

生理学研究所研究会

「食食細胞機能のイメージング」

プログラム・要旨集

2010年1月20日（水）～ 21日（木）

岡崎コンファレンスセンター

提案：岡村康司（大阪大学医学研究科）

受け入れ・オーガナイズ：永山國昭（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

目次

目次-----	2
プログラム-----	3-4
交通案内と開催場所-----	5-6
周辺案内-----	7
アブストラクト-----	8-14

プログラム

1月20日（水）

16:00～17:00

受付

Session: phagocyte functions（バイオイメーjing学会国際シンポジウム
<http://www.nih.go.jp/niid/bioimaging/isfb.pdf>とのジョイントセッション）

17:00～17:40

Dynamic *in vivo* imaging of osteoclasts and their precursor monocytes in live bones by using intravital 2-photon microscopy

石井 優

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング

17:40～18:10

劇症型 ARDS の発症に關与する Myeloperoxidase -トリイフルエンザ H5N1 感染患者と PR-8 (H1N1) 感染モデルマウスに共通の因子-

Role of neutrophils and myeloperoxidase in severe lung injury in mice with influenza A/H1N1 (PR-8) and in patients with avian flu (H5N1)

鈴木和男^{1,2}、菅又一^{1,2}、富澤一夫²、荒谷康昭⁴、戸高玲子²、大島正道²、佐多徹太郎³、小林和夫²、河内正治⁵、中山俊憲⁶、T. T. B. Phung⁷

千葉大院医 1 炎症制御学・6 免疫発生学、国立感染研 2 免疫部、3 感染病理部、4 横浜市大・国際総合、5 国立国際医療センター麻酔科、7 National Hospital of Pediatrics, Hanoi, Vietnam

18:30～20:30

懇親会

1月21日（木）

9:10～9:50

食作用時の活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化機構

Activation Mechanism for the reactive oxygen-producing NADPH oxidase during phagocytosis

住本英樹

九州大学大学院医学研究院 生化学分野

9:50～10:30

Rac-RhoGDI 複合体の解離・活性化メカニズム -- Rac-RhoGDI 複合体の解離は食胞膜上で起こる--

上山 健彦¹、孫 正賢¹、小林 剛²、斎藤 尚亮¹

1 神戸大学 バイオシグナル研究センター 分子薬理分野、2 名古屋大学 大学院医学研究科 細胞生物物理学

10:30～10:50

コーヒーブレイク

10:50～11:30

電子線クライオトモグラフィー法による T7 様ウイルスのシアノバクテリアへの感染過程の解析

T7 like virus infection of cyanobacteria visualized by electron cryo-tomography

村田和義¹、Wah Chiu²

1 生理学研究所、2 米国ベイラー医科大学

11:30～12:10

イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化による自発運動シグナル発生

Self-organization of phosphatidylinositol lipids signaling for spontaneous cell migration

上田昌宏

大阪大学大学院・生命機能研究科

12:10～13:30

昼食

13:30～14:10

貪食細胞における電位依存性プロトンチャネルの役割

The role of voltage-gated proton channel in phagocytes

大河内善史¹、Antoun El Chemaly²、佐々木真理¹、Serge Arnaudeau²、Nicolas Demaurex²、

岡村康司^{1,3}

1 大阪大学大学院医学系研究科、2 University of Geneva, Faculty of Medicine、3 大阪大学大学院生命機能研究科

(*アンダーライン：発表者)

交通案内

- ・ 関東方面から

豊橋駅（東海道新幹線「こだま号」停車）で名古屋鉄道（名鉄）に乗換え，東岡崎駅下車（豊橋駅－東岡崎駅間約 20 分）南に徒歩約 10 分。

- ・ 関西方面から

名古屋駅で名古屋鉄道（名鉄）に乗換え，東岡崎駅下車（新名古屋駅－東岡崎駅間約 30 分）南に徒歩約 10 分。

- ・ 中部国際空港から

名鉄空港バス「岡崎駅」行で「東岡崎駅」下車（所要時間約 65 分 1600 円）、または、名鉄特急「豊橋」行（10:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00 15:00 16:00 発）で「東岡崎」下車（所要時間約 65 分 1210 円） 東岡崎駅南口に出て徒歩約 10 分。

- ・ 自動車利用の場合

高速道路の岡崎 IC を下りて国道 1 号線を名古屋方面に約 1.5 キロメートル先の「市役所南東」の信号を左折。IC から約 10 分。

※駐車場に限りがありますので、極力自動車の乗り入れはご遠慮願います。ただし、特に必要があつて駐車する場合は、事前にご連絡ください。

飲食店案内



① 一色屋 電話: 0564-52-9882 採点: ★★★★★ (4.00) 住所: 愛知県岡崎市明大寺町字群土18-1 交通: 東岡崎駅から徒歩約11分	② 居食屋和民 東岡崎駅前通り店 電話: 0564-66-1166 採点: ★★★★★ (4.00) 住所: 愛知県岡崎市明大寺町4-11 えきまえPENビル1F 交通: 東岡崎駅から徒歩約2分
③ Cannery row 岡崎店 電話: 0564-54-8000 採点: ★★★★★ (3.31) 住所: 愛知県岡崎市竜美北2-1-8 交通: 男川駅から徒歩約17分	④ 明月 電話: 0564-23-9110 採点: ★★★★★ (4.67) 住所: 愛知県岡崎市明大寺町4丁目27 交通: 東岡崎駅から徒歩約2分
⑤ 王蘭 電話: 0564-53-8391 採点: ★★★★★ (4.00) 住所: 愛知県岡崎市竜美北1丁目5-15 交通: 東岡崎駅から徒歩約12分	⑥ 御用艦 電話: 0564-23-5454 採点: ★★★★★ (5.00) 住所: 愛知県岡崎市明大寺町4丁目19 交通: 東岡崎駅から徒歩約1分
⑦ 炭やきとり ととや 電話: 0564-54-3103 採点: ★★★★★ (3.75) 住所: 愛知県岡崎市明大寺町耳取68-1 交通: 東岡崎駅から徒歩約2分	⑧ ペガサス倶楽部 電話: 0564-26-2345 採点: ★★★★★ (4.00) 住所: 愛知県岡崎市明大寺町出口60-2 交通: 東岡崎駅から徒歩約8分
⑨ 山桜桃 電話: 0564-71-1561 住所: 愛知県岡崎市明大寺町字宮ノ根16-8 交通: 東岡崎駅から徒歩約6分	⑩ ステーキハウス ジャム 電話: 0564-23-4151 採点: ★★★★★ (3.88) 住所: 愛知県岡崎市大西1-6-5 交通: 男川駅から徒歩約11分

* 生理学研究所内にも食堂があります（サングリア）

Dynamic *in vivo* imaging of osteoclasts and their precursor monocytes in live bones by using intravital 2-photon microscopy

Masaru Ishii

Laboratory of Biological Imaging,
WPI-Immunology Frontier Research Center,
Osaka University, Osaka, Japan.

Osteoclasts are bone-resorbing multinuclear giant cells that differentiate from mononuclear macrophage/monocyte-lineage hematopoietic precursors. They play critical roles not only in normal bone homeostasis (“remodeling”), but also in the pathogenesis of bone destructive disorders such as osteoporosis, rheumatoid arthritis and bone metastatic cancers. Although many molecules, M-CSF and RANKL chief among them, are known to play significant contributions in osteoclast differentiation, a critical process that has been less well documented is the trafficking of osteoclast precursors to and from the bone surface, where they undergo cell fusion to form the fully differentiated multinucleated cells that actually mediate bone resorption.

By using an advanced imaging technique with intravital two-photon microscopy I have established a new system for visualizing *in situ* behavior of osteoclasts and their precursors within intact bone tissues (**Figure 1**), and found that sphingosine-1-phosphate (S1P), a lipid mediator enriched in blood, controls the movement of osteoclast precursors between the blood and endosteum (their site of final differentiation). Osteoclast precursor monocytes in bone tissues express functional S1P receptor, and potent S1P receptor agonist stimulated their mobilization *in vivo*. Because S1P concentration in blood is higher than that in tissues, S1P-mediated chemotaxis of osteoclast precursors contributes to their recirculation from bone tissues to systemic blood flow.

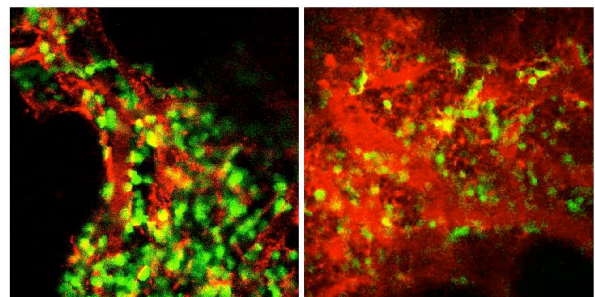


Figure 1. Imaging of live bones by using intravital two-photon microscopy. Granulocytes (LysM-EGFP) (left) and monocytes (CX3CR1-EGFP) (right) are fluorescently labelled, and bone marrow vasculatures are visualized by injecting Rhodamine-conjugated high molecular dextrans.

Osteoclast precursor monocytes in bone tissues express functional S1P receptor, and potent S1P receptor agonist stimulated their mobilization *in vivo*. Because S1P concentration in blood is higher than that in tissues, S1P-mediated chemotaxis of osteoclast precursors contributes to their recirculation from bone tissues to systemic blood flow.

Further examinations are revealing the possible role of several bone-enriched chemokines on the migration control of osteoclast precursors in vivo bone tissues. The bulk of these results support the hypothesis that fine tuning of osteoclast migration mediated by various chemokines dynamically modulates bone homeostasis, suggesting a unique point of action on osteoclastogenesis that may be promising as a future therapeutic target. In this presentation, I will present the latest data on this new concept in the field of bone and mineral researches, and will also show, with plenty of movies, the detailed methodology of intravital bone imaging and discuss its further application in this field.

Reference:

Ishii et al., *Nature*, 458: 524-528, 2009 Klauschen, Ishii et al., *Nature Protoc.* 4: 1305-1311.

**Role of neutrophils and myeloperoxidase in severe lung injury
in mice with influenza A/H1N1 (PR-8) and in patients with avian flu (H5N1)**

K. Suzuki^{1,2}

R. Sugamata^{1,2}, T. Nagao^{1,2}, H., Tomizawa², K. Yamamoto², N. Nakajima², Y. Sato², Y. Aratani³, R. Todaka², M. Oshima², T. Sata², K. Kobayashi², S. Kawachi⁴, T.T.B. Phung⁵, L. Nguyen⁵, T. Nakayama¹

¹Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, ²National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, ³Yokohama City University, Yokohama, ⁴International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan, ⁷National Hospital of Pediatrics, Hanoi, Vietnam

Background: Avian influenza A (H5N1) infection causes fulminant acute respiratory distress syndrome (FARDS) [Kawachi, et al. J. Infect. Dis. 2009; 200: 510-515]. Here, we analyzed the key objective in the initial step of IFV infection using mouse-adapted H1N1 influenza virus PR-8.

Methods: IFV-PR8 (H1N1) was inoculated into BALB/c and myeloperoxidase (MPO)-deficient mice (MPO-KO) intranasally. Lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and plasma were analyzed in cytokines-chemokines and mRNA expressions.

Results: Intensive infiltration with inflammatory cells of the lung and many neutrophils and epithelial cells presented in BALF 3-4 days after inoculation with IFV. In addition, levels of IL-1 α , - β , GM-CSF, KC in BALF were increased 2 days, although these were undetectable one day after the inoculation. MCP-1, IL-6, G-CSF, and IL-12p40 increased in BALF at 4 days. In MPO-KO mice, lung injury developed less intensive than that in wild mice. MPO activity in plasma and nasal fluid of patients with avian flu (H5N1) increased with severity of lung injury.

Conclusions: A simultaneous increase of KC strongly suggests induction of infiltration of a large number of neutrophils into BALF to digest IFV and development of lung injury. Finally, these observations suggest released MPO from neutrophils may induce lung injury as well inactivation of IFV. These observations are similar to those in patients with avian flu H5N1 in Vietnam.

食作用時の活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化機構

住本 英樹

九州大学大学院医学研究院 生化学分野

食細胞の1つである好中球は、微生物の侵入局所に速やかに集まり、侵入微生物を認識・貪食し殺菌する。この殺菌過程には活性酸素が極めて重要な役割を演じるが、その活性酸素生成を担うのが食細胞 NADPH オキシダーゼである。本酵素は細胞休止時には不活性型であるが、微生物の食作用 (phagocytosis) 時にファゴゾーム膜上で活性化されスーパーオキシド (O_2^-) を生成するようになる。 O_2^- それ自身の殺菌能は余り強くないが、 O_2^- が生成するとそれに由来する種々の活性酸素が強力な殺菌剤として働くことになる。オキシダーゼの酵素本体である膜蛋白質 gp91^{phox} (p22^{phox} と 2 量体を形成) は、細胞膜との特殊顆粒 (好中球の細胞内顆粒の 1 つ) の膜に多量に存在する。ファゴゾーム膜は、細胞膜ばかりでなく、食作用中にファゴゾームと融合する細胞内顆粒の膜にも由来するので、ファゴゾーム膜には gp91^{phox}-p22^{phox} 複合体が enrich されることになる。しかし、これだけでは O_2^- の生成は起らない。gp91^{phox} が活性化され O_2^- を生成するには、細胞休止時には細胞質に存在する 3 つの特異的蛋白質 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) と低分子量 G 蛋白質 Rac が必要である。食作用時に、p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox} の 3 者複合体と Rac は細胞質から別々にファゴゾーム膜に移行するが、ファゴゾーム膜上で p67^{phox} は Rac と結合して gp91^{phox} の構造変化を引き起こし、その結果として gp91^{phox} の活性化 (O_2^- 生成) が起こる。3 者複合体のファゴゾーム膜への移行には、(1) 食作用時にリン酸化され活性化された p47^{phox} の「SH3 ドメインを介した膜蛋白質 p22^{phox} との結合」および「PX ドメインを介した膜リン脂質との結合」、(2) 閉じたファゴゾーム膜 (closed phagosome) で生成されるホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) と p40^{phox} との結合、等々が必要である。3 者複合体の膜移行に関与する蛋白質-蛋白質相互作用と蛋白質-リン脂質相互作用、および食作用時のリン脂質代謝について私達の最近の知見を中心に紹介する。

Rac-RhoGDI 複合体の解離・活性化メカニズム **----- Rac-RhoGDI 複合体の解離は食胞膜上で起こる -----**

上山 健彦¹ 孫 正賢¹ 小林 剛² 斎藤 尚亮¹

¹ 神戸大学 バイオシグナル研究センター 分子薬理分野

² 名古屋大学 大学院医学研究科 細胞生物物理学

【背景】 貪食細胞における NADPH oxidase (Nox)である Nox2 の活性化には、膜成分である flavocytochrome b_{558} (heterodimer of Nox2 and $p22^{phox}$) と、細胞質成分である $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ の複合体 ($p40^{phox}$ - $p47^{phox}$ - $p67^{phox}$ complex) と small GTPase Rac との膜での複合体形成が必須である。また、 $p40^{phox}$ - $p47^{phox}$ - $p67^{phox}$ complex と Rac は、独自のメカニズムにより、膜にターゲットすることが知られている。Rac は、静止時には RhoGDI と複合体を形成し不活性化型として細胞質に存在するが、刺激時には活性化型として膜上で機能する。RhoGDI からの解離が、Rac 活性化の必修のステップであることは周知の事実であるが、この現象が細胞内のどこで、どのようなメカニズムにより起こるのか、などの詳細はわかっておらず、漠然と細胞質内で起きていると信じられてきた。今回我々は、Rac の RhoGDI からの解離および活性化が、細胞内のどこで起こるのか、更に、そのメカニズムの解明を行った。

【結果】 貪食細胞に、Phospholipase D2 (PLD2) を過剰発現させると、Rac-RhoGDI 複合体の膜での集積が増強したが、ROS 産生の増加は軽度であった。一方、Rac 特異的な Guanine nucleotide exchange factor (GEF) である Tiam1 の過剰発現では、Rac の集積の増強は誘導できず、ROS 産生量の増加も軽度なものであった。しかし、PLD2 と Tiam1 を共発現させると、著名な ROS 産生の増加が観察された。

【考察】 貪食時の Rac の活性化には、少なくとも 1. Rac-RhoGDI 複合体の膜移行、2. 膜上での Rac の RhoGDI からの解離・活性化、という 2 つのステップが存在すると考えられた。

電子線クライオトモグラフィー法による T7 様ウイルスのシアノバクテリアへの感染過程の解析

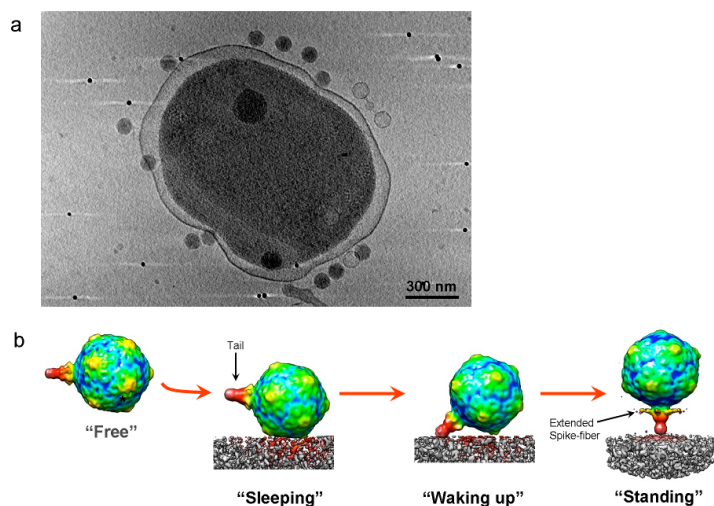
村田和義¹、Wah Chiu²

¹ 生理学研究所、² 米国ベイラー医科大学

T7 様ウイルスは、分子生物学的に最も良く調べられているウイルスの一つである。構造的特徴としては、正二十面体からなるキャプシドに二重鎖 DNA を格納し、そのペントンの一つに、6 本のスパイクファイバーで囲まれた伸縮しない短いテイルを持つ。そして、このテイルを宿主の細胞膜と結合させて、そこからファージ DNA を宿主に注入する。ところが、その細菌への感染過程の構造学的な詳細についてはあまり知られていない。本研究では、細胞の中でも比較的小さなサイズのシアノバクテリア *Prochlorococcus* MED4 (直径 $\sim 0.5 \mu\text{m}$) を用い、これに特異的な T7 様ウイルス P-SSP7 を感染させて、その過程を電子線クライオトモグラフィー法で調べた。MED4 を P-SSP7 と混ぜて、経時的に、マイクログリッドを支持膜として厚さ約 200 nm のアモルファス氷の中に包埋すると、自然に近い感染途中の細胞とファージの像を得ることができる (図 1a)。この傾斜像をエネルギーフィルターを備えた 300kV の電子顕微鏡を用いて 2° 間隔で $\pm 62^\circ$ の範囲で記録し、そのバックプロジェクションから 3 次元トモグラムを再構成した。そして、そのトモグラムから細胞の周りに吸着したファージ像を切り出し、分類して平均化すると、感染途中の詳細なファージの 3 次元構造を得ることができた。細胞壁表面に吸着したファージは、細胞表面とテイルとの角度によって 3 種類に分類することができた (図 1b)。吸着したファージの 50% はその様相から休眠状態 (Sleeping) であることがわかった。さらに、テイルの周りにあるスパイクファイバーと呼ばれる器官の構造変化を 3 次元像の多変量解析により調べた結果、ファージの吸着過程が進むにつれて、キャプシドの表面に沿って折りたたまれたスパイクファイバーが、テイル先端方向に持ち上がり、テイルに対して垂直に伸びることがわかった。このことから、スパイクファイバーの構造変化が、

ファージの吸着過程において重要な役割をしていることが示唆された。

図 1 a) MED4 に感染させた P-SSP7 の 3 次元トモグラムスライス b) P-SSP7 の細胞表面への吸着過程



イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化による自発運動シグナル発生

上田昌宏

(大阪大学大学院・生命機能研究科)

細胞の様々な機能が分子反応ネットワークの自発的ダイナミクスから自律的に発現する仕組みの解明は、細胞生物学における中心的な課題の一つである。我々は特に「熱ゆらぎの中で確率的に作動する生体分子からどのようにして情報処理機能が発現するのか？」という問いに興味がある。細胞の自発的ダイナミクスが顕著に現われている現象として、細胞の自発運動が挙げられる。細胞は、しばしば環境に刺激が無くても自律的に運動装置を制御し、方向転換を繰り返しながら運動して、環境を広く探索する。刺激があってはじめて環境を探索するのではなく、自発的な探索を行った上で刺激に応じてよりよい環境を見つけ出す。こうした自発運動を引き起こすためには、細胞内部で何らかのシグナルが自発的に発生していると考えられる。

これまで我々は、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* のアメーバ細胞において、貧食や走化性運動、自発運動に関与するイノシトールリン脂質代謝系の時空間ダイナミクスを解析してきた。自発的に運動している粘菌細胞では、イノシトールリン脂質の $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ が前進端の仮足に濃縮し、細胞の後ろ側にはない。こうした $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ 局在の時空間ダイナミクスをイメージングするために、Akt/PKB の PH ドメインと PTEN を蛍光標識し、プローブとして用いた ($\text{PH}_{\text{Akt/PKB}}\text{-GFP}$ と PTEN-Halo-TMR)。 $\text{PH}_{\text{Akt/PKB}}$ は $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ に結合し、PTEN は $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ の分解にはたらく蛋白質である。アクチン骨格系を破壊した細胞において環境からの刺激がない状況で両プローブ蛋白質の内在的なダイナミクスを観察した。その結果、 $\text{PH}_{\text{Akt/PKB}}\text{-GFP}$ と PTEN-Halo-TMR は細胞膜上で相互排他的に局在化し、両タンパク質の局在部位が細胞膜上に沿って回転する様子が観察された (自己組織化的進行波形成)。イノシトールリン脂質代謝系の様々な阻害剤を用いて進行波形成を止めると、細胞の自発運動が阻害された。イノシトールリン脂質代謝系の分子反応ネットワークを考慮する事で、反応拡散方程式を用いてこの進行波形成を数理モデル化できる。そのモデル解析により、ミクロのゆらぐ分子からマクロの動的秩序 (極性) が自己組織化されることを通して、自発運動シグナルが発生することが分かってきた。このシステムにおけるノイズロバストな情報処理機能の発生メカニズムについて議論したい。

貪食細胞における電位依存性プロトンチャネルの役割

大河内善史¹、Antoun El Chemaly²、佐々木真理¹、Serge Arnaudeau²,
Nicolas Demaurex²、岡村康司^{1,3}

1 大阪大学大学院医学系研究科、2 University of Geneva, Faculty of Medicine、

3 大阪大学大学院生命機能研究科

マクロファージ・好中球などの貪食細胞は、病原菌・死細胞などを貪食し、殺菌・除去することで、感染症・自己免疫疾患などの疾病から自己を防御している。活性酸素は、貪食細胞の殺菌システムにおける強力な武器であり、NADPH オキシダーゼを介して産生され、その活性は厳密に制御されている。NADPH オキシダーゼは、NADPH から電子を奪い、酸素に受け渡すと同時に、副産物として細胞内にプロトンを放出するため、細胞膜は脱分極し、細胞内は酸性化する。このため、貪食細胞には、膜電位と細胞内 pH を制御する因子が必要と考えられていた。電気生理学的な手法を用いた解析により、電位依存性プロトンチャネルの関与が示唆されていたが(Decoursey, Physiological review 2003)、その分子実体は長い間不明であった。我々の研究室で発見された電位依存性プロトンチャネル VSOP(voltage sensor only protein)は、貪食細胞で発現しており、電位依存性プロトンチャネルの特徴を保持していた。我々は、貪食細胞における VSOP の機能を調べるために、抗体を作成し、好中球から分離した食胞について、ウェスタンブロット法を用いて発現を調べた結果、VSOP は食胞に存在することが明らかとなった。次に、ノックアウトマウスを作成し、NADPH オキシダーゼの活性化と連動した VSOP の機能解析に着手した。好中球を PMA で刺激し、活性酸素量を定量した結果、ノックアウトマウスの好中球では、野生型マウスに比べて、産生量が低下していた。さらに、PMA 刺激により、好中球の膜電位の異常上昇、細胞内 pH の低下が見られ、VSOP が食胞において膜電位と細胞内 pH を制御する分子そのものであることが明らかになった。我々は、次のステップとして、VSOP が、NADPH オキシダーゼの活性化と連動して、食胞の膜電位と細胞内 pH を制御する機構を理解したいと考えている。そのために、現在、VSOP と NADPH オキシダーゼの物理的な相互作用について検討している。

1. Okochi et al., BBRC 2009

2. Chemaly et al., J.Exp.Med. in press