weeren L., Gadella T.W. Jr, Royant A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.*, 3, 751.
- Goedhart, J., van Weeren, L., Hink, M.A., Vischer, N.O., Jalink, K., Gadella, T.W. Jr. (2010). Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat. Methods*, 7(2), 137-9, 137-9.
- Graziano, B. R., Gong, D., Anderson, K.E., Pipathsouk, A., Goldberg, A. R., Weiner, O. D. 2017. A module for Rac temporal signal integration revealed with optogenetics. *J. Cell Biol.*, 216(8), 2515-31.
- Guntas, G., Hallett, R.A., Zimmerman, S.P., Williams, T., Yumerefendi, H., Bear, J.E., Kuhlman, B. 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112(1), 112-7.
- Haddad, E., Zugaza, J.L., Louache, F., Debili, N., Crouin, C., Schwarz, K., Fischer, A., Vainchenker, W., Bertoglio, J. 2001. The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood*, 97(1), 33-8.
- Halavaty, A.S., & Moffat, K. 2007. N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa*. *Biochemistry* 46, 14001–14009.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., Broek, D. 1998. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*, 279, 558-60.
- Hannigan, M., Zhan, L., Li, Z., Ai, Y., Wu, D., Huang, C.K. 2002. Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99(6), 3603-8.
- Harris, T.H., Banigan, E.J., Christian, D.A., Konradt, C., Tait Wojno, E.D., Norose, K., Wilson, E.H., John, B., Weninger, W., Luster, A.D., Liu, A.J., Hunter, C.A. (2012). *Generalized Leukocyte Chemotaxis and the role of chemokines in migration of effector CD81 T cells*. *Nature*, 486( 7404), 545-8, 545-8.
- Hind, L.E., Vincent, W.J.B., Huttenlocher, A. 2016. Leading from the Back: The Role of the Uropod in

- Neutrophil Polarization and Migration. *Dev. Cell*, 38(2), 161-9.  
<https://github.com/fjmrt/BoundaryTrack>.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., and Briggs, W.R. 1997. Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278, 2120–2123.
- Hussain, N.K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C.C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S.E., Kay, B.K., Stossel, T.P., Lamarche-Vane, N., McPherson, P.S. 2001. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat. Cell Biol.*, 3(10),927-32.
- Irimia, D., Liu, S.Y., Tharp, W.G., Samadani, A., Toner, M., Poznansky, M.C. 2006. Microfluidic system for measuring neutrophil migratory responses to fast switches of chemical gradients. *Lab Chip* , 6 (2), 191-8.
- Itoh, R.E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., Matsuda, M. (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell Biol.*, 22, 18, 6582-91, 6582-91.
- Jain, N. & Thanabalu, T. 2015. Molecular difference between WASP and N-WASP critical for chemotaxis of T-cells towards SDF-1  $\alpha$  . *Sci Rep* , 5, 15031.
- Janetopoulos, C., Ma, L., Devreotes, P.N., Iglesias, P.A. 2003. Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 101 (24), 8951-6.
- Kühn, S., Geyer, M. 2014. Formins as effector proteins of rho GTPases. *Small GTPase*, 5, e983876.
- Klunder, B., Freisinger, T., Wedlich-Söldner, R., Frey, E. 2013. GDI-mediated Cell Polarization in Yeast Provides Precise Spatial and Temporal Control of Cdc42 Signaling. *PLoS Comput Biol* , 9 (12), e1003396.
- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., Matsuda, M. (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell*, 22(22), 4647-56, 4647-56.
- Lämmermann, T. (2016). In the eye of the neutrophil swarm--navigation signals that bring neutrophils together in inflamed and infected tissues. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(1), 55-63, 55-63.
- Lämmermann, T., Afonso, P.V., Angermann, B.R., Wang, J.M., Kastenmüller, W., Parent, C.A., Germain, R.N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, 498( 7454), 371-5, 371-5.
- Lam, A.J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J.D., Cranfill, P.J., Baird, M.A., McKeown, M.R., Wiedenmann, J., Davidson, M.W., Schnitzer, M.J., Tsien, R.Y., Lin, M.Z. 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat Methods* , 9 (10), 1005-12.

- Li, CH & Tam, PKS. 1998. An Iterative Algorithm for Minimum Cross Entropy Thresholding. *Pattern Recognition Letters*, 18(8), 771-6.
- Li, R. & Gundersen, G.G. 2008. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9,(11 ), 860-73.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu ,G., Li, L., Liu, M., Huang, CK. Wu, D. 2003. Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell*, 114(2), 215-27.
- Liu, X., Ma, B., Malik, A.B., Tang, H., Yang, T., Sun, B., Wang, G., Minshall, R.D., Li, Y., Zhao, Y., Ye, R.D., Xu, J. 2012. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nat Immunol* , 13 (5), 457-64.
- Lungu, O.I., Hallett, R.A., Choi, E.J., Aiken, M.J., Hahn, K.M., Kuhlman, B. 2012. Designing Photoswitchable Peptides Using the AsLOV2 Domain. *Chem. Biol.*, 19 (4), 507-17.
- Malawista, S.E., and De Boisfleury Chevance, A. 1982. The cytokineplast: purified, stable, and functional motile machinery from human blood polymor- phonuclear leukocytes. *J Cell Biol* , 95 (3), 960-73.
- McGavin, M.K.H., Badour, K., Hardy, L.A., Kubiseski, T.J., Zhang, J., Siminovitch, K.A. 2001. The Intersectin 2 Adaptor Links Wiskott Aldrich Syndrome Protein (WASp)-mediated Actin Polymerization to T Cell Antigen Receptor Endocytosis. *J Exp Med* , 194 (12), 1777-87.
- Meijering, E., Dzyubachyk, O., Smal, I. (2012). Methods for cell and particle tracking. *Methods Enzymol.*, 504(9), 183-200, 183-200.
- Meili, R., Ellsworth, C., Lee, S., Reddy, T.B.K., Ma, H., Firtel, R.A. 1999. Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium. *EMBO J.*, 18(8), 2092-105.
- Miao, Y., Bhattacharya, S., Banerjee, T., Abubaker - Sharif, B., Long, Y., Inoue, T., Iglesias, P.A., Devreotes, P.N. 2019. Wave patterns organize cellular protrusions and control cortical dynamics. *Mol. Syst. Biol.*, 15(3), e8585.
- Miao, Y., Bhattacharya, S., Edwards, M., Cai, H., Inoue, T., Iglesias, P.A., Devreotes, P.N. 2017. Altering the threshold of an excitable signal transduction network changes cell migratory modes. *Nat. Cell Biol.*, 19(4), 329-40.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., Schlaepfer, D.D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(1), 56-68.
- Mori, Y., Jilkin, A., Edelstein-Keshet, L. 2008. Wave-pinning and cell polarity from a bistable reaction-diffusion system. *Biophys J* , 94 (9), 3684-97.
- Nakajima, A., Ishihara, S., Imoto, D., Sawai, S. (2014). Rectified directional sensing in long-range cell

- migration. *Nat. Commun.*, 5, 5367.
- Niggli, V. & Rossy, J. 2008. Ezrin/radixin/moesin: Versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol* , 40 (3), 344-9.
- Nishio, M., Watanabe, K., Sasaki, J., Taya, C., Takasuga, S., Iizuka, R., Balla, T., Yamazaki, M., Watanabe, H., Itoh, R., Kuroda, S., Horie, Y., Förster, I., Mak, T. W., Yonekawa, H., Penninger, J.M., Kanaho, Y., Suzuki, A., Sasaki, T. 2007. Control of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase SHIP1. *Nat Cell Biol* , 9 (1), 36-44.
- Nishita, M., Aizawa, H., Mizuno, K. 2002. Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Mol. Cell Biol.*, 22(3), 774-83.
- O'Neill, P.R., Kalyanaraman, V., Gautam, N. 2016. Subcellular optogenetic activation of Cdc42 controls local and distal signaling to drive immune cell migration. *Mol. Cell Biol.*, 27(9), 1442-50.
- Parent, C. A., Blacklock, B. J., Froehlich, W.M., Murphy, D.B., and Devreotes, P.N. (1998). G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* 95(1), 81-91, 81-91.
- Parent, C.A. and Devreotes, P.N. (1999). A Cell's Sense of Direction. *Science*, 284, 5415.
- Penela, P., Nogués, L., Mayor, F. 2014. Role of G protein-coupled receptor kinases in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* , 27, 10-7.
- Prentice-Mott, H.V., Meroz, Y., Carlson, A., Levine, M.A., Davidson, M.W., Irimia, D., Charras, G.T., Mahadevan, L., Shah, J.V. (2016). Directional memory arises from long-lived cytoskeletal asymmetries in polarized chemotactic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 113(5), 1267-72, 1267-72.
- Rappel, W.J., Thomas, P.J., Levine, H., Loomis, W.F. 2002. Establishing direction during chemotaxis in eukaryotic cells. *Biophys J* , 83 (3), 1361-7.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*, 302(5651), 1704-9, 1704-9.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* , 5 (7), 605-7.
- Riento, K. & Ridley, A.J. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4 (6), 446-56.
- Rincón, E., Rocha-Gregg, B.L., Collins, S.R. 2018. A map of gene expression in neutrophil-like cell lines. *BMC Genomics* , 19 (1), 573.
- Sasaki, A., Firtel, R.A. 2006. Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR. *Euro. J. Cell Biol.*, 85, 873-895.

- Sasaki, T., Irie, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Koziarzki, I., Joza, N., Mak, T.W., Ohashi, P.S., Suzuki, A. Penninger, J.M. 2000. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*, 287 (5455), 1040-6.
- Segall, J.E., Block, S.M., Berg, H.C., 1986. Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83(23):8987-91.
- Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W., Bourne, H.R. (2000). Polarization of Chemoattractant Receptor Signaling During Neutrophil Chemotaxis. *Science*, 287(5455), 1037-40, 1037-40.
- Shi, Y., Zhang, J., Mullin, M., Dong, B., Alberts, A.S., Siminovitch, K.A. 2009. The mDial Formin Is Required for Neutrophil Polarization, Migration, and Activation of the LARG/RhoA/ROCK Signaling Axis during Chemotaxis. *J. Immunol.*, 182(6), 3837-45.
- Shibata, M., Miwa, Y., Morimoto, J., Otsuki, Y. 2007. Easy Stable Transfection of a Human Cancer Cell Line by Electroporation With an Epstein-Barr Virus-Based Plasmid Vector. *Med. Mol. Morphol.*, 40(2), 103-7.
- Shinohara, M., Terada, Y., Iwamatsu, A., Shinohara, A., Mochizuki, N., Higuchi, M., Gotoh, Y., Ihara, S., Nagata, S., Itoh, H., Fukui, Y., Jessberger, R. 2002. SWAP-70 Is a Guanine-Nucleotide-Exchange Factor That Mediates Signalling of Membrane Ruffling. *Nature*, 416 (6882), 759-63.
- Skoge, M., Yue, H., Erickstad, M., Bae, A., Levine, H., Groisman, A., Loomis, W. F., Rappel, W.J. 2014. Cellular memory in eukaryotic chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (40), 14448-53.
- Song, H.K. & Eck, M.J. 2003. Structural Basis of Degradation Signal Recognition by SspB, a Specificity-Enhancing Factor for the ClpXP Proteolytic Machine. *Dev. Cell*, 12, 75-86.
- Sourjik, V. & Wingreen, N.S. 2012. Responding to chemical gradients: Bacterial chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol*, 24 (2), 262-8.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., Bourne, H.R. 2003. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J. Cell Bio.*, 160(3), 375-85.
- Subramanian, B.C., Moissoglu, K., Parent, C.A. 2018. The LTB<sub>4</sub>-BLT1 axis regulates the polarized trafficking of chemoattractant GPCRs during neutrophil chemotaxis. *J Cell Sci*, 131 (18).
- Sun, C.X., Downey, G.P., Zhu, F., Koh, A.L.Y., Thang, H., Glogauer, M. 2004. Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood*, 104(12), 3758-65.
- Sun, C.X., Magalhães, M.A.O., Glogauer, M. 2007. *Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor*. *J. Cell Biol.*, 179(2), 239-245.

