

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成27年度研究進捗評価用〕

平成24年度採択分
平成27年3月15日現在

T細胞活性化制御の時空間的構造的解析

Spatiotemporal and structural analysis of T cell activation
Regulation

課題番号：24229004

齊藤 隆 (SAITO TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター



研究の概要

T細胞の抗原認識に伴う活性化は、TCR ミクロクラスターに種々シグナル分子をリクルートして行われることを明らかにしたが、この活性化は副刺激や自然免疫シグナル、また細胞骨格によって制御されており、その制御機構の時空間的な解明を行う。TCR-CD3 複合体による抗原認識とそれに伴う活性化への構造的制御の理解のために、細胞内領域を含む TCR-CD3 複合体の全立体構造の解析を目指す。生体内での T 細胞活性化をリアル解析するとともに、常に自己認識によってセミ活性化されている T 細胞のシグナル制御系を明らかにする。

研究分野：医歯薬学・基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球、抗原認識、獲得免疫、イメージング、活性化シグナル

1. 研究開始当初の背景

T細胞は抗原を特異的に認識して活性化され、免疫応答を中心的に制御すると共に、一方、過剰な活性化によって自己免疫・アレルギー疾患を誘導する。そのためT細胞の活性化とその制御機構の解明は、免疫応答の制御への橋頭堡であり、本研究は、T細胞の抗原認識とそれによる細胞活性化の時空間的な制御の分子機構の全容を、イメージング・機能解析および構造解析によって明らかにする。

2. 研究の目的

①膜貫通領域を含むTCR複合体の構造解析により抗原認識・活性化の分子基盤の解明、②我々の発見したT細胞活性化ユニット「TCR ミクロクラスター」(TCR-MC)による活性化シグナルの細胞内空間的制御、③副刺激や自然免疫シグナルによるT細胞活性化と機能の制御、④活性化シグナルによる細胞動態制御、⑤細胞接着から活性化に至る制御のin vivoでの解明、⑥自己反応性T細胞の活性化制御の解析、を進めることを目的とする。これによってT細胞活性化の制御機構を包括的に解明し、調節への応用を目指す。

3. 研究の方法

1. TCR-CD3 複合体の膜・細胞内領域を含む

井全構造を明らかにするために、細胞膜分子をリポソームの形で配列させる理研の技術を応用して、結晶化を目指す。

2. TCR-MC とそれを介するシグナル、および副刺激による制御などは、pMHC, ICAM1 を GPI リンカーの形で発現させた人工脂質二重膜に T 細胞を反応させて、TIRF 顕微鏡でイメージング解析を行う。

3. in vivo での T 細胞活性化の動態は、FRET を基盤とする Ca センサー(Cameleon)発現マウスを用いて、生体内での活性化の動態を解析する。

4. CD11c-DTR 発現マウスを用いて DC 除去マウス、または抗 MHC クラス II 抗体投与マウスを用いて、T 細胞が in vivo で自己認識に伴う活性化を解析する

4. これまでの成果

1.TCR-MC を介する活性化制御

TCR-MC に会合する分子群を解析してきたが、その下流シグナルで異なるシグナル経路の制御、特に NF- κ B と Ras 活性化の制御の解析を行った。NF- κ B 活性化に重要な CARMA1 の動態を解析し、CARMA1 は休止期では GUK-SH3 領域の分子内結合によって closed 型だが、活性化すると open 型にな

り、分子間凝集が起こり活性化シグナルを cSMAC で誘導することが分かった。Ras 活性化に重要な 2 つの GEF, SOS と RasGRP1 の動態を解析し、SOS は TCR-MC そして cSMAC に集まる一方、RasGRP1 は細胞骨格分子 Plectin と会合して、特殊な ER 様メッシュ構造を形成し、活性化に伴ってプラズマ膜に移動して Ras と会合し活性化させる。Ras 活性化の細胞内コンパートメント化を明らかにした。

2. 副刺激・自然免疫シグナルによる制御

CD28, CTLA4 の制御に続き、抑制性副刺激受容体 PD-1 による制御を解析した。活性化に伴って PD-1 は TCR-MC, cSMAC に集積し、SHP2 を特異的に一過性にリクルートして、TCR シグナル上流分子を脱リン酸化させることが判明した。PD-1 細胞外領域の変異分子の解析から、PD-1 による抑制には TCR-MC に PD-1 が共局在して、抑制性クラスターを形成することが必須であることが分かった。

核酸は TLR を介して自然免疫を活性化させ、T 細胞にも副刺激を誘導する。TLR 非依存的に T 細胞にユニークな未知受容体によって認識され、NFκB, NFAT を活性化させる。Th 分化において、核酸は Th2 を特異的に誘導した。死細胞由来の DNA が Th2 を誘導することが分かり、生体内で感染などで誘導される死細胞由来 DNA で Th2 が誘導されることが判明した。

3. 細胞骨格による T 細胞活性化制御

活性化には LFA-1 を介する接着が不可欠である。LFA1 による inside-out と outside-in の両者によって高親和性結合ができる。TCR-MC の周りに一過性に接着分子によるリング構造ができ、特に弱い抗原刺激の時に接着シグナルを誘導して、活性化を助けていることが分かった。TCR-M が中心に、その周りを LFA1, Paxillin, Pyk2 など接着分子群が取囲み、F-アクチンに支えられたこの構造（マイクロシナプスと呼ぶ）は活性化に不可欠な構造であることを発見した。

4. 自己認識による T 細胞活性化の制御

生体内で T 細胞が常に DC との相互作用によって自己認識シグナルを誘導し、セミ活性化状態になっていることを解析した。活性化によってリン酸化の誘導、NFAT 活性化が誘導されていた。セミ活性化がないと T 細胞は不応答に陥ることが判明した。

5. 今後の計画

1. TCR-CD3 複合体の立体構造解析に向けての解析は容易でなく、現在全ての TCR, CD3 鎖の合成と CD3ζζなどのダイマー精製に成功し、CD3ζζは結晶化にも成功している。この解析を進め、活性化の理解に繋がる構造解析を成功させる予定である。

2. In vivo における T 細胞活性化を FRET による Ca センサーで解析する予定であったが、T 細胞では蛍光が弱く困難なので、異なる Ca センサーに変更し、改良しており、今後 in vivo での解析を行う。

6. これまでの発表論文等

1. Hara, H., Yokosuka, T., Hirakawa, H., Ishihara, C., Yasukawa, S., Yamazaki, M., Koseki, H., Yoshida, H. and Saito, T. Clustering of CARMA1 through SH3-GUK domain interactions is required for its activation of NF-κB signaling. *Nat. Commun.* 6: 5555, 2015.

2. Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T.: Nucleic acids sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat. Commun.* 5: 3566, 2014.

3. Tsukumo, S-I., Unno, M., Muto, A., Takeuchi, A., Kometani, T., Kurosaki, T., Igarashi, K. and Saito, T.: Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110(26): 10735-10740, 2013.

4. Liang Y., Cucchetti M., Roncagalli R., Yokosuka T., Malzac A., Bertosio E., Imbert J., Nijman I.J., Suchanek M., Saito T., Wulfiging C., Malissen B. and Malissen M.: The lymphoid lineage-specific actin-uncapping protein Rltpr is essential for costimulation via CD28 and the development of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 14(8): 858-866, 2013.

5. Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., and Saito, T.: Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* 209(6): 1201-1207, 2012.

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/ims/cell_signal/