

機関番号：31603

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20570116

研究課題名 (和文) コレステロールに富む膜機能ドメインの構造・機能相関に関する研究

研究課題名 (英文) STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIP OF CHOLESTEROL-ENRICHED MEMBRANE MICRODOMAINS

研究代表者

岩下 淑子 (IWASHITA YOSHIKO)

いわき明星大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：50111498

研究成果の概要 和文 シグナル伝達に重要な役割を担うと考えられている膜機能ドメイン 脂質ラフト の構造と機能の相関を「加齢に伴うリンパ球の活性化能の低下」に着目して解析した。その結果、1) マウスリンパ球脂質ラフトに局在する分子群の加齢に伴う変化と、一連のシグナル伝達の「負」の制御の異常、2) T細胞受容体刺激に対して不応答性のPD-1陽性Tリンパ球の加齢に伴う増加、3) ラフトの主要構成成分であるコレステロールの局在様式の変化が、加齢に伴うリンパ球の機能低下に関わっている可能性を明らかにした。

研究成果の概要 英文 To study the structure-function relationship of membrane microdomains (lipid rafts) involved in signal transduction, we examined the alterations of lipid rafts in an age-associated decline in T-cell receptor signaling. By analyzing resting and stimulated mouse CD4<sup>+</sup> T cells, we found that the following alterations may be related to the age-dependent decline in T-cell receptor signaling: 1) age-dependent alterations in several lipid raft-associated molecules, and resulting dysregulation of a negative SFK (Src family kinase) regulatory system; 2) age-associated up-regulation of PD-1-positive T cells that exhibit proliferative hyporesponsiveness; 3) altered localization/topology of cholesterol, one of major constituents of lipid rafts.

交付決定

金 単位 円

	直接経費	間接経費	合計
年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野 生化学

科研費の分科・細目 生物科学 構造生物化学

キーワード 生体膜、Tリンパ球、膜機能ドメイン、コレステロール、シグナル伝達

研究開始当初の背景

近年、脂質ラフト ラフト と呼ばれる細胞膜上のマイクロドメインの存在が明らかにされ、外界からの信号の受容伝達に関与する機能ドメインとしての役割が注目されてい

る。ラフトはコレステロールやスフィンゴ脂質など特定の脂質に富む膜 域に様々な分子が 積したものであるが、その構造体は動的であり、 合 散によって構成成分が異なる 団を形成して、それぞれの反応を制御

すると考えられている。ラフトに於けるシグナル制御の方向性や強弱は 積するシグナル分子によるが、それを規定するのはラフトを構成する脂質やタンパク質等である。従って、細胞機能とラフトに於けるシグナル制御との関係を明らかにするためには、ラフトの分子基盤 構造 の変化とそれに伴うラフト機能の動態を明らかにすることが極めて重要である。

申請者らは T リンパ球 T 細胞 の抗原受容体を介したシグナル伝達に着目してラフトの構造と機能を解析している。T 細胞は老化に伴って機能低下を起こすが、その機序は良く分かっていない。T 細胞の活性化シグナルは、細胞膜の脂質ラフトに 積する Lck や LAT 等による「正」の制御系と Csk Lck 等の Src キナーゼを抑制するキナーゼ や PAG/Cbp

Csk をラフトにリクルートするアダプター分子 等による「負」の制御系で厳密に制御されている。従って、加 に伴う T 細胞の機能低下はラフトに関連する何らかの異常や変質を反映したものである可能性がある。しかし、「正」の制御系に焦点を当てたこれ迄の研究では、T 細胞の機能低下を十分に説明できる成果は得られていない。そこで、我々は「負」の制御系に着目した研究を開始し、老 マウスの T 細胞では「負」の 制御に関わるラフト局在のアダプター分子 PAG/Cbp が著しく減少することを見出している。

また、脂質ラフトの構造・機能の解析にはラフトを構成する脂質の解析も必 である。申請者らは、コレステロール密度の い膜 域を認識して選択的に結合するプローブ(BC $\theta$ )を開発した。これによりコレステロールに着目したラフトの解析が可能となっている。このプローブを用いることで、コレステロールに富む特定のラフト垂 団の存在が明らかになった。さらに、本プローブはシグ

ナル伝達時のラフト局在コレステロールの変化を可視化するのにも役立っている。本研究はこれらの成果をふまえて企画したものである。

#### 研究の目的

T 細胞抗原受容体シグナル伝達に着目して、脂質ラフトの構造と機能を解析する。T 細胞の活性化能は加 に伴い低下することが知られており、T 細胞抗原受容体を介したシグナル伝達機能の低下がその要因の一つと考えられている。そこで、脂質ラフトの組成や構造の加 変化が T 細胞のシグナル伝達機能の低下とどのように関連するかを解析することで、ラフトの構造と機能の関係の解明を目指す。

#### 研究の方法

解析には CD4<sup>+</sup> T 細胞を使用した。細胞は、若 Y, 3-5 ヶ月 、中 M, 10-11 ヶ月 、老 O, 22-25 ヶ月 の C57BL/6 マウスの脾細胞から磁気細胞分 システムを用いて分 ・精製した。補助刺激分子である CD28、PD-1、CTLA-4 の解析は全て無刺激条件下の CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて行った。タンパク質レベルでの解析はウェスタンブロッティングで行い、mRNA レベルでの解析は Semi-quantitative RT-PCR 法で行った。細胞表 に発現する補助刺激分子の動態および細胞垂 団の解析は、蛍光標識の抗補助刺激分子特異抗体で CD4<sup>+</sup> T 細胞を染色した後、フローサイトメーターで行った。また、上述のプローブの細胞膜への結合量をウェスタンブロッティングで測定し、加 や抗原刺激に伴うラフト局在コレステロールの変化を解析した。

#### 研究成果

(1) 細胞の機能発現には抗原受容体(TCR)を介したシグナル伝達が重要な役割を担っ

ている。この TCR シグナリングは細胞膜ラフトに 積する分子群によって「正」「負」の制御を受けている。ラフト局在分子の解析から、老 マウスの T 細胞では「負」の制御に関わるラフト局在のアダプター分子 PAG/Cbp が著しく減少することを見出している。この PAG/Cbp の減少に伴い、活性化初期反応を「負」に制御するチロシンキナーゼ Csk のラフトへの 積量が低下していた。さらに、不活性型の Src-ファミリーキナーゼの減少、ラフト局在分子のチロシンリン酸化の昂進が認められた。このことから、老 マウス細胞では Csk による Src-ファミリーキナーゼ活性の調節に何らかの異常が生じているものと考えられる。この結果から、PAG/Cbp の減少から生じる一連のシグナル伝達の「負」の制御の異常が加 に伴う 細胞機能低下の原因のひとつであることが示唆される。

(2) 抑制型補助刺激シグナル受容体である PD-1 を細胞表 に発現する細胞 団が加 に伴い著しく増加する事が明らかになった。このような細胞表 における発現変化は他の活性型 抑制型補助刺激シグナル CD28, CTLA-4 では認められなかった。さらに、PD-1 陽性 T リンパ球は T 細胞受容体刺激に対して不応答であることが明らかとなった。PD-1 の増加は上述した PAG/Cbp の減少と相補的に作用してシグナル伝達機能を低下させ、T リンパ球の機能低下を引き起こすことが考えられる。

(3) シグナル伝達関連タンパク質だけでなく、ラフト構成脂質の組成や局在様式もラフトにおけるシグナル伝達を規定する要因と考えられる。そこで、コレステロールに富む膜ドメインを認識する 分子プローブ BC  $\theta$  を用いてラフトの主要構成成分であるコレステロールの局在様式の変化を解析した。その結果、プローブの T リンパ球細胞

表 への結合量は、若 マウスでは受容体刺激後に著しく増大するのに対して、老 マウスでは未刺激の状態ですでに 多く、刺激によってそれ以上増大しないことがわかった。これらの結合量の変化はコレステロール量の差違では説明できないことから、コレステロールの細胞膜における局在様式の変化を反映している可能性が 高い。受容体刺激時におけるコレステロールの局在様式の違いはラフトを介したシグナル伝達効率に影響を及ぼすことで T 細胞活性化能に関わっている可能性が考えられる。

#### 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

#### [ 誌論文 ] 計 件

- ① Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Hayashi, M. & Inomata, M. (2010) Plasma membrane microdomains in aging and disease. *Geriatr. Gerontol. Int.*, 10 (suppl. 1), S41-52 (査読有)
- ② Huang, H., McIntosh, A.L., Atshaves, B.P., Ohno-Iwashita, Y., Kier, A.B. & Schroeder, F. (2010) Use of dansyl-cholestanol as a probe of cholesterol behavior in membranes of living cells. *J. Lipid Res.*, 51, 1157-1172 査読有
- ③ 猪股光司、嶋田有紀子、林 昌美、岩下淑子 (2010) 加 に伴って増加する PD-1 陽性 T リンパ球の正体は 基礎老化研究, 34, 23-27 査読無
- ④ Shimada, Y., Hayashi, M., Nagasaka, Y., Ohno-Iwashita, Y. & Inomata, M. (2009) Age-associated up-regulation of a negative co-stimulatory receptor PD-1 in mouse CD4<sup>+</sup> T cells. *Exp. Gerontol.*, 44, 517-522 査読有

#### [学会発表] 計 件

- ① 猪股光司、嶋田有紀子、林 昌美、岩下淑子、老 マウスで見いだされた抑制型補助刺激シグナル受容体 PD-1 陽性 CD4<sup>+</sup> T 細胞の性質、第 32 回日本基礎老化学会大会、横浜、2009. 6. 18-20
- ② 嶋田有紀子、林 昌美、長坂安彦、岩下淑子、猪股光司、加 で増加する PD-1 陽性 CD4<sup>+</sup> T 細胞は刺激に対して不応答性である、第 82 回日本生化学会大会、

- 神戸、2009.10.21-24
- ③ Murase-Tamada, K., Murate, M., Hayakawa, T., Nakamura, K., Ito, K., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y. & Kobayashi, T. Cholesterol gradient in biological membranes, International Symposium on Molecular and System Life Sciences, Kobe, Japan, 2008.12.10-11
- ④ 猪股光司、嶋田有紀子、林 昌美、岩下淑子、老 マウス T 細胞に於ける抑制型補助刺激シグナル受容体 PD-1 の発現亢進とその意義、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2008.12.9-12
- ⑤ 嶋田有紀子、猪股光司、林 昌美、岩下淑子、加 に伴って増加する PD-1 陽性 CD4+T 細胞の同定とその特徴、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2008.12.9-12
- ⑥ Murate, M., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., Umeda, M. & Kobayashi, T.. Revisiting lipid asymmetry in red blood cells, Flippases 2008, Ascona, Switzerland, 2008.11.2-7
- ⑦ 猪股光司、林 昌美、嶋田有紀子、岩下淑子 : 老 マウス T リンパ球に於ける抑制型補助シグナル受容体の発現亢進、第 31 回日本基礎老化学会大会、松本、2008.6.12-13

[図書] 計 件

- ① Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Hayashi, M. Iwamoto, M., Iwashita, S. & Inomata, M. (2010) Cholesterol-Binding Toxins and Anti-cholesterol Antibodies as Structural Probes for Cholesterol Localization. (Chapter 22) in "Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins" (Harris, J. R. ed.), Series: Subcellular Biochemistry, Vol. 51, p. 597-621, Springer
- ② 岩下淑子 (2010) 生体膜の加 変化、新老年学第 版 大内尉義, 秋山弘子編 代表、東京大学出版会、東京、p.78-84
- ③ McIntosh, A. L., Huang, H., Atshaves, B. P., Storey, S. M., Gallegos, A. M., Spencer, T. A., Bittman, R., Ohno-Iwashita, Y., Kier, A. B. & Schroeder, F. (2008) Fluorescent sterols to study cholesterol trafficking in living cells. in "Probes and Tags to Study

Biomolecular Function: for Proteins, RNA, and Membranes" (Miller, L. W. ed.), p.1-33, Wiley-VCH, Weinheim

研究組織

(1) 研究代表者

岩下 淑子 IWASHITA YOSHIKO  
いわき明星大学 薬学部 客員研究員  
研究者番号

(2) 研究分担者

岩下 新太郎 IWASHITA SHINTARO  
いわき明星大学・薬学部・教授  
研究者番号  
猪股 光司 INOMATA MITSUSHI  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所 研究員  
研究者番号