- Szczur, K., Zheng, Y., Filippi, MD. 2009. The small Rho GTPase Cdc42 regulates neutrophil polarity via CD11b integrin signaling. *Blood*, 114(20), 4527-37.
- Takeda, K., Shao, D., Adler, M., Charest, P.G., Loomis, W.F., Levine, H., Groisman, A., Rappel, W.J., Firtel, R.A. 2012. Incoherent Feedforward Control Governs Adaptation of Activated Ras in a Eukaryotic Chemotaxis Pathway. *Sci. Signal.*, 5, 205,.
- Takenawa, T. & Suetsugu, S. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. mol. Cell Biol.*, 8(1), 37-48.
- Tanaka, J., Miwa, Y., Miyoshi, K., Ueno, A., Inoue, H. 1999. Construction of Epstein-Barr Virus-Based Expression Vector Containing mini-oriP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264 (3), 938-43.
- Tang, M., Wang, M., Shi, C., Iglesias, P.A., Devreotes, P.N., Huang, CH. 2014. Evolutionarily conserved coupling of adaptive and excitable networks mediates eukaryotic chemotaxis. *Nat. Commun.*, 5, 5175.
- Taniguchi, D., Ishihara, S., Oonuki, T., Honda-Kitahara, M., Kaneko, K., Sawai, S. 2013. Phase geometries of two-dimensional excitable waves govern self-organized morphodynamics of amoeboid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110, 13, 5016-21.
- Tsai, T.Y.C., Collins, S. R., Chan., C. K., Hadjitheodorou, A., Lam, P.Y., Lou, S. S., Yang, H. W., Jorgensen, J., Ellett, F., Irimia, D., Davidson, M. W., Fischer, R. S., Huttenlocher, A. Meyer, T., Ferrell, J. E., Theriot J. A. 2019. Efficient Front-Rear Coupling in Neutrophil Chemotaxis by Dynamic Myosin II Localization. *Dev. Cell*, 49(2), 189-205.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389(6554), 990-4, 990-4.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11(5), 329-41.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., Horwitz, q A.R. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.*, 10(11), 778-90.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Brown R.F., Traynor-Kaplan A.E., Heyworth P.G., Prossnitz E.R., Ye R.D., Marder P., Schelm J.A., Rothfuss K.J. 1995. Investigation of Neutrophil Signal Transduction Using a Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* , 154 (5), 2413-22.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y., Brown R.F. 1994. A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* , 269 (7), 5241-8.
- Wang, F., Herzmark, P., Weiner, O.D., Srinivasan, S., Servant, G., Bourne, H.R. 2002. Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat. Cell Biol.*, 4(7),

513-8.

- Wang, M.J., Artemenko, Y., Cai, W.J., Iglesias, P.A., Devreotes, P.N. 2014. The directional response of chemotactic cells depends on a balance between cytoskeletal architecture and the external gradient. *Cell Rep.*, 9(3), 1110-21.
- Weiner, O.D., Neilsen, P.O., Prestwich, G.D., Kirschner, M.W., Cantley, L.C., Bourne, H.R. 2002. A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat. Cell Biol.*, 4(7), 509-13.
- Weiner, O.D., Rentel, M.C., Ott, A., Brown, G.E., Jedrychowski, M., Yaffe, M.B., Gygi, S.P., Cantley, L.C., Bourne, H.R., Kirschner, M.W. 2006. Hem-1 complexes are essential for Rac activation, actin polymerization, and myosin regulation during neutrophil chemotaxis. *PLoS Biol*, 4 (2), e38.
- Welch, H.C.E., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P.T., Stephens L.R. 2002. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- And Gbetagamma-regulated Guanine-Nucleotide Exchange Factor for Rac. *Cell*, 108 (6), 809-21.
- Wen, X., Xu, X., Sun, M., Chen, C., Pan, M., Wang, J.M., Bolland, S.M., Jin, T. 2019. G-protein-coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis. *Mol. Biol. Cell*, 30(3), 346-56.
- Wong, K., Van Keymeulen, A., Bourne, H.R. 2007. PDZRhoGEF and Myosin II Localize RhoA Activity to the Back of Polarizing Neutrophil-Like Cells. *J Cell Biol*, 179 (6), 1141-8 2007 Dec 17.
- Xu, J., Wang, F., Keymeulen, A.V., Rentel, M., and Bourne, H.R. (2005). Neutrophil microtubules suppress polarity and enhance directional migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 19.
- Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., Bourne, H.R. 2003. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell*, 114(2), 201-14.
- Yang, H.W., Collins, S.R. and Meyer, T. (2015). Locally excitable Cdc42 signals steer cells during chemotaxis. *Nat. Cell Biol.*, 18(2), 191-201, 191-201.
- Yates, J.L., Warren, N., Sugden, B. 1985. Stable Replication of Plasmids Derived From Epstein-Barr Virus in Various Mammalian Cells. *Nature*, 313(6005), 812-5.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y., Shimizu, T. (1997). A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*, 387(6633), 620-4, 620-4.
- Yoo, S.K., Deng Q., Cavnar P.J., Wu, Y.I., Hahn K.M., Huttenlocher, A. 2010. Differential Regulation of Protrusion and Polarity by PI(3)K during Neutrophil Motility in Live Zebrafish. *Dev Cell*, 18 (2), 226-36.
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse

- stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* , 6 (5), 363-9, 363-9.
- Zigmond, S. H. 1977. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* , 75 (2 Pt 1), 606-16.
- Zigmond, S. H., Levitsky, H. I., Kreel, B. J. 1981. Cell polarity: An examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* , 89 (3), 585-92.
- Zigmond, S.H. 1974. Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes. *Nature* , 249 (456), 450-2.