

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860049

研究課題名(和文)細胞内小胞輸送を介する主要組織適合性抗原クラス II の発現調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of cell-surface MHC-II in dendritic cells

研究代表者

古田 和幸 (Furuta, Kazuyuki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：50644936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：主要組織適合抗原クラスII(MHC-II)は、樹状細胞に発現し、外来抗原をT細胞に提示することで獲得免疫応答を誘導する。MHC-IIの細胞表面発現量は厳密に制御されているが、その詳細は不明であった。本研究では細胞内小胞輸送による細胞表面MHC-IIの発現制御機構を解析し以下の成果を得た。(1)MHC-IIは細胞表面に発現後、E3ユビキチンリガーゼであるMARCH-1の局在するエンドソームに輸送されることで、ユビキチン化され、リソソームで分解される。(2)MHC-IIはRab11およびRab35の制御するリサイクリング経路で輸送される。

研究成果の概要(英文)：Major histocompatibility complex class II (MHC-II) which expresses on dendritic cells presents antigenic peptides to CD4 T cells. The MHC-II-mediated antigen presentation initiates acquired immunity. Although the cell-surface expression of MHC-II is tightly regulated, the regulation mechanism remains to be clarified. In this study we obtained the following results: (1) Internalizing MHC-II from cell-surface is found to be targeted to the early endosome where E3 ligase MARCH-1 is localized. As a result, MHC-II is ubiquitinated and targeted for lysosomal degradation. (2) Recycling of internalized MHC-II to cell-surface is found to be regulated by Rab small G protein family, Rab11 and Rab35.

研究分野：医歯薬学

キーワード：樹状細胞 MHC class II Ubiquitin Endocytosis 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は皮膚や粘膜などの末梢組織に存在し、生体内に侵入した病原体などの抗原を取り込み、抗原由来ペプチドと主要組織適合抗原クラス II (MHC-II)との複合体を細胞内で形成し細胞表面に提示することで、T細胞を活性化する。その結果、抗原特異的免疫応答である獲得免疫応答を惹起する。

MHC-II の細胞表面発現量は T 細胞活性化誘導の決定因子の一つであるため、その発現量は厳密に制御されている。例えば、樹状細胞は、定常状態では周辺に存在する自己のタンパク質を常に取り込んでいるが MHC-II は低発現であり免疫応答を誘導しない。一方、病原体が生体に侵入すると、病原体の構成成分であるリポ多糖(LPS)などが、樹状細胞の Toll 様受容体(TLR)を刺激し樹状細胞を活性化する。その結果、樹状細胞の細胞表面 MHC-II 発現量が亢進し、効率よく抗原を提示する。

一般に膜タンパク質は、オルガネラ膜から出芽した小胞が輸送先のオルガネラ膜へ融合することで細胞内を輸送され、この過程は「小胞輸送」と呼ばれる。細胞表面に発現した膜タンパク質は、細胞内へと取り込まれ(エンドサイトーシス)初期エンドソームへと移行し、その後、リソソームへと輸送され分解されるが、一部は再度細胞表面へと輸送される(リサイクリング)。これらの輸送過程のバランスは細胞表面発現量を規定する要因の一つであり、MHC-II の発現もこの過程が調節されることで制御されると考えられる。しかしながら、樹状細胞表面の MHC-II の発現量を調節する分子機構には不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では以下の2項目について目的とした。

(1)これまでに MHC-II の細胞表面発現はユビキチン化によって分解が促進されることで発現が抑制されていることが報告されているが、MHC-II の輸送とユビキチン化の関連に関しては、その詳細な分子メカニズムには不明な点が多く残されていた。また、MHC-II の発現調節がユビキチン化のみによるのかという点についても不明であった。そこで、本研究では、MHC-II の輸送経路を解明し、その輸送におけるユビキチン化の役割を明らかとすることを目的とした。

