



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。

第3章では、実験に用いた材料、HL60細胞の形質転換の手法、マイクロ流体デバイスを用いた微小空間における誘引分子濃度勾配の制御方法、生細胞観察の方法および画像解析について記した。

第4章では、誘引分子濃度の時間増加・減少を伴う濃度勾配のもとでの好中球様 HL60 細胞の走化性運動の測定結果を記した。濃度の時間減少を伴う場合に、濃度減少が速いほど好中球様 HL60 細胞の走化性運動が低下することが示唆された。先導端形成に関わる Cdc42 を薬剤阻害したところ薬剤阻害なしの場合と比較して、濃度増加を伴う場合、濃度減少を伴う場合のいずれにおいても走化性運動速度が低下した。先導端形成に関わる Rac1 または PI3K を薬剤阻害したところ、濃度増加を伴う場合の走化性にほとんど差は見られなかったが、濃度減少を伴う場合の走化性運動速度が低下した。細胞の後端でのミオシン収縮の促進などに関わる ROCK を阻害したところ、濃度増加を伴う場合の走化性が若干低下し、濃度減少を伴う場合の走化性が顕著に低下した。

第5章では、誘引分子濃度の時間増加・減少を伴う濃度勾配のもとで、好中球様 HL60 細胞の先導端形成分子 PI3K の活性を Akt-PH-GFP を用いて測定した結果、膜伸長との連動性が高いことが報告されている Cdc42 活性を RaichuCdc42 FRET プローブを用いて測定した結果を記した。誘引分子 fMLP 濃度勾配刺激に対して、細胞の運動方向と対応した Akt-PH-GFP および Cdc42 活性の局在が観察された。変動する誘引分子濃度勾配における走化性に関して、先導端形成分子の時間・空間的な動態に基づいて理解できる部分があると考え、時間・空間動態に関して個別に理解を進めることとした。

第6章では、空間一様な誘引分子刺激に対する Cdc42 の時間応答性を RaichuFRET プローブを用いて測定した結果を記した。誘引分子 fMLP の一様刺激に対して、1-1000 nM の範囲で Cdc42 活性の適応的な応答が見られ、適応に要する時間は 60-90 秒であり、顕著な濃度依存性は見られなかった。また一様な fMLP 濃度減少に対して、Cdc42 活性の明確な負の応答が見られ、fMLP 濃度が 10 nM から 0 M に低下する場合に顕著であった。また、誘引分子 LTB4 の一様刺激に対しては、0.1-100 nM の範囲で Cdc42 活性の適応的な応答が見られ、適応に要する時間は約 30 秒であり明確な濃度依存性は見られなかった。LTB4 刺激による、Cdc42 活性の増幅は fMLP 刺激の場合の 86% と小さかった。2 種類の誘引分子刺激に対して、Cdc42 活性化の適応応答が見られ、適応に要する時間に濃度依存性は見られなかったこと、および誘引分子の違いにより適応にかかる時間と Cdc42 活性化の強度に違いがあることが見出された。これらの違いは異なる誘引分子の好中球に対する誘引作用（細胞外誘引分子刺激によって、細胞内のシグナル分子活性を変調する作用）の違いに反映されることが期待される。

第7章では、膜伸長との連動性が高いことが報告されている Cdc42 の機能解析の結果を記した。加えて Cdc42 の空間的な配置に関して示唆を与える結果を記した。最初に、Cdc42 活性と膜伸長の因果関係に関する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ことを試みた。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、先端構造を有する細胞の側方、fMLP 濃度勾配のもとで高濃度側に運動する細胞の後端において実施した場合に、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 活性により膜伸長および細胞運動が誘導されうることを示唆する。一方、活性化型 Cdc42 の空間分布を決める仕組みの理解が好中球様 HL60 細胞の走化性の理解につながる。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変異である 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、伸長領域の先端に局在することが観察された。このことは Cdc42 の活性化状態に依存して、空間分布の違いが生じること示唆している。

以上をまとめると、好中球様 HL60 細胞の誘引分子 fMLP 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。濃度変化を伴う誘引分子勾配における先端形成分子 PI3K 活性と Cdc42 活性の局在動態が方向性運動と対応することから、濃度変動に対する先端分子の時空間動態に依存すると考えられた。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。これは Cdc42 活性動態に基づく方向性運動の理解を支持するものと言える。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、fMLP 濃度減少に対して負の応答が現れるという性質が明らかとなった。また異なる誘引分子 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を見出された。これらのうち、fMLP 濃度減少に対する Cdc42 活性の負の応答が、先端形成の抑制に関わることが考えられる。fMLP 濃度減少を伴う勾配における走化性運動の結果との量的な対応関係に言及するためには、先端分子活性の局所性が生じる仕組みを含む枠組みを検討する必要があると考えられる。