

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590588

研究課題名(和文) 免疫動態の制御機構とその役割

研究課題名(英文) Rab13 is a downstream effector of Mst1 to mediate LFA-1 activation critical for lymphocyte trafficking.

研究代表者

片桐 晃子 (Katagiri, Koko)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：00322157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Mst1依存性にLFA-1のクラスター形成に関与するRab family GTPaseを検索し、Rab13を同定した。Rab13は、ケモカイン刺激後、Mst1によってDENND1Cがリン酸化されると活性化され、LFA-1小胞を前方へ極性輸送し、クラスター形成を誘導することが明らかとなった。この時、Mst1は、アクチン進展因子のVASPをリン酸化することで、アクチンの発達を促進し、活性Rab13はmyosin Vaをリクルートすることがわかった。Rab13のconditional knock out miceを作製したところ、リンパ球の接着・遊走が有意に減少し、2次リンパ組織は低形成となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we report an essential link between Rab13 and Mst1 in lymphocyte adhesion and migration. Mst1 promoted the phosphorylation of DENND1C to activate Rab13 with chemokine. Active Rab13 associated with Mst1, and facilitated to deliver LFA-1 to the leading edge of lymphocytes by recruitment of myosin Va along actin cables, which extended through the localization of VASP to the cell periphery via MST1-dependent phosphorylation at Ser-157. The inhibition of Rab13 function reduced adhesion and migration on ICAM-1, and LFA-1 ring formation of T cells at contact zone with antigen-presenting cells. Rab13-deficient mice had hypoplastic lymphoid tissues due to the defective trafficking capability of lymphocytes. These results indicate that Rab13 acts with Mst1 to regulate the spatial distribution of LFA-1, and the motility and interaction dynamics of lymphocytes.

研究分野：免疫学

キーワード：LFA-1 migration Rap1 Mst1 Rab13 cell polarization leading edge

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは、免疫細胞が活発に生体内を移動することを基盤としており、適切な時に、適切な場所で拘束されることで、生体防御機能を発揮することができる。従って免疫動態は時間的・空間的に厳密に制御されている。免疫応答が開始する場であるリンパ節は全身に散在している。直接病原体の侵入を見張っている樹状細胞は皮膚や粘膜などに存在し、外敵を捉えると、組織内での拘束を逃れ、リンパ管を通過してリンパ節へ移動し、リンパ球へ外敵侵入の情報を伝える。リンパ球は血流を介して常に全身を移動しているが、リンパ節に到達すると、高内皮細静脈(HEV)上で停止し、これを通り抜けリンパ節内に入る。リンパ球はリンパ節に入った後もストローマ細胞ネットワーク上を活発に遊走し、自分の抗原受容体が認識する特異抗原を提示する樹状細胞に出会うと停止し活性化・分化の方向へ向かう。このように、免疫システムは、免疫細胞の活発な移動と適切な場での拘束の交互のダイナミックな調和によって成り立っている。

この動的監視システムの基盤となっているのが、インテグリンを介する接着と遊走である。リンパ球上に発現するインテグリンは、血管内では接着できないようにブロックされており、適切な場で提示された遊走因子によって、秒単位で活性化され速やかに接着性を上昇させる。これによりリンパ球は HEV 上で停止し、リンパ節内に入ることができる。また、インテグリンは、リンパ球が特異抗原を探してリンパ節内のストローマ細胞ネットワーク上を遊走し、樹状細胞上を走査する際の足場として、免疫応答の始動に寄与している。さらにリンパ球はインテグリンを介して樹状細胞に強固に接着することで、抗原情報を受け取り活性化・分化する。従ってイン

テグリンを介する接着・遊走の分子機構を明らかにすることは、免疫細胞の移動と場の拘束の仕組みを理解することにつながる。

低分子量 G タンパク質 Rap1、その下流標的分子 RAPL・Mst1 は、リンパ球の極性形成を誘導し、leading edge にインテグリンを集め、接着・遊走を促進し、免疫動態に重要な役割を果たすことを申請者は明らかにして来た。Mst1 は Rap1 が活性化され RAPL と会合すると、リン酸化酵素活性が上昇し、その局在が核周辺領域から leading edge へ秒単位で移動することや、Mst1-RAPL はスクロース密度勾配遠心法によって、同じ小胞分画に濃縮されること、免疫電顕法で小胞の細胞質側に局在することから、Rap1/RAPL/Mst1 シグナルはおそらくインテグリンを含む小胞の極性輸送に関与すると推測された。

