

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18986

研究課題名(和文) T細胞受容体シグナルにおけるmDiaの活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of TCR signaling dependent mDia activation molecular mechanism

研究代表者

Thumkeo Dean (Thumkeo, Dean)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：40372594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞は獲得免疫の要であるが、T細胞の発生及び活性化にはTCRシグナルが不可欠である。申請者はこれまで、アクチン重合因子mDia1/3二重欠損マウスを用いることにより、TCRシグナルにはmDiaが促進的に働くことを見い出してきた。本研究では、さらにTCRシグナル伝達におけるmDiaの活性化の分子機序の解明を目指した。その結果、mDiaはTCRシグナル伝達においてRhoAという低分子量Gタンパク質によって活性化されることが分かった。さらには、EGFP-mDia3を発現させたT細胞を用いて、mDiaがTCR刺激により細胞内において細胞辺縁に局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：T cell is essential for adaptive immunity. T cells is activated by TCR signaling that is indispensable for T cell development and function. I have previously reported that mDia facilitates TCR signaling through the regulation of actin polymerization by utilizing mDia 1/3 double deficient mice. In this study, I further unraveled the molecular mechanism of mDia activation in TCR signaling. We found that mDia is activated by the small G protein RhoA upon TCR stimulation. In addition, using T cells expressing EGFP-mDia3, I found that mDia is localized at the cell periphery in T cells upon TCR stimulation. Therefore, mDia is activated upon TCR stimulation through RhoA at the cell periphery and facilitate TCR signaling through its actin polymerization activity.

研究分野：薬理学

キーワード：T細胞 mDia TCRシグナル アクチン

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫応答を司るT細胞はT細胞抗原受容体(T Cell Receptor; TCR)を用いて、自然界に存在する無数の外来抗原の攻撃から生体を防御することが知られている。これまで、抗原刺激からT細胞が機能発現するまでの分子シグナル伝達経路(TCRシグナル)が盛んに研究されており、多数のTCRシグナル分子が単離・同定されている。現在は、抗原がTCRに結合することがチロシンリン酸化カスケードと細胞内カルシウム上昇の引き金となり、T細胞の転写プログラムを活性化し、T細胞の増殖・分化に必要なサイトカインの産生に至ると考えられている。さらには、チロシンリン酸化蛋白及びカルシウムに加えて、TCRシグナル伝達における細胞骨格アクチン(F-actin)の関与も明らかになっている。近年、F-actinを阻害する薬剤を用いた実験から、適度なF-actinの重合と脱重合のバランスがTCRシグナル伝達の効率を促進することが示唆された。しかし、生体内の生理条件下での意義およびTCRからアクチンまでの分子情報伝達経路については未だ不明であった。

そこで、申請者が本研究に先立つ若手B研究“T細胞活性におけるmDiaの機能とその分子作用機序の解明”で、mDia1/3DKOの免疫系表現型を解析した結果、mDia1/3はTCRからアクチンまでの細胞内シグナル伝達に不可欠であることが明らかになり(Thumkeo et al. 投稿準備中1)、T細胞の発生に寄与していることが分かった(Thumkeo et al. 投稿準備中2)。しかし、抗原によるTCR刺激の下流でmDiaがどのように活性化されるのかという問題については、本研究を開始した時点ではその分子作用機序の実態は不明であった。また、これまでの培養上皮細胞あるいは培養線維芽細胞を用いた研究では、mDiaは低分子量タンパク質RhoAの結合によって活性化されることが報告されていたが、T細胞においては検討がされていないため、その関与は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究はTCRシグナル伝達において、TCRからアクチンまでの情報伝達にmDiaが不可欠であることに着目し、抗原刺激からmDiaが活性化されるまでの分子情報伝達経路を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、mDiaがアクチン細胞骨格に作用する分子機序とTCRシグナルにおける活性化分子メカニズムを解明するために、Jurkat T細胞のsiRNAによるノックダウン実験系を用いた。具体的にはmDia1/3の二重ノックダウン及びRhoAのノックダウンを行い、TCR刺激時の細胞内のF-actin量及び形態変化を比較観察した。また、細胞内においてmDiaがどこで活性化されるのかを検討するために、Jurkat T細胞を用いて、EGFPで標識したmDia3を発現させ、TCR刺激依存的mDia3の局在の観察も行った。TCR刺激の方法としてはカバーガラス上に、抗原提示細胞を模した脂質二重膜を置き、上からJurkat T細胞を落として接触させ

ることでTCR刺激を行った。EGFP-mDia3の動態は全反射顕微鏡TIRFによって観察した。さらには、超解像度NSTORM法を取り入れ、T細胞のF-actinの微細構造観察を試みた。

4. 研究成果

1) Jurkat T細胞におけるmDia1/3のノックダウン及びその表現系解析

Jurkat T細胞において、mDia1及びmDia3のタンパク発現を確認し、それぞれに対するsiRNAのスクリーニングを行った。その結果、効率よくmDia1及びmDia3を効率よくノックダウンできるsiRNAを1つずつ同定できた。mDia1単独あるいはmDia3単独をノックダウンした場合はアクチン細胞骨格に対しては明らかな影響が認められなかったが、ダブルノックダウンの場合は著名なF-actinの減弱を認めた(図1)。

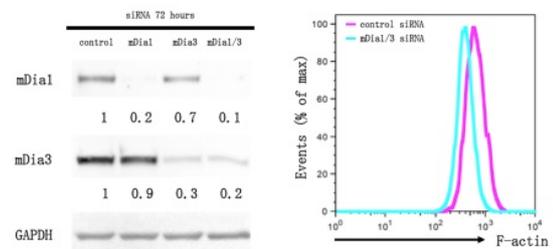


図1 mDia1/3ダブルノックダウンによるF-actinの減弱

2) Jurkat細胞におけるRhoAのノックダウンと表現系解析

Jurkat T細胞において、RhoAのタンパク発現を確認し、それぞれに対するsiRNAのスクリーニングを行った。その結果、効率よくRhoAを効率よくノックダウンできるsiRNAを1つ同定できた。RhoAをノックダウンした細胞は細胞の広がりや障害が見られた。また、RhoAのノックダウンは細胞縁のアクチン細胞骨格に対しては、mDia1/3をダブルノックダウンと同様、F-actinの減弱を認めた(図2)。

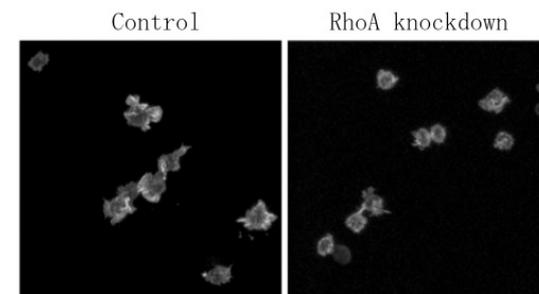


図2 RhoAノックダウンによる細胞の広がりや障害とF-actinの減弱

3) Jurkat T細胞におけるTCR刺激依存的mDia3の動態

これまでの解析から、mDia3はT前駆細胞に発現していることが分かっているが、その局在は不明であった。細胞内の局在変化を観察するために、そこで、Jurkat細胞にEGFP-mDia3を発現させ、抗原提示細胞を模した脂質二重膜を用い、TCR刺激依存的なmDia3の動態観察を行った。その結果、mDia3はTCR刺激によって、細胞膜辺縁に濃縮することが分かった(図3)。

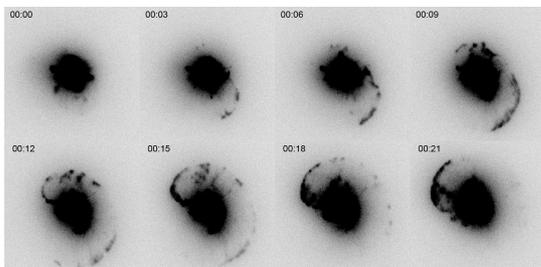


図3 Jurkat T細胞におけるTCR刺激依存的mDia3の細胞内局在

4) T細胞のF-actinの超解像度NSTORMイメージングの試み

T細胞のF-actinの微細構造を観察するため、T細胞のF-actinの超解像度NSTORMイメージングを試みた。その結果、イメージング条件の最適化がまだ必要であるものの、イメージ取得することに成功した(図4)。

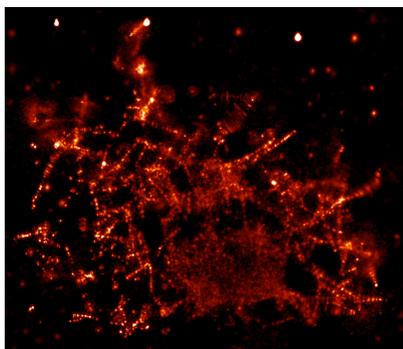


図4 T細胞のF-actinの超解像度NSTORMイメージング

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)

- 1) Takehiko Ueyama, Yuzuru Ninoyu, Shin-ya Nishio, Takushi Miyoshi, Hiroko Torii, Koji Nishimura, Kazuma Sugahara, Hideaki Sakata, Dean Thumkeo, Hirofumi Sakaguchi, Naoki Watanabe, Shin-ichi Usami, Naoaki Saito, Shin-ichiro Kitajiri. Constitution activation of Dia1 (DIAPH1) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. **EMBO Mol. Med.** 8, 1310-1324 (2016).

[学会発表](計11件)

- 1) Dean Thumkeo, Kiyoshi Tohyama, Pakorn Kanchanawong, Shuh Narumiya. mDia1/3-mediated cortical F-actin assembly is required for T cell receptor signaling. 第67回日本細胞生物学会, 東京, 2015年7月2日, シンポジウム
- 2) Satoko Sakamoto, Dean Thumkeo, Masahito Ikawa, Yoshitaka Fujiwara, Hiroshi Ohta, Sadanori Watanabe, Shuh Narumiya. Role of mDia in spermatogenesis. 第67回日本細胞生物学会, 東京, 2015年7月2日, 口頭発表
- 3) Dean Thumkeo, Ryota Shinohara, Shuh Narumiya. Roles of mDia1/3 in neuroepithelium integrity and neuroblast migration. The 56th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, USA, 2015年12月14日, ポスター発表
- 4) Dean Thumkeo, Satoko Sakamoto, Shuh Narumiya. Regulation of cortical F-actin meshwork architecture in Sertoli cell by mDia1/3. 生体運動合同班会議, 京都, 2016年1月8日, 口頭発表
- 5) Dean Thumkeo, Satoko Sakamoto, Shuh Narumiya. Indispensable role of mDia1/3 in sperm morphogenesis through the remodeling of Sertoli cell meshwork F-actin. 第89回日本薬理学会, 横浜, 2016年3月10日, ポスター発表
- 6) Yoshichika Katsura, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya. Jurkat T細胞におけるアクチン核化・重合タンパク mDia1/3の機能解析. 第130回日本薬理学会近畿部会, 京都, 2016年11月19日, ポスター発表
- 7) Ryuta Yokogawa, Dean Thumkeo, Yoshiki Arakawa. Vasohibin-1 is expressed in glioma and correlated with malignancy. 第90回日本薬理学会, 長崎, 2016年3月17日, 口頭発表
- 8) Yuzuru Ninoyu, Shin-ichiro Kitajiri, Takushi Miyoshi, Dean Thumkeo, Hirofumi Sakaguchi, Naoki Watanabe, Shin-ichi Usami, Naoaki Saito, Takehiko Ueyama. The molecular mechanism of hearing loss caused by a novel DIA1 mutant (R1204X). 第90回日本薬理学会, 長崎, 2016年3月16日,

口頭発表

- 9) Dean Thumkeo, Satoko Sakamoto, Takayoshi Fu, Shuh Narumiya. Roles of mDia, a Rho effector and actin nucleator, in eye development. 第90回日本薬理学会, 長崎, 2016年3月17日, ポスター発表
- 10) Yoshichika Katsura, Dean Thumkeo and Shuh Narumiya. Indispensible role of mDia1/3-dependent F-actin in immunological synapse. 第90回日本薬理学会, 長崎, 2016年3月17日, ポスター発表
- 11) Takayoshi Fuu, Satoko Sakamoto, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya. mDia1/3 regulates ectoplasmic specialization junction indispensable for sperm morphogenesis and male fertility. 第90回日本薬理学会, 長崎, 2016年3月17日, ポスター発表

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

タムケオ ディーン (THUMKEO DEAN)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40372594

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者
該当なし