(2)一般に小胞輸送は Rab ファミリー低分子量 G タンパク質によって制御されている。そこで、MHC-II の細胞表面発現量を制御する Rab の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞：MHC-II の転写活性化因子である CIITA 遺伝子を安定発現させた HeLa 細胞 (HeLa-CIITA 細胞)を用いた。HeLa-CIITA 細胞は MHC-II を構成的に発現する。

HeLa-CIITA への遺伝子導入は Fugene HD 試薬を用いて行い 24 時間培養後、実験に用いた。ヒト末梢血由来樹状細胞は、末梢血単核球を GM-CSF および IL-4 存在化 6 日間培養することで得た。

(2)免疫沈降法：細胞を細胞破碎液で可溶化し、遠心後得た上清に、あらかじめ抗 MHC-II 抗体を結合した Protein A Sepharose を添加し、4°C、2 時間振とうした。得られた沈降物を洗浄後、2xSDS sample buffer で懸濁し、煮沸し、遠心後得られた上清をイムノプロット法で測定した。

(3)蛍光抗体染色：細胞をカバーガラスに播種し一晚培養後、抗 MHC-II 抗体を 37°C で 1 時間処理し、固定後、細胞膜透過処理を行なった。二次抗体として Alexa Fluor 546 標識抗マウス IgG 抗体を用いて、取り込まれた MHC-II を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(4)細胞表面 MHC-II の発現量測定：細胞に抗 MHC-II 抗を結合後、PE 標識抗マウス IgG 抗体を 2 次抗体として結合させた。この細胞について、フローサイトメーター(FACSCalibur)で MHC-II の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1)MHC-II の細胞内輸送におけるユビキチン化の役割の解析

細胞表面 MHC-II のユビキチン化の経時変化と細胞内局在

細胞表面 MHC-II はユビキチン化されるとリソソームでの分解が促進されることが知られていた。そこで、細胞表面に発現した MHC-II についてユビキチン化の経時変化を検討した。その結果、細胞表面 MHC-II は、10 分をピークとしてユビキチン化されることが明らかとなった。そこで、細胞表面でラベルされた MHC-II の 10 分後の細胞内局在を蛍光抗体法で観察した。その結果 MHC-II は初期エンドソームタンパク質である EEA1 と共局在していた。さらに MHC-II のユビキチン化 E3 リガーゼである MARCH-1 も初期エンドソームに局在した。この結果より、細胞表面 MHC-II はエンドサイトーシス後、初期エンドソームに移行し、そこでユビキチン化されると考えられた。

インバリアント鎖(Ii)による MHC-II ユビキチン化回避機構の解析

MHC-II の形成過程では MHC-II は、まず Ii と複合体を形成し(Ii-MHC-II)、一旦細胞表面へと輸送され、その後細胞内へと再輸送されたのち抗原との複合体を形成する。しかしながら、Ii-MHC-II はユビキチン化されなかった。この結果より、Ii には MHC-II のユビキチン化を阻害する機能があると考えられた。そこで、そのメカニズムを解析した。Ii の細胞内領域にはクラスリン依存的エンドサイトーシスに必要なジロイシンモチーフが存在する。Ii の細胞内領域全域欠損変異体(Ii D

tail)、およびジロイシン変異体(Ii LL)を発現した細胞について Ii-MHC-II のユビキチン化を検討した結果、これらの変異体を発現する細胞では Ii-MHC-II のユビキチン化が観察された。これらの結果より Ii-MHC-II がユビキチン化されないのは、Ii もつジロイシンモチーフを介した細胞内輸送によると考えられた。

MHC-II のユビキチン化における輸送経路の役割の解析

抗原 MHC-II 複合体はクラスリン非依存的経路で輸送されるのに対し、Ii-MHC-II はクラスリン依存的経路でエンドサイトーシスされることが報告されている。そこでこの経路の違いが MHC-II のユビキチン化を規定している可能性を考え、検討を行った。siRNA 法によりクラスリン依存的エンドサイトーシスに必須のアダプタータンパク質である AP-2 をノックダウンし、クラスリン依存的エンドサイトーシスを阻害すると、Ii-MHC-II のユビキチン化が観察された。一方、AP-2 のノックダウンは抗原 MHC-II 複合体のユビキチン化には影響しなかった。これらの結果より、Ii-MHC-II はクラスリン依存的エンドサイトーシスで輸送されることによって、ユビキチン化を回避していると考えられた。

以上の結果より、細胞内では、前駆体である Ii-MHC-II は MARCH-I の存在しないエンドソームに輸送されることによって分解を免れるのに対し、抗原 MHC-II 複合体は MARCH-I の局在するエンドソームに輸送されることで分解されることが明らかとなった。これらの輸送制御機構によって MHC-II の細胞表面発現が適切に調節されているものと考えられる。

(2) Rab ファミリー低分子量 G タンパク質による細胞表面 MHC-II の発現量への影響

次に MHC-II の細胞表面の小胞輸送による制御機構の解析を行った。HeLa-CIITA 細胞に、多くのタンパク質の細胞表面発現に関与することが知られている Rab について、GDP 結合型変異体である常時不活性化変異体を発現させ、その機能を阻害することによる MHC-II の細胞表面発現量への影響を解析した。その結果 Rab11 および Rab35 の常時不活性化型を発現させた HeLa-CIITA 細胞においてコントロールに比べ、細胞表面の MHC-II の発現量が有意に低下した。これらの結果より MHC-II は Rab11 および Rab35 の制御するリサイクリングで細胞表面発現が制御される可能性が示唆された。MHC-II のリサイクリングを制御する Rab については、これが初めての報告であり、その生理機能についてはさらなる解析が必要である。

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 5 件)

Roche, PA., Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 203-216, (2015) 査読有、DOI: 10.1038/nri3818

古田 和幸、樹状細胞における細胞表面 MHC-II 分子の発現制御機構、生化学、86, 72-76 (2014) 査読有

Taura, A., Furuta, K., Yamaguchi, T., Kawabata, K., Tanaka, S. Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, growth factor independent 1 (Gfi1) and Gfi1b, in murine cultured mast cells. *Biol. Pharm. Bull.* , 37, 81-86 (2014)、査読有、DOI: 10.1248/bpb.b13-00616

Nakazawa, S., Sakanaka, M., Furuta, K., Natsuhara, M., Takano, H., Tsuchiya, S., Okuno, Y., Ohtsu, H., Nishibori, M., Thurmond, R. L., Hirasawa, N., Nakayama, K., Ichikawa, A., Sugimoto, Y., and Tanaka, S. Histamine synthesis is required for granule maturation of murine mast cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 204-214 (2014) 査読有、DOI:10.1002/eji.201343838

Furuta, K., Walseng, E., and Roche, P. A Internalizing MHC class II-peptide complexes are ubiquitinated in early endosomes and targeted for lysosomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 20188-20193 (2013) 査読有、DOI: 10.1073/pnas.1312994110

〔学会発表〕(計 4 件)

古田 和幸、黒田 真弘、田中 智之、主要組織適合抗原クラス II のリサイクリングを制御する Rab タンパク質の解析、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日～28 日、兵庫県神戸市

古田 和幸、Even Walseng、Paul Roche、主要組織適合抗原クラス II のユビキチン化におけるインバリエント鎖の役割、第 86 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日～18 日、京都府京都市

古田 和幸、Even Walseng、Paul Roche、インバリエント鎖による MHC-II のユビキチン化回避機構、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日～30 日、熊本県熊本市

古田 和幸、Paul Roche、活性化 T 細胞による樹状細胞表面 MHC-II の発現調節機構第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日～13 日、神奈川県横浜市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ：<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/meneki/>

プレス発表：マイナビニュース：岡山大、抗原提示の「主要組織適合抗原クラス II」が分解されるしくみを解明 2014 年 02 月 24 日
<http://news.mynavi.jp/news/2014/02/24/131/>

6．研究組織

(1)研究代表者

古田 和幸 (FURUTA KAZUYUKI)

岡山大学医歯薬学総合研究科 (薬学系)・

准教授

研究者番号：50644936

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし