

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18790344
 研究課題名（和文） T細胞活性化における TCR ミクロクラスター形成とラフト動態の時空間制御の解析
 研究課題名（英文） Spatiotemporal analysis of TCR microcluster and lipid raft on T cell activation
 研究代表者
 多根 彰子（橋本彰子）(TANE AKIKO (HASHIMOTO AKIKO))
 独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・研究員
 研究者番号：10415226

研究成果の概要：獲得免疫を司る T 細胞が抗原提示細胞によって活性化される時、接着面一面に形成された T 細胞受容体 (TCR) ミクロクラスターが中央に集まり免疫シナプスと呼ばれる構造を作る。本研究は、飽和脂肪酸の集合体であるラフトの集積が分子の集合や免疫シナプス形成を促すという説に対して、ラフトの集積とされた現象は TCR 等の細胞内取り込みに伴う細胞膜の集積であり、ラフトの役割はラフトに親和性を持つ分子の細胞膜への配置にあることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

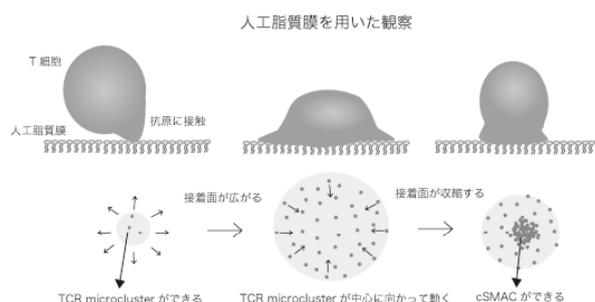
科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：細胞、T細胞、免疫シナプス、ラフト、FRET

1. 研究開始当初の背景

T 細胞は抗原提示細胞と接着し活性する時に中央に受容体が集積した免疫シナプスと呼ばれる構造を作ることによって活性化すると予測されていた。しかし我々のグループは、受容体の集積が形成される数分前に接着面一面に形成される” T 細胞抗原受容体 (TCR) ミクロクラスター” から活性化が始まる事を、抗原提示細胞を模した脂質二重膜を用いて明らかにした。一方ラフトに関して、それ自身が会合し受容体やシグナル分子を会合させ活性化を引き起こすものであり、ラフトの会合は免疫シナ

プスの形成に必要である、という従来の説に反して、ラフトはクラスターを作らないとするデータが発表されるなど議論が分かれていた。



2. 研究の目的

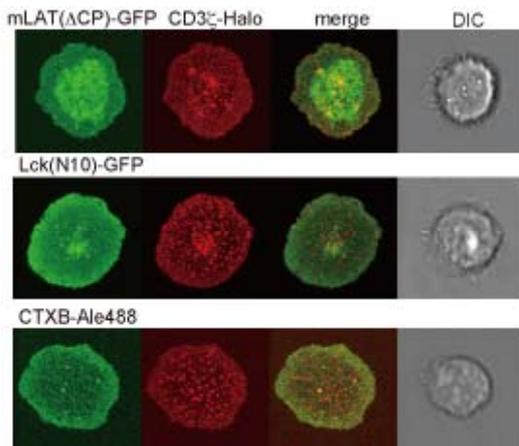
T細胞活性化初期に形成されるTCRミクロクラスターで、ラフト動態の詳細な解析を行い、シグナル形成におけるラフトの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

T細胞に蛍光ラベルしたTCRのコンポーネントであるCD3 ζ とラフトプローブを導入し、抗原ペプチドを負荷したMHC分子と接着分子を含む脂質二重膜上に落とし、接着面に行けるTCRクラスターとラフトを共焦点蛍光顕微鏡で観察した。ラフトプローブとしてはコレラトキシン、ラフト局在分子LATやLckの細胞内部分を削った変異体を用いた。2色の蛍光の同時測定にあたり、予定していたRedの蛍光タンパク質が細胞内で凝集し細胞内器官に余計な輝点が出てしまう問題が生じたが、Halo tagを導入する事によって解決した。細胞間シナプスの解析には、抗原を負荷した活性化B細胞を抗原提示細胞とした。経時変化を測定するためにB細胞を固定する必要があったが、従来のポリリジン方法では上手く固定できなかったため、抗体を用いて固定する工夫をした。

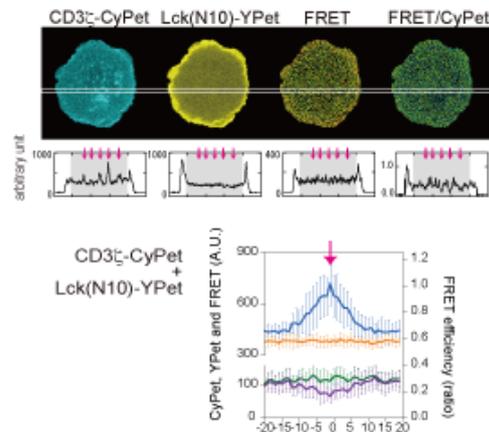
4. 研究成果

TCRクラスターと上記ラフトプローブを同時測定した所、接着面に行けるTCRミクロクラスターの場所にラフトが集まる様子は見られず、ラフトが集積して足場を作るのではない事が示唆された。



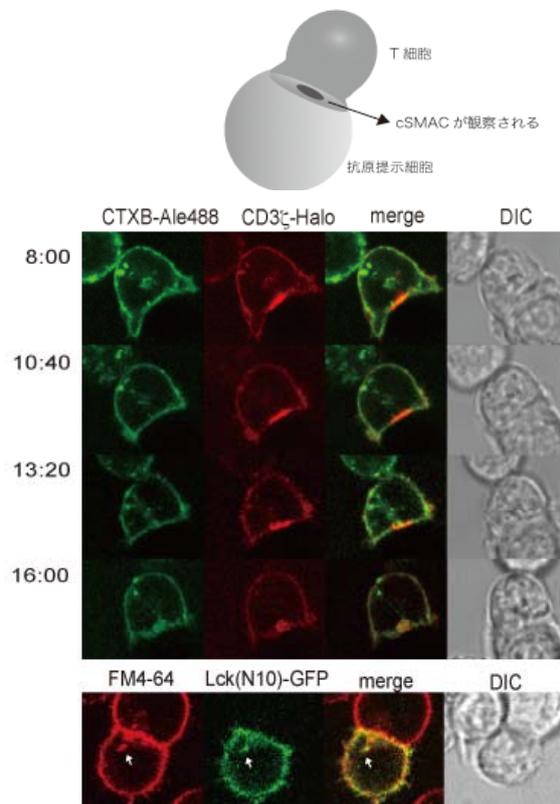
しかし、ラフトは5-200nmという小さな単位で存在するので、光学顕微鏡で観察できる程度の集積はなくても、もっと微小な環境での分子間相互作用が変化している可能性があった。そこで、より詳細に受容体とラフトの相互作用を調べるためFRET実験を行った。ラフトとTCRの距離を観察すべく蛍光プローブの作成及び探索から得たFRETプローブを用いて観察した所、ラフトとTCRはTCRミクロクラスター部位でFRET効率を下げ

ていた。つまりTCRとラフトの距離はむしろ広くなり相互作用は弱くなっていた。



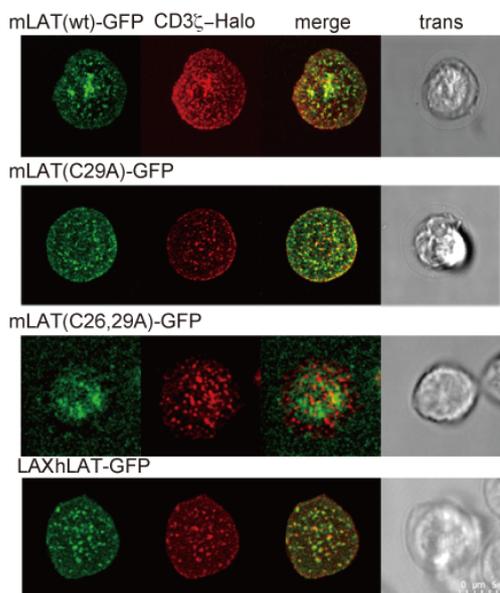
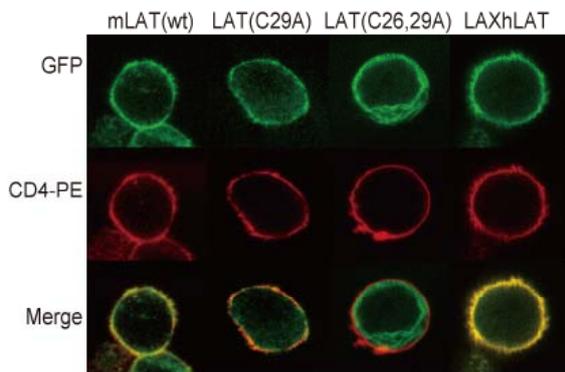
これらは従来の説に矛盾する結果であり、ラフトの解釈を更に複雑にする可能性があった。そこで我々は多くの報告と同じ細胞間シナプスの実験系で、多くの報告はない動画撮影に挑み、細胞間シナプスでのラフトプローブ動態を観察し矛盾の解決を目指した。面白い事に免疫シナプス周辺でのラフトの動きはTCRと一致せず、ラフトの集積も恒常的に認められる物ではなかった。ラフトの集積はエンドサイトーシスマーカー(FM4-64)とよく共局在したことから、シグナル足場というよりもエンドサイトーシスに伴う膜の肥厚である事が強く示唆された。

細胞間免疫シナプス観察



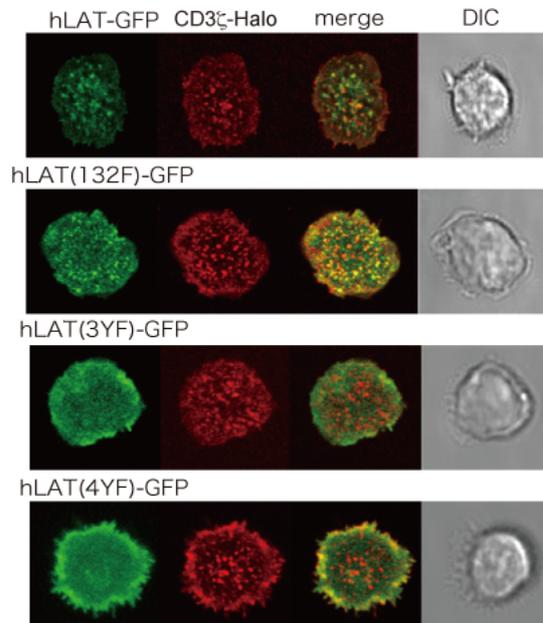
ラフトの重要性が注目を集めた経緯として、ラフトとの親和性を失った LAT (T 細胞活性化に必要なアダプター分子) の変異体 (LAT (C26, 29A)) が活性を失ったデータが鍵になっている。そこで、LAT や LAT の変異体の解析からラフトの真の役割を探る事にした。

まず、LAT (C26, 29A) に関しては、人工脂質膜で測定する前に、細胞内オルガネラに留まり細胞膜に出られないので T 細胞活性化を止めてしまうことがわかった。しかし違う変異体で細胞膜に配置できた分子: ラフトとの親和性が弱まった LAT 変異体 (LAT (C29A)) や、LAX と LAT のキメラでラフトと親和性をなくした分子 (LAXLAT) : は野生型と同様にクラスターを作る事ができた。つまりラフトとの親和性は活性化クラスターの形成に影響しない事が明らかになった。



クラスター形成を促す相互作用としてリン酸化を介した分子間相互作用も知られている。そこでリン酸化部位の変異体についても解析を行った。LAT の重要なリン酸化部位のうち、PLC (リパーゼ) との親和性を無くす変異体 LAT (Y136F)、Grbs や Gad (アダプター分

子) との親和性をなくした変異体 (LAT (3YF)) そして重要な 4 カ所すべてを変換した変異体 (LAT (4YF)) について解析を行ったところ、LAT (Y136F) だけが野生型と同様のクラスター形成を示した。従って、LAT のクラスター形成には Grbs や Gad との親和性が必要である事が明らかになった。



以上のデータから、分子間相互作用は活性化クラスター形成に不可欠であるが、ラフト親和性はクラスターの形成や維持ではなくラフト局在分子の細胞膜への配置に必要である事を証明し、論文にまとめた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, Tokunaga M, Saito T.

Spatiotemporal regulation of T cell co-stimulation by TCR-CD28 microclusters through PKC θ translocation

Immunity, 査読あり

Vol. 29, 2008, 589-601

[学会発表] (計 9 件)

① Hashimoto-Tane A., Yokosuka T. and Saito T.

Quantitative analysis of TCR microclusters in CD3zGFP knock-in T cells
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会

2008年12月3日

②Yokosuka, T., Sogawa-Sakata, K.,
Tane-Hashimoto, A., Tokunaga, M.,
Dustine, ML, Saito T.

Identification of a region
in immunological synapse critical for T
cell co-stimulation

第38回日本免疫学会総会・学術集会

2008年12月3日

③Hashimoto-Tane A., Yokosuka T., Ishihara
C. and Saito T.

Mobilization of lipid raft at
immunological synapse

第81回日本薬理学会年会

2008年3月19日

④Hashimoto-Tane A., Yokosuka T, and Saito T
Mobilization of Lipid raft at

Immunological Synapse

第37回日本免疫学会総会・学術集会

2007年11月21日

⑤Yokosuka T., Sakata-Sogawa K.,
Hashimoto-Tane A., Tokunaga M., Dustin
ML and Saito, T.

Spatiotemporal regulations of T cell
activation by a c-SMAC and
TCR-CD28-microclusters

第37回日本免疫学会

2007年11月21日

⑥Yokosuka T. Sakata-Sogawa K. Kobayashi
W., Hiroshima M., Hashimoto-Tane A.,
Tokunaga M., Dustine M.L. and Saito T.

Spatiotemporal regulation of T cell
activation by TCR-CD28-microclusters

13th International Congress of Immunology

2007年8月21日

⑦多根彰子、横須賀忠、斉藤隆

Immunological SynapseにおけるLipid raft
の動態

第17回 Kyoto T Cell Conference (KTCC) 学
術集会

2007年6月15日

⑧横須賀忠、小林若菜、多根彰子、十川久美
子、徳永万喜洋、斉藤 隆 (6/15)

TCR-CD28 マイクロクラスターによるT細胞活
性化の時空間的制御機構

第17回 Kyoto T Cell Conference (KTCC) 学
術集会

2007年6月15日

⑨Yokosuka T. Sakata-Sogawa K. Kobayashi
W., Hiroshima M., Hashimoto-Tane A.,
Tokunaga M., Dustine M.L. and Saito T.

Spatiotemporal
regulation of T cell activation by
TCR-CD28-microclusters

第7回日本蛋白質科学会年会

2007年5月25日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多根 彰子 (橋本彰子)

(TANE AKIKO (HASHIMOTO AKIKO))

独立行政法人理化学研究所・

免疫シグナル研究グループ・研究員

研究者番号：10415226