

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21524

研究課題名(和文)LFA-1接着"時間"制御機構の一分子解析

研究課題名(英文)Single molecule analysis of the regulatory mechanism of LFA-1-dependent adhesion longevity

研究代表者

近藤 直幸 (KONDO, Naoyuki)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：30570840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：獲得免疫応答時に形成される超分子構造、免疫シナプス(IS)、上でのLFA-1の時空間制御機構を解明する目的で、全反射顕微鏡を用いたLFA-1/ICAM-1一分子結合計測実験系をIS上で確立し詳細な解析を行った。

その結果、LFA-1結合時間の分布はIS上で一様ではなく、Rap1やKindlin-3等のLFA-1活性化因子の局在箇所のみ長いLFA-1/ICAM-1結合が起こり、Rap1/Kindlin-3等の欠損細胞では長期型結合数が減少し細胞接着も低下した。以上から、IS上のLFA-1制御は細胞内因子の空間的な配置による結合時間調節により担われていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： In order to elucidate the spatiotemporal regulatory mechanism of LFA-1 on immunological synapse (IS), a supramolecular structure formed during adaptive immune response, we established single molecule measurement system of LFA-1/ICAM-1 binding events and investigated its regulatory mechanism.

We found that distribution of LFA-1 binding time is heterogeneous: long-term binding events occur only at a region where LFA-1 activatory factors such as Rap1 and Kindlin-3 localize. Furthermore, Rap1/Kindlin-3 deficient cells showed reduced number of long-term binding events, resulting in the defect in cell adhesion.

Collectively, we propose that the regulation of LFA-1 function is attributed to spatial allocation of cellular factors, which control binding time of LFA-1/ICAM-1.

研究分野：タンパク質科学，一分子生物学，免疫学，細胞生物学

キーワード：一分子解析 LFA-1 Rap1 Kindlin-3 免疫シナプス ICAM-1 全反射顕微鏡 平面脂質二重膜

## 1. 研究開始当初の背景

二次リンパ組織における T 細胞と抗原提示細胞(APC)との相互作用の”特異性と時間”の調節は、獲得免疫誘導の初期における最も重要な素過程の一つである。抗原-主要組織適合遺伝子複合体(pMHC)と T 細胞受容体(TCR)との相互作用や補助刺激因子間相互作用は”特異性”の決定を行うが、LFA-1 とそのリガンド ICAM-1 との相互作用は T-APC 複合体が持続する”時間”に大きく寄与し、T 細胞の抗原に対する感度を 10-100 倍も上昇させる<sup>1-2)</sup>。また CD8 陽性 T 細胞では、リンパ節内での LFA-1/ICAM-1 依存的な持続的な T-APC 相互作用がメモリー T 細胞への分化を著しく誘導し、ICAM-1<sup>-/-</sup>マウスでは二次免疫誘導におけるサイトカイン産生が顕著に低下することから<sup>3)</sup>、LFA-1/ICAM-1 による相互作用”時間”調節の長期免疫記憶に対する重要性も近年解明されつつある。

一方で白血球接着不全症(LAD)の患者では、LFA-1 構成要素の一つ  $\beta 2$  遺伝子や LFA-1 活性化を担う低分子量 G 蛋白質 Rap1 の GDP-GTP 交換因子 RasGRP2 遺伝子<sup>4)</sup>  $\beta 2$  の細胞内領域(CT)に結合する LFA-1 構造安定化蛋白質 kindlin-3 遺伝子<sup>5)</sup>等の変異が見られ、また Rap1 活性化の著しい低下も観測されており<sup>6)</sup>、それらによる免疫細胞間の接着異常は新生児期から感染症に対する重篤な免疫不全を引き起こす。LFA-1 は制御性 T 細胞の発生や抑制機能にも必要であり、LFA-1 接着破綻は免疫不全と自己免疫の複合的病態を呈する。また、国民の三分の一が発症するアレルギー・慢性炎症や自己免疫疾患は炎症細胞の過剰な集積が原因であり、インテグリンの阻害治療が期待されている。免疫監視の破綻を来さず、特異性や効率を上げた創薬には LFA-1 を介する接着の時空間的制御の分子メカニズムの解明が必要である。

LFA-1 は ICAM-1 親和性の異なる複数のコンフォメーションを取る。近年、

LFA-1 の状態が T 細胞内の複数の因子によって制御され、ICAM-1 との結合時間( $1/k_{off}$ )に密接に関連していることが *in vitro* の実験で分かってきた。ケモカイン/TCR 架橋による刺激が T 細胞に導入されると、RasGRP2/C3G が低分子量 G 蛋白質 Rap1 を活性化し、活性型の GTP-Rap1 がその下流分子を更に活性化する。Rap1 下流分子 Mst1<sup>7)</sup>、RapL<sup>8)</sup>は LFA-1  $\alpha L$  の CT に結合し、LFA-1 を活性化する。また  $\beta 2$ -CT と F-actin とを繋ぐ Talin-1、Kindlin-3 やその他の分子群も Mst1 と複合体を形成する。一方、これらが T-APC 接着面上のどこで、いつ LFA-1 結合時間を制御するかは未解明であった。

T-APC 接着面においては、”免疫シナプス”と呼ばれる超分子複合体が形成される。TCR と TCR 下流のシグナル伝達分子は接着面中心部の central supramolecular adhesion complex (cSMAC) に円状に集積し、TCR シグナルが停止する終着点の役割を果たす。TCR シグナル開始機構に関しては様々な仮説があったが、最近の一分子計測実験系を用いた研究から、TCR と pMHC 各一分子が接着面辺縁で結合しシグナル伝達分子を誘引して中心へ向かうことでシグナルが開始されることが明らかになり、長年の議論が一定の集結を迎えた。一方で、免疫シナプス上で LFA-1 は peripheral SMAC (pSMAC) と呼ばれるドーナツ状の分布を示す。pSMAC には前述の Talin-1 が LFA-1 と同様に局在する報告はあるが、cSMAC とは対照的に、LFA-1 とその関連因子が免疫シナプス上で空間的にどのように影響を及ぼし合うか、またそれらが活性化刺激後のどのタイミングで LFA-1 の結合時間を制御しているかといった、時間・空間的な制御メカニズムの詳細を分子レベルで実験的に解明した事例は極めて乏しかった。

<引用文献> 1) Schmits et al (1996) *JEM* 1415-26. 2) Bachman et al (1997) *Immunity* 549-57. 3) Scholer et al (2008) *Immunity* 258-70. 4) Pasvolsky et al (2007) *JEM* 1571-82. 5) Mory et al (2008) *Blood* 2591. 6) Kinashi et al (2004) *Blood* 1033-6. 7) Katagiri et al (2003) *Nat.Immunol.* 8) Katagiri et al. (2006) *Nat.Immunol.*

## 2. 研究の目的

研究代表者は免疫シナプスにおける LFA-1 の動的制御メカニズムを分子/原子レベルで解明する目的で研究を進めている。本研究では LFA-1 のコンフォメーション/結合時間を細胞内因子が免疫シナプス上でどのように制御しているかに主眼を置き研究をすすめる。

## 3. 研究の方法

全反射顕微鏡を用いて平面脂質二重膜上で ICAM-1 の蛍光標識体を観測する免疫シナプス解析の実験系を以前までに確立していたが、本研究では、全反射顕微鏡実験系の最適化により LFA-1/ICAM-1 複合体”一分子”の結合時間と拡散係数を測定するための ICAM-1 一分子計測系を確立し測定を行った。TCR 刺激の抗原は biotin 化抗 CD3 抗体/OVA-peptide MHC モノマーを蛍光標識化 (Alexa)Streptavidin (StAv) を介して biotin 含有平面脂質二重膜 (planar lipid bilayer, PLB) に提示させた。これに、OVA-peptide を認識する TCR transgenic マウスから単離した初代培養 T 細胞を加えて免疫シナプスを観測した。種々の細胞内因子の可視化には蛍光蛋白質との融合タンパク質を構築し、それをレンチウイルスベクターを用いて初代培養 T 細胞に導入した。また、LFA-1 活性化因子を欠損/ノックダウンさせたマウス/細胞を作製し、上述の一分子解析を行うことにより、LFA-1 の活性化に伴う細胞内因子の影響を一分子レベルで分析した。