2. 研究の目的

インテグリンの接着活性の上昇に関与する極性輸送の分子機構を明らかにするために、小胞輸送に関与する約 60 種類の Rab family GTPases について、yeast two-hybrid 法により Mst1 と *in vitro* で会合し、また COS 細胞での一過性発現系で共局在を示す分子として Rab13 をスクリーニングした。Rab13 を免疫動態における役割とその分子機構を解明する。

3. 研究の方法

1) *In vitro* におけるケモカイン刺激による Rab13 活性化の定量は、proB cell line, BAF 細胞と CXCL12、及び MICAL-L2RBD と GST 融合タンパク質を用いた pull-down assay によって行った。

2) リン酸化は Phosphotag を用いて検討した。Rab13, LFA-1, Lifeact, VASP 分子の細胞内動態は、GFP, Venus, mCherry の蛍光 tag を融合させ、Zeiss510 共焦点顕微鏡を用いて

撮影した。

3) Rab13 conditional knockout mice は、exon1 を cre-lox システムで目的の細胞でのみ欠損させた。免疫組織は凍結切片を作製し免疫染色した。

4) 精製 ICAM-1 上での接着・遊走を測定し、metamorph software を用いて定量・解析した。

4. 研究成果

1) COS 細胞を用いた過剰発現系で、Mst1 が Rab13GEF である DENND1C と会合しリン酸化することで Rab13 が活性化されることが示唆されたので、ケモカインによる Rab13 活性化への関与を調べた。図 1 に示すように、DENND1C は CXCL12 刺激によりリン酸化レベルが上昇するが、Mst1 をノックダウンした細胞では上昇が認められないことから、ケモカイン刺激で Mst1 依存性に DENND1C がリン酸化されることが判明した。DENND1C のノックダウンによってケモカイン刺激による Rab13 活性化が生じなくなることから、Mst1 による DENND1C のリン酸化はケモカインによる Rab13 活性化に重要であることが示唆された。



図1 ケモカインによる DENND1C のリン酸化(左)と Rab13 活性化(右)

2) ケモカインによって活性化された Rab13 は、LFA-1 と会合し、極性形成した細胞の先端部において LFA-1 クラスターと共局在することがわかった (図 2)。

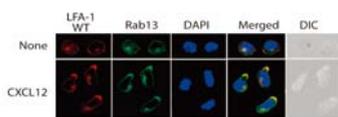


図2 LFA-1クラスターと Rab13 の局在の一致

3) Rab13 はアクチン繊維にそって前方へ移

動することがわかった (図 3)。

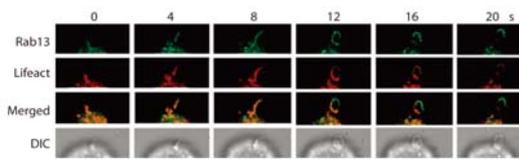


図3 Rab13 が線上に lifeact で示されたアクチンケーブルにそって先端膜へ移動する。

このケモカイン刺激によるアクチンケーブルの発達に、アクチン進展因子 VASP が関与するかどうか調べたところ、VASP はアクチン繊維の先端部への局在することがわかった (図 4)。また、重要な 157 番目のリン酸化が Mst1 欠損によって低下することが判明した (図 5)。

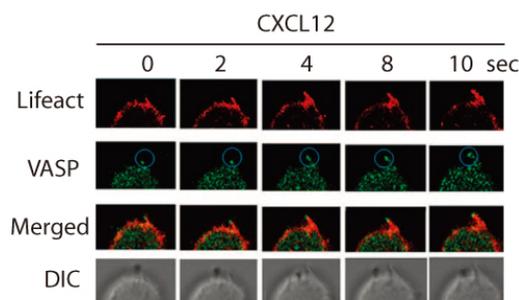


図5 VASP は伸展するアクチンケーブルの先端部に局在する。

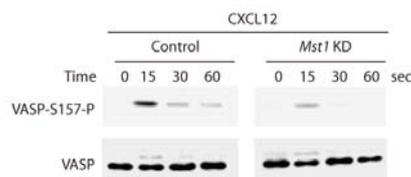


図4 CXCL12 による VASP157 番目のセリン残基のリン酸化は Mst1 ノックダウンで低下する。

4) Rab13 を働かなくしたリンパ球では、細胞表面で LFA-1 が集まらず、細胞の接着活性や運動能が低下した (図 4)。

また、Rab13 をもたないマウスを作製したところ、リンパ節などへのリンパ球の移動ができず、これらの臓器が低形成にあることが示

された (図 5)。

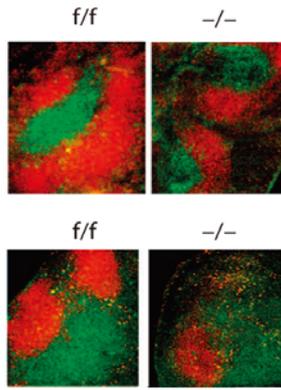


図6 Rab13 欠損マウスのリンパ組織の細胞数は減少する。

これらのことから、Rab13 が機能することにより、LFA-1 が細胞内を輸送されて、細胞膜の局所に集積すること、また、その機能が破綻することにより、リンパ球の接着や移動ができなくなり、免疫機能が損なわれることが明らかになった。

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 3 件)

1. Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Etoh K, Fukuda M, Kinashi T, Katagiri K.

Rab13 is a downstream effector of Mst1 to mediate LFA-1 activation critical for lymphocyte trafficking. *Science Signaling*

7(336):ra72, 2014 (査読有)

2. Yamamoto-Taguchi N, Satou Y, Miyazato P, Ohshima K, Nakagawa M, Katagiri K, Kinashi T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Induces Inflammation through Labile Foxp3 Expression. *PLoS Pathogens*, 9(9):e1003630,

2013 (査読有)

3. Ueda Y, Katagiri K, Tomiyama T, Yasuda K, Habiro K, Katakai T, Ikehara S, Matsumoto M,

Kinashi T. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus. *Nat. Commun.* Oct 2;3:1098,

2012 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1) Critical roles of Spa-1 in chemokine-induced Rap1 activation

Shimizu H, Ishihara S, Inoue J, Minato N, Kinashi T and Katagiri K.

第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5~7 日、神戸、国際会議場

2) Regulation of LFA-1/ICAM-1-dependent adhesion and migration by Rab13

Suda H, Ishihara S, Kinashi T and Katagiri K.

第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5~7 日、神戸、国際会議場

3) Lymphocyte arrest was induced by the binding of active Rap1 to filamins.

Ishihara S, Kinashi T and Katagiri K.

第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5~7 日、神戸、国際会議場

4) Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Kinashi T, Katagiri K. Rab13 is a downstream effector of

Mst1 to mediate LFA-1 activation crucial for lymphocyte trafficking. 第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、国立京都国際会館 2014 年 12 月 10 日.

5) Tanno S, Nishikimi A, Ishihara S, Katagiri K.

Molecular mechanisms of Rab13-dependent transport of LFA-1 during lymphocyte chemotaxis. 第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、国立京都国際会館、2014 年 12 月 10 日.

6) 石塚大地、錦見昭彦、石原沙耶花、片桐晃

子 ケモカインに応答したリンパ球の遊走における Rab13 を介した LFA-1 輸送機構の解明 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 26 日.

7) 大内裕太郎、錦見昭彦、石原沙耶花、小沢まどか、福田光則、木梨達雄、片桐晃

Rab13 は Mst1 の下流分子であり、LFA-1 の局在制御を介してリンパ球の遊走を制御している 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、

パシフィコ横浜、2014年11月26日.

8) 勝又美菜子、錦見昭彦、石原沙耶花、三枝信、片桐晃子 生殖器の上皮および腺組織の細胞増殖における Rab13 の役割 第37回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2014年11月27日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/bogyo/seitaibogyo.HP/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片桐 晃子 (KATAGIRI koko)
北里大学・理学部・生物科学科 教授
研究者番号：00322157