

研究成果報告書の概要

講座等名	生体情報部門	事業推進者名	松田 達志
所属部門	代謝部門		
分担研究課題	Arf-mTORC1 軸を介した免疫制御機構の解明		
キーワード	小胞輸送制御、Arf ファミリー、mTORC1、細胞増殖		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	4名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）</p> <p>松田達志（准教授）：研究の総括 住吉麻実（助教）：T 細胞における Arf 経路の役割解明 小谷唯（研究員）：マスト細胞における Arf 経路の役割解明 丹京香織（研究医養成コース・3 回生）：Arf 阻害剤スクリーニング系の開発</p>			
<p>研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について）</p> <p>ADP-ribosylation factor (Arf)は Arf1-6 から成る低分子量 G タンパク質ファミリー分子であり、細胞の恒常性維持に必須な小胞輸送を制御することが知られている。また、ショウジョウバエ由来培養細胞を対象にした siRNA ライブラリースクリーニングにより、mTORC1 経路の活性化に関与する可能性が示唆されている。しかし、従来得られているこれらの知見は、培養細胞を対象とした過剰発現や阻害剤を用いた解析に依拠しており、高次生命現象の過程でどのような生理機能を担っているかについては、驚くほど知見が少ない。例えば、Arf 阻害剤である Brefeldin A は <i>in vitro</i> で T 細胞からのサイトカイン分泌阻害に用いられるが、個体レベルの免疫応答において Arf 経路が果たす役割は不明であった。そこで、Arf 経路の生理的役割を明らかにすべく、Arf の免疫細胞特異的ノックアウトマウスの樹立に取り組んだ。令和元年～2 年は特に T 細胞とマスト細胞に焦点を当て、Arf 経路の欠損が及ぼす影響の検証に取り組んだ。また、並行して、Arf 経路の新規阻害剤同定に向けたスクリーニング系の樹立に着手している。</p> <p>T 細胞においてどのファミリーメンバーが発現しているかを qPCR によって評価したところ、Arf1 と Arf6 が高いレベルで発現していることが明らかとなった。そこで、T 細胞特異的 Cre 発現マウスである Lck-Cre と Arf1-flox マウス・Arf6-flox マウスをそれぞれ交配することで、T 細胞特異的な Arf1 欠損マウス（以下、Arf1-TKO）・Arf6 欠損マウス（以下、Arf6-TKO）を樹立した。驚くべきことに、Arf1-TKO・Arf6-TKO は、何れも T 細胞分化に目立った変化は認められず、BrefeldinA 処理で認められるようなサイトカインの産生阻害も一切観察されなかった。この表現型は Arf1-TKO と Arf6-TKO を交配して得られる Arf1/6-TKO マウスにおいても同様であった。そこで Arf1/6-TKO を用いて、さらに Arf 欠損が T 細胞機能に及ぼす影響を調べた。すると、ヘルパー T 細胞の中でも特に Th17 細胞と呼ばれるサブセットが関与することが知られる実験的自己免疫生脳脊髄炎（EAE）の発症が著しく抑制されていることが明らかとなった。そこで、同じく Th17 細胞が関与する、Rag2-KO マウスへのナイーブ CD4⁺ T 細胞移入大腸炎誘発モデルを用いて Arf 欠損の影響を調べたところ、予想どおり、Arf 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入した Rag2-KO マウスでは、大腸炎の発症が完全に抑制されていた。各種の解析の結果、Arf 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞は活性化過程において高頻度でアポトーシスを起こすことが分かり、アポトーシス誘導因子である Bim の高発現がその背景に存在することが明らかとなった。このことが <i>in vivo</i> における病的な Th17 細胞の出現を抑制し、ひいては免疫病態の抑止に繋がっているものと考えられる。現在、Arf 経路と Bim の発現調節機構の関係性を検証中である。</p> <p>アレルギー反応のエフェクター細胞として知られるマスト細胞は、骨髄細胞を IL-3 共存下に培養することで <i>in vitro</i> で分化誘導可能である。Arf ファミリーの発現を調べたところ、T 細胞と異なり Arf1 が突出して高発現していたため、Arf1 がマスト細胞分化に関与する可能性を考え、タモキシフェン誘導性に目的の遺伝子を欠損可能な CreER^{T2} マウスと Arf1-flox マウスを交配して得られたマウス（以下、Arf1-CreER^{T2}）由来の骨髄を対象に解析を行った。分化誘導のごく初期からタモキシフェンを加えると、CreER^{T2} マウス由来の骨髄を対象とした場合でも全ての細胞が死滅することが判明したため、マスト細胞への分化が方向付けられる培養開始後 2 週間の時点でタモキシフェン処理により Arf1 を欠損させるプロトコルを採用した。その結果、タモキシフェ</p>			

ン処理した CreER^{T2}マウス由来マスト細胞に比して、タモキシフェン処理した Arf1-CreER^{T2}マウス由来マスト細胞の出現頻度は著しく減少することが明らかとなった。その後の解析から、Arf1欠損マスト細胞では IL-3 刺激に伴う ERK 経路の活性化に障害が見られることが分かり、現在、その分子基盤を解析中である。

Arf ファミリーは GTP を結合する活性型になると標的分子と会合するようになる。そこで最近開発された split Venus を利用して、Arf1 とその標的分子である GGA3 の会合を非侵襲的にモニターする系の樹立に取り組んでいる。令和 2 年度は、Ras とその標的分子である Raf1 との相互作用を評価するモデル系の構築に取り組み、FACS によって両者の会合をモニターすることに成功している。