## 4. 研究成果

(1) 一分子 LFA-1/ICAM-1 結合実験系の確立  
T細胞内での LFA-1 の動態を PLB 上での ICAM-1 の挙動を指標に解析するために、全反射顕微鏡を用いた蛍光標識 ICAM-1-GPI の一分子ライブイメージングを行った。まず一分子計測を達成するために、光安定性の高い ATTO 系列の蛍光物質を ICAM-1-GPI に標識化し、観測する分子数を制限して測定を行ったところ、3 分以上の長期一分子イメージングに成功した。次に、T細胞の有無で ICAM-1 一分子の挙動を比較したところ、運動性の指標となる拡散係数(D)が T細胞存在下で、非存在下と比較して二桁近く遅くなった。また LFA-1 を欠損した T細胞でも T細胞がない条件と同様の実験結果を示したことから、LFA-1/ICAM-1 特異的な一分子結合により、ICAM-1 の動きが遅くなり、この差を利用して一分子結合イベントが追跡できる実験系が確立された。

(2) LFA-1/ICAM-1 一分子結合の細胞内因子による空間的制御機構の解明

一分子結合イベントの結合時間を免疫シナプス上にマッピングし、cSMAC との空間的な関係性を調べたところ、一分子結合の時間分布には不均一性があること、10 秒以上の高親和性 LFA-1 の結合時間に相当する長期型の結合イベントは cSMAC の近傍に局在することが明らかになった (図 1)。

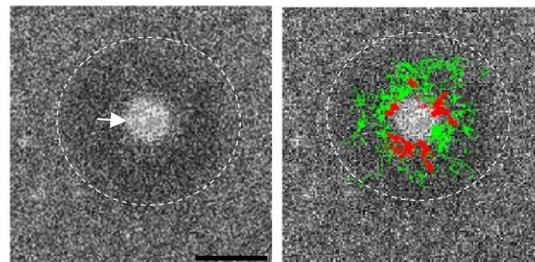


図 1. 一分子結合イベントの cSMAC 上での分布。点線で囲まれた領域が免疫シナプスの形成領域。矢印で示した部分が cSMAC 領域。(左図) cSMAC 像 (右図) cSMAC と LFA-1/ICAM 結合イベントとの重ね合わせ像。緑: 全てのイベント, 赤: 10 秒以上のイベント。Scale bar: 2.5  $\mu$ m

次に一分子結合イベントと細胞内因子との空間的な配置を調べる目的で、活性型 Rap1 可視化プローブや Kindlin-3 等の LFA-1 活性化因子の GFP 融合タンパク質を細胞に導入し、一分子結合イベントとの同時可視化を行ったところ、長期型結合が起こる箇所にはこれらの活性化因子が共局在することが明らかになった (図 2)。

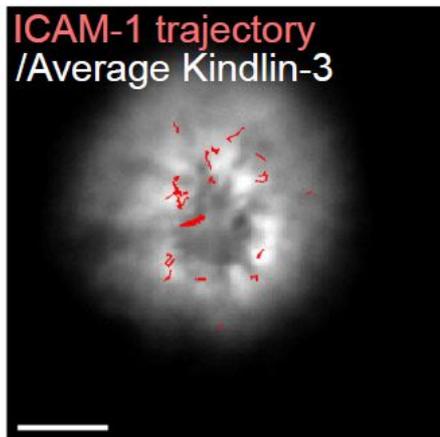


図 2 . 免疫シナプス上での長期型結合 LFA-1/ICAM-1 と Kindlin-3 との同時可視化。白: EGFP-Kindlin-3, 赤: 長期型結合イベントの軌跡。Scale bar: 2.5  $\mu$ m

また、Rap1, Mst1, Kindlin-3, NDR1 等の LFA-1 活性化因子を欠損、またはノックダウンさせた T 細胞を用いて、一分子解析を行い野生型と比較したところ、全体の結合イベントにおける長期型結合イベントの割合が減少し、その結果細胞の接着が低下していることが明らかになった(図 3)。

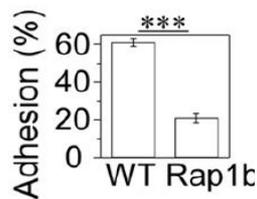
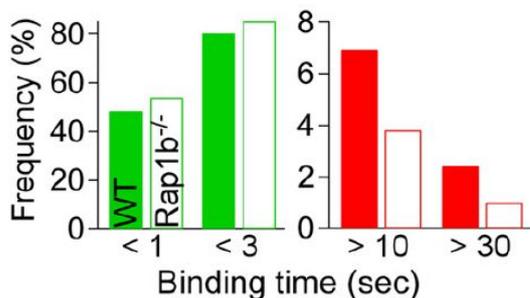


図 3. Rap1b<sup>-/-</sup> T 細胞における、一分子結合時間の分布 (上図) と細胞接着への影響 (下図)

以上の結果から、免疫シナプスの接着性の制御には LFA-1 の活性化因子の cSMAC 周辺への局在と、それによる LFA-1/ICAM-1 結合時間の長期化が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これに加えて LFA-1 活性化が cSMAC の形成自体にも影響を与えていることが一連の実験から明らかになりつつあり、将来的には TCR シグナルと LFA-1 シグナルのクロストークの詳細について研究を進めていく予定である。

#### 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 3 件)

1) **Kondo, N.**, Ueda Y., Kita T., Ozawa M., Tomiyama T., Yasuda K., Lim D.S. and Kinashi T. (2017) “NDR1-dependent regulation of Kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization” *Mol. Cell Biol.* (査読有) 37, (2017) e00424-16

DOI: 10.1128/MCB.00424-16

#### **SELECTED AS SPOTLIGHT**

2) Ueda, Y., **Kondo, N.**, Ozawa, M., Yasuda, K., Tomiyama, T. and Kinashi, T. “Seme3e/PlexinD1 modulates immunological synapse and migration of thymocytes by Rap1 inhibition” *J. Immunol.* (査読有) 196, (2016) 3019-3031

DOI: 10.4049/jimmunol.1502121

3) **Kondo, N.**, Marin, M., Kim, J.H., Desai, T.M. and Melikyan, G.B. “Distinct requirements for HIV-cell fusion and HIV-mediated cell-cell fusion” *J. Biol. Chem.* (査読有) 290, (2015): 6558-6573

DOI: 10.1074/jbc.M114.623181

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Yoshihiro Ueda, Madoka Ozawa, Yuji Kamioka, Naoyuki Kondo, Tatsuo Kinashi “Rap1-deficiency caused defective lymph node homing of lymphocytes and thymocyte-selection” 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016 年 12 月 5 日 8 日, 沖縄コンベンションセンター (沖縄・宜野湾市) (ポスター・口頭発表)

2) Naoyuki Kondo, Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi “High-affinity LFA-1/ICAM-1 binding triggers the reorganization of vesicular transport regulators to facilitate the maturation of immunological synapse” 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日 12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) (ポスター発表)

3) Naoyuki Kondo, Yoshihiro Ueda, Madoka Ozawa, Tatsuo Kinashi “Regulation of high-affinity LFA-1/ICAM-1 binding and immunological synapse formation” 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015 年 11 月 18 日 20 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市) (ポスター・口頭発表)

4) Yoshihiro Ueda, Naoyuki Kondo, Madoka Ozawa, Tatsuo Kinashi “Establishment of thymic organ culture system for regulatory T cell development” 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015 年 11 月 18 日 20 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市) (ポスター・口頭発表)

〔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：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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

近藤 直幸 (KONDO, Naoyuki)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30570840

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし