

令和元年6月14日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19574

研究課題名(和文)一分子計測によるリンパ球動態制御法の開発

研究課題名(英文) Development of lymphocyte trafficking regulation using single-molecule measurement

研究代表者

木梨 達雄 (KINASHI, Tatsuo)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：30202039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：LFA-1はICAM-1に対してダイナミックに接着を変化させる過程で、低分子量G蛋白質 Rap1、インテグリン結合蛋白質 talin1, kindlin3が必須であった。一分子イメージングによって、talin1が ICAM-1結合動態を決定していること、Rap1は talin1のリクルートに必要であること、同時双方向性 inside-out/outside-inシグナルによる Rap1活性化の増幅が重要な接着のチェックポイントであることが判明した。kindlin3は高親和性結合に必要であるが、talin1の結合には影響をあたえず、Rhoシグナルが talin結合時間を調節していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ球は生体内を移動しながら病原微生物などの異物の侵入を監視し、生体防御を行っている。白血球インテグリンはリンパ球の接着因子として活発な移動や異物の排除に重要な役割をはたしているが、その調節機構について不明な点がおおく、過剰なリンパ球が集積することが特徴である慢性炎症やアレルギーの薬剤開発が困難である。本研究は接着過程に重要な分子として Rap1, talin1, kindlin3が接着過程の重要なチェックポイントとして機能しているメカニズムを発見した。この発見によって白血球インテグリンの制御法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lymphocyte trafficking is dynamically regulated by modulating adhesiveness of leukocyte integrin LFA-1 to ligand ICAM-1. Small GTPase Rap1 and integrin-associated molecules, talin1 and kindlin3 play essential roles during this process. By establishment of single-molecule imaging of Rap1, talin1, and kindlin-3, we found that talin1 binding kinetics with LFA-1 determined LFA-1 binding kinetics to ICAM-1. Rap1 was required for talin1 recruitment to LFA-1, but did not affect binding lifetime of talin1. Our study revealed that simultaneous bidirectional signals of inside-out and outside-in amplified Rap1 activation, which was a critical checkpoint for adhesion. Furthermore, kindlin3 was required for high-affinity binding to ICAM-1, but did not affect talin1 binding kinetics. Instead, Rho signaling regulate talin1 binding lifetime.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 インテグリン 一分子計測 Rap1 talin kindlin3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好中球やリンパ球などの免疫担当細胞に発現する白血球インテグリンの特性は、ケモカインや抗原刺激によって速やかに一過性に接着性が亢進することであり、この特性ゆえにリンパ球は血管内皮への接着や通過、抗原探索、抗原提示細胞との接着(免疫シナプス)が誘導されると考えられている。申請者は世界に先駆けて低分子量 G 蛋白質 Rap1 が白血球インテグリン LFA-1 を活性化する inside-out シグナルとして機能することを発見した。そして Rap1-GTP 結合蛋白質 RAPL を介して Ste20-like キナーゼ Mst1 を介して LFA-1 の接着性を亢進させることを報告してきた。また 2 光子顕微鏡を用いたリンパ節の in vivo イメージング、胸腺組織ライブイメージングを開発し、血流中のリンパ球が一秒以内に接着する過程、組織内をランダムに移動し抗原を探索する過程、抗原提示細胞との抗原特異的接着(免疫シナプス)過程に Rap1 シグナルによるインテグリン接着制御が重要な役割を果たし、生体内で時空間的に多様な移動や定着を可能にし、免疫システムの重要な基盤となっていることを明らかにしてきた。しかし、多くの研究がインテグリンの構造解析、あるいは立体構造や親和性の変化を抗体や可溶性リガンドを用いるなど、実際の接着過程とかけ離れた測定系から推察しているため、実際の移動や停止が細胞内シグナルからどのように制御されているのか、解析が困難であった。そこで申請者は独自に人工脂質二重膜に光退色抵抗性の色素でラベルした ICAM-1 を発現させ、自由拡散する ICAM-1 を一分子追跡することによって LFA-1/ICAM-1 結合の局在と結合時間の測定系を樹立し、リンパ球の移動や停止における特徴的な結合パターンや揺らぎを明らかにすることに成功した。一分子計測技術の確立とともに、本申請に至ったもう一つのきっかけは Rap1a/Rap1b、talin1、kindlin-3、LFA-1 の遺伝子欠損リンパ球株および欠損マウスが樹立できたことである。これらに可視化した分子を当該欠損リンパ球に戻すことによって主要な制御分子の一分子追跡が効率よく計測できる環境が初めて整った。本計画では、いまだ確立されていない Rap1 の活性化、および talin、kindlin3 と LFA-1 との結合・解離の一分子計測樹立にチャレンジし、Rap1 シグナルによるインテグリン結合動態の分析系として統合する。この基盤技術が確立されれば、各過程の制御を操作し、動態を改変する技術革新につながる。

2. 研究の目的

申請者らは LFA-1/ICAM-1 の結合動態を接着の場で一分子レベルで測定する技術を確立し、揺らぎが大きい、1~3 秒程度の結合持続時間をもつ低親和性結合と 10 秒以上の結合持続時間をもつほとんど停止した高親和性結合が検出され、免疫シナプスやケモタキシスによる細胞移動過程で特徴的に局在していることを見出した。この測定技術は細胞がどの方向に移動するのか、停止するのか予測し、その制御ポイントを解明する突破口になると期待される。そこで、インテグリン結合による多様な動態を可能にしている Rap1 活性化過程、talin、kindlin-3 と LFA-1 の結合過程を一分子計測する実験系を樹立し、接着・移動の可塑性や安定性を調節する LFA-1/ICAM-1 結合のしくみ、動力学的校正モデルの検討および各過程の操作による生体内動態・抗原探索の最適化を目指す。この技術開発によってインテグリンを介する接着動態の制御ポイントが明確になり、移動のランダム性、停止の安定性を増減させ、抗原探索・認識の効率化、集積を阻害するなど、免疫療法や難治性免疫疾患の新たな治療法の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) Rap1、talin1、kindlin3 の重要性

Cre-loxP による T 細胞系列に特異的に Rap1a/Rap1b、talin1、kindlin3 を欠損させたマウスから T 細胞を単離し、白血球インテグリンである LFA-1/ICAM-1、 $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1、 $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1 に対する接着を調べる。リガンドをコートした flow chamber を用いて一定の shear stress 下での接着(detachment assay)、および灌流下での rolling/arrest 接着の効率を測定する。また、マウスリンパ球細胞株(BAF 細胞)を用いて Rap1a/Rap1b、

taln1、kindlin3 を Crispr/Cas9 による indel 導入により欠損細胞を作成し、白血球インテグリンを介する接着障害を detachment assay、反射干渉像による接着面積によって調べる。

(2) Rap1, talin1, kindlin3 の一分子計測用のコンストラクト構築

一分子可視化のため、halotag (HT)を付加した Rap1a または Rap1b, talin1, kindlin-3 を作成する。(1) で作成した当該遺伝子を欠損 BAF 細胞株に導入することによって接着障害が回復するか確認する。taln1 については全長および talin1-head について作成し、同様の実験を行う。

(3) LFA-1 と talin1、kindlin3 相互作用計測用細胞の樹立

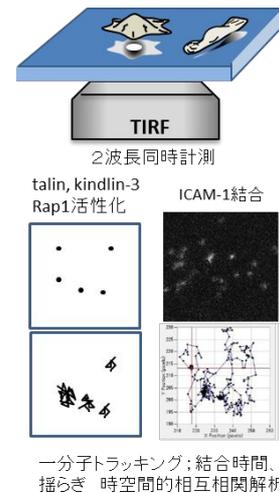
taln1 あるいは kindlin3 欠損 BAF 細胞株にヒト α L 及び β 2、あるいはそれらの細胞内変異体(BAF/LFA-1)を導入し、さらに HT-talin1、HT-kindlin3 を導入して野生型 LFA-1 の接着が回復することを確認する。

(4) Rap1 可視化細胞株の樹立

Rap1a/Rap1b を欠損した BAF/LFA-1 を作成し、SNAP-Rap1b を導入し、LFA-1 接着障害が回復するか確認後、恒常活性化型、不活性化型 Rap1 も同様に作成し、調べる。また、活性化を可視化する Rap affinity probe の導入 Rap1 活性化を可視化する退色抵抗性の蛍光プローブを作成細胞膜上の Rap1 活性化を検出方法として、Rap1-GTP に結合するドメインを利用した Rap affinity probe を用いる。Rap affinity probe は Ral-GDS 由来の RBD ドメインと蛍光蛋白質を融合させた分子である。光退色抵抗性の ATTO647N でラベルした膜透過性 halotag (HT)リガンドを作成し、マクロ観察および希釈ラベルで一分子観察に用いる。初代培養 T 細胞、T 細胞株にレンチウイルスを用いて感染導入した後、FACS sorting により細胞を分取する。

2 . LFA-1 ICAM-1 結合動態と LFA-1 talin1・kindlin-3 結合、Rap1 活性化の同時解析系の樹立

LFA-1 ICAM-1 結合動態は平面脂質二重膜に発現させた ICAM-1 の一分子計測系で行い、同時に talin1、kindlin-3 の一分子計測を行う。ICAM-1 は光退色抵抗性 AT-647N または AT-565 ラベル、halotag を融合した HT-talin1、HT-kindlin-3 は Oregon green、AT-488 等でラベルし talin 欠損、kindlin-3 欠損リンパ球に発現させる。ICAM-1 接着が回復したことを確認後、TIRF イメージングは2波長励起2波長測光で行う。LFA-1 と ICAM-1 結合軌跡と Rap1 活性化、taln1、kindlin-3 軌跡の解析、相互相関を調べる(右図)。



上記実験を推進するとともに、3つの過程1：Rap1 活性化、過程2：taln、kindlin-3 と LFA-1 結合、過程3：LFA-1/ICAM-1 結合のキネティックスから接着過程の動力的校正 (kinetic proofreading) モデルを検証する。すなわち、Rap1 活性化持続時間、taln、kindlin-3 の

結合持続時間が一定の値を超えると LFA-1/ICAM-1 の結合に影響を与えるという考えである。刺激から接着までの遅延時間を導入することによって



動力的校正モデル: 細胞内過程の持続時間によるLFA1/ICAM-1結合の可塑性とロバスト性過程1 (Rap1活性化) が一定時間(T1) 持続した場合、過程2 (taln1, kindlin-3結合) が誘導され、過程2の持続時間(T2,T3)によって過程3 ICAM-1結合が誘導される。

接着の可塑性と安定性が調節される。このモデルを検証するため Rap1 活性化持続時間の延長・短縮について、Rap1 活性化変異体の発現、taln1、kindlin-3 遺伝子欠損への変異体発現などにより操作する。シグナル改変による各過程の解離速度 (*Koff* 値) の増減を算出し、LFA-1/ICAM-1 結合持続時間に逆比例関係にあるか検討する。

4. 研究成果

(1) Rap1、talin1、kindlin-3 欠損マウス由来初代培養 T 細胞を用いて、ケモカイン、抗原受容体によるリンパ球移動と停止における LFA-1 と ICAM-1 の結合について還流下、および TCR の刺激の接着効率を測定したところ、いずれも ICAM-1 との接着が著しく低下し、Rap1、talin1、kindlin3 が LFA-1/ICAM-1 接着に必須であることがわかった。BAF/LFA-1 細胞においても同様の結果であった。talin1 または kindlin3 の knockdown した場合、LFA-1/ICAM-1 結合時間を測定したところ、中～高親和性結合が低下し、低親和性結合が増加した。

(2) talin の膜出現は ICAM-1 のない場合、低頻度であるが、 $\beta 2$ インテグリンに依存して発生した。インテグリン接着を誘導する PMA 刺激によって ICAM-1 に接着することによって talin1 の出現頻度が増加し、膜滞在時間が有意に延長、拡散係数が低下した。talin1 の時間分布は LFA-1/ICAM-1 の結合時間分布と相関し、高親和性結合成分における解離速度はほぼ同じであった。kindlin3 は $\beta 2$ インテグリン非依存性に膜出現する割合がやや多く、ICAM-1 接着により膜出現頻度は増加した。膜滞在時間は talin1 より短く、拡散係数の低下はなかった。ICAM-1 非存在下で PMA およびケモカイン SDF-1 刺激した場合、talin1 および kindlin3 の膜出現頻度は未刺激と比較し有意な増加は検出できなかった。LFA-1 conformation による変化：中親和性である伸展型 LFA-1 を誘導する KIM127 抗体を使用した場合、膜出現頻度は有意に変化しなかったが、talin1、kindlin3 の膜滞在時間は有意に増加した。高親和性である伸展型を誘導する mAb24 抗体では talin1 の出現頻度および膜滞在時間が著しく増加した。mAb24 によって kindlin3 の膜出現頻度は増加しなかったが、膜滞在時間が増加した。

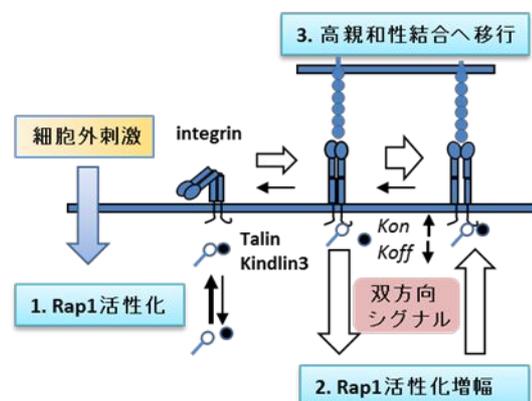
(3) $\beta 2$ 細胞内領域変異による効果：talin1 結合部位である $\beta 2$ W747 を alanine に変異した場合、ICAM-1 接着、talin1 の膜出現頻度および滞在時間が著しく低下した。mAb24 による talin1 の効果もほとんど検出できなかった。kindlin3 の結合部位を変異させた TTT/AAA 変異体の場合、kindlin3 の膜出現および滞在時間が低下した。

(4) talin 結合に影響を与えるパラメータ：Rap1 欠損によって talin の膜出現頻度が著しく低下したこと、talin の膜出現は F0 subdomain 依存していること、膜滞在時間の増加には F-actin/myosinII に依存し、RIAM 依存していなかった。

(5) Rap1 の一分子解析：Rap1 の膜結合キネティクスは数秒であり、GDP 型と比較し、GTP 型で有意に増加した。PMA 刺激によって Rap1 活性化が増強するが、ICAM-1 接着することによって著しく増強した。この増強は高親和性 LFA-1 で最も高く、接着面に集中していた。Rap1 と talin1 の 2 波長同時計測によって talin1 の結合部位に Rap1 がリクルートされる様子が観察された。

考察：Rap1 活性化に伴い、Rap1 の膜滞在時間が数秒単位で増加したが、この効果が LFA-1/ICAM-1 の高親和性結合（数十秒、平均結合時間 20 秒）に至る過程で talin1、kindlin3 が必須であった。一分子解析の結果、inside-out 刺激によって生じる Rap1 活性化では talin1、kindlin3 の結合増加はわずか数%の増加であった。しかし、ICAM-1 と結合することにより高親和性 LFA-1/ICAM-1 結合が生じると、Rap1 活性化の局所的増幅がおり、この効果により Rap1 がさらに talin1 をリクルートし、talin1 の結合頻度お

インテグリン接着制御の双方向シグナルモデル



よび結合時間が著しく増加、接着の増強に至ることが分かった。したがって、従来想定されていた inside-out シグナルによる Rap1 の活性化のみで talin1、kindlin3 の結合誘導、それによる LFA-1 のコンフォメーション変化が接着を誘導し、リガンド結合による outside-in で形態変化や移動が起こるというモデルではなく、inside-out/outside-in シグナルの同時双方向性シグナルによる Rap1 活性化増幅が接着の重要チェックポイントあると考えられる。高親和性 LFA-1/ICAM-1 結合キネティクスは talin1 の $\beta 2$ インテグリン結合キネティクスとほぼ同じであることから talin1 が決定していると予想される。kindlin3 が欠損すると高親和性 LFA-1/ICAM-1 結合が生じないこと、 $\beta 2$ インテグリンには talin1 依存的に結合し、talin1 の結合キネティクスには影響を与えないことから、kindlin3 は talin の直接の coactivator であるとの仮説は考えにくく、高親和性 LFA-1/ICAM-1 結合の誘導や Rap1 活性化増幅過程に必要であると予想されるが、今後さらに検討する必要がある。高親和性 LFA-1 に会合する talin1 の結合時間に影響を与えている因子は kindlin3, RIAM, vinculin ではなく、Rho シグナルによる F-actin/myosinII であること、talin の rod ドメインが必要であったことから、F-actin を介する牽引力がインテグリン α 鎖と β 鎖の解離を引き起こし、インテグリンの高親和性コンフォメーションを引き起こす unclasp モデルが支持される結果であった。また、これらのことから高親和性結合に関する Rap1 と Rho の出力は talin のインテグリン結合頻度（膜出現頻度）と結合時間（膜滞在時間）の 2 つのパラメータで表されると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Bogdanova D, Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Rahman MA, Ludewig B, Kinashi T, Katakai T. Essential Role of Canonical NF- κ B Activity in the Development of Stromal Cell Subsets in Secondary Lymphoid Organs *J Immunol*, 2018, 201 (12) 3580-3586 DOI: 10.4049/jimmunol.1800539 査読有

植田祥啓、近藤直幸、木梨達雄 自己免疫疾患のイメージング：自己寛容の成立と維持における細胞間相互作用の可視化 臨床免疫・アレルギー科 科学評論社 2018, 69(4):318-325 総説 査読無

Mouri Y, Ueda Y, Yamano T, Matsumoto M, Tsuneyama K, Kinashi T, Matsumoto M, Mode of Tolerance Induction and Requirement for Aire Are Governed by the Cell Types That Express Self-Antigen and Those That Present Antigen, *J. immunol.*, 2017 199(12):3959-3971 査読有

Kondo N, Ueda Y, Kita T, Ozawa M, Tomiyama T, Yasuda K, Lim DS, Kinashi T. NDR1-dependent regulation of kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization. *Mol Cell Biol*. 2017 Jan 30. pii: MCB.00424-16. doi: 10.1128/MCB.00424-16. [Epub ahead of print] 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

Y Kamioka, Y Ueda, N Kondo, T Kinashi, Roles of Rap1, Talin-1 and Kindlin-3 in Lymphocyte homing to peripheral and mucosal lymph nodes, The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2018. (第 47 回 日本免疫学会学術集会 2018) 2018/12/1 Fukuoka

Y Ueda, N Kondo, Y Kamioka, T Kinashi, W747 talin1 binding site in cytoplasmic domain of the integrin beta2 subunit is crucial for Tcell migration and activation. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2018. (第 47 回 日

本免疫学会学術集会 2018) 2018/12/10 Fukuoka

T Kinashi, Roles of Rap1 signaling in immunodeficiency and autoimmunity. The 9th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases (ACPID) 2018/12/02 Fukuoka.

N Kondo, T Kinashi, LFA-1 を介したリンパ球細胞接着の一分子解析 The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (第41回日本分子生物学会年会) 2018/11/28 Yokohama

T Kinashi, N Kondo, Y Ueda, Y Kamioka Rap1 signaling to NDR1 kinase regulate immune synapse formation and cell polarity. The 9th Xiamen Winter Symposium 2018/11/02 Xiamen. China.

Kondo N, Ueda Y, Kinashi T, NDR1 acts as a molecular hub for the organization of immunological synapse (3-I-W42-12-0/P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

Ueda Y, Kondo N, Kamioka Y, Kinashi T, Regulation of cell polarization by Rap1 via NDR/Rab8 axis upon chemokine stimulation(1-G-W13-21-P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T, Roles of Rap1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral lymph nodes (3-I-W42-10-0/P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：植田 祥啓

ローマ字氏名：(UEDA, Yoshihiro)

研究協力者氏名：上岡 裕治

ローマ字氏名：(KAMIOKA, Yuji)

研究協力者氏名：近藤 直幸

ローマ字氏名：(KONDO, Naoyuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。