



## 免疫細胞活性化に重要な中心体移動の謎解明

－ 中心体の移動が握る免疫制御 －

### 【要点】

- 免疫 T 細胞の活性化に必須の**中心体**（注1）の移動機構を明らかにした
- 様々な生命現象に関わるモーター分子を制御する仕組みに新たな知見
- 免疫細胞の活性制御に関わる基礎的な仕組みの解明につながる

### 【概要】

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系のリム・ウェイ・ミン大学院生（当時）、伊藤由馬助教、十川久美子准教授（当時）、徳永万喜洋教授の研究チームは、免疫 T 細胞の活性化に必須な、中心体が細胞表面近くに引き寄せられる仕組みを明らかにした。

免疫システムの司令塔として働くリンパ球 T 細胞が、抗原を認識して活性化する際には、**微小管**（注2）の集まる中心体が細胞表面側に移動することが知られていた。これにより、免疫を司る種々のサイトカインと呼ばれるタンパク質を細胞外に分泌したり、感染細胞やガン細胞を殺したり、T 細胞の活性化自体を制御するという免疫応答がもたらされる。しかしながら中心体移動の機構は、よくわかっていなかった。

今回、複数種類のタンパク質分子を生きた細胞で同時に観察できる光学顕微鏡を使って、多種類の分子の働き方を明らかにした。微小管は、中心体を起点として細胞膜近くまで伸びているが、その上で働くタンパク質分子・**CLIP-170**（注3）により、モーター分子を中心体方向と細胞膜方向の両方向に移動させる新たな機構を発見した。これは、これまで一方向だけに動くと言われていたモーター分子では新たな発見で、基盤的な働きをする分子モーターの関わる多くの生命機能の解明に、新たな展開をもたらすと期待される。

今年のノーベル生理学・医学賞で注目を集めるガン免疫療法の対象として受賞対象となった分子の一つは、この中心体移動により細胞表面に配置されることが知られており、免疫療法の進歩など将来的な応用に繋がることが期待される。

本研究成果は、英国のオンライン科学雑誌『*Scientific Reports*』にて、2018年11月28日に掲載された。

## ●研究の背景と経緯

免疫細胞は、体を外敵から防御する免疫系として中心的な役割を担っている。病原菌・ウィルスや花粉などの異物が体内に侵入したことを察知すると、樹状細胞などの抗原提示細胞がそれらを取込み、抗原として細胞表面に提示する。リンパ球の1種であるT細胞は、提示された抗原を認識すると活性化し、免疫系の細胞間シグナル分子であるサイトカインを分泌したり、感染細胞やガン細胞を殺したり、抗体産生を促すなど免疫系を活性化する司令塔として働く。

抗原提示を受けたT細胞表面では、T細胞受容体が数十～数百分子集合した「マイクロクラスター（注4）」と呼ばれる集合体が形成される。これは、抗原提示細胞との細胞接着面の中央領域に集まり「免疫シナプス（注5）」と呼ばれる特徴的な構造を形成し、免疫応答の場として機能する。

細胞内部の核近くには、中心体（微小管形成中心）と呼ばれる小器官があり、細胞骨格である微小管が集まっている。微小管は中心体を起点として放射状に細胞周辺まで伸びる（図1）。T細胞が活性化されると、この中心体が免疫シナプスの中心近傍に移動する。

この中心体の移動は、T細胞が活性化されて種々の免疫応答を営むようになるために必要な現象だ。今年のノーベル生理学・医学賞は、免疫を制御するタンパク質の発見と、それを対象とした抗体医薬によるガンの免疫療法の開発に対して授与された。抗体医薬の対象タンパク質で受賞対象となった分子の1つにCTLA-4があるが、CTLA-4を細胞表面へ配置するには中心体移動が必要である。

中心体移動の仕組みは、これまで謎として残されていた。それは中心体移動には多くの種類の生体分子が関わり、それぞれ分子の動き・細胞内配置・分子間相互作用が時間的・空間的にダイナミックに変化していて、解明が容易ではなかったからだ。

## ●研究の内容と成果

研究チームではこれまで、蛍光（注6）を使って分子1個1個を光学顕微鏡で直接観察できる1分子イメージング顕微鏡を用いて、対物レンズ型全反射照明（TIRF）法（注7）や薄層斜光照明（HILO照明）法（注8）を開発してきた。

今回、複数種類のタンパク質分子を同時に生きた細胞で観察できる多色蛍光顕微鏡を使って、多種類の分子が織りなす中心体移動の仕組み解明を目指した。

まず、微小管に結合する分子に注目した。微小管は中心体を起点として細胞周辺へと伸長する。伸長先端であるプラス端に結合するタンパク質・CLIP-170はリン酸化（注9）されることで、微小管の伸長を促進するタンパク質だ。CLIP-170のリン酸化を阻害したT細胞を刺激したところ、中心体は細胞膜の近くに来たが、免疫シナプスが形成される細胞接着面の中心近傍には移動しなかった（図2）。しかも、T細胞からはサイトカインIL2の放出はなかった。このことから、リン酸

化された CLIP-170 は、中心体の免疫シナプス近傍への移動に必要不可欠であるとともに、T 細胞の活性化に必須であることがわかった。

CLIP-170 と他のタンパク質および中心体移動との関係を、多色蛍光顕微鏡を用いて調べた。CLIP-170 と他のタンパク質とをそれぞれ蛍光で標識し同時観察し、2 色の蛍光動画像を重ね合わせる (図 2)。同様の場所に局在している割合や動く速さと向きについて、T 細胞の刺激の有無による変化や中心体の移動とともに定量した。

その結果、中心体が細胞接着面の中心近傍に移動するには、T 細胞への刺激と、CLIP-170 のリン酸化との両方が必要であることがわかった。T 細胞を刺激することでダイニン (注 1 0) は活性化され、微小管上を単独でマイナス端方向へ運動する。さらに CLIP-170 がリン酸化されていると、ダイニンの一部が CLIP-170/ダイナクチン (注 1 1) 複合体と結合し、微小管プラス端領域に結合し、プラス端方向へ移動する。マイナス端方向とプラス端方向の両方向への移動が共存することにより、ダイニンが細胞接着面の中央領域に集まり、その結果、中心体が中心近傍に移動し、T 細胞が活性化されることを見出した (図 2)。

活性化したダイニンの速さは以前に報告されている中心体の移動速度と良く一致していたことから、細胞膜に固定されている活性化ダイニンが微小管を引き寄せ中心体を移動させていることが明らかとなった。

## ●今後の展開

今回の成果は、生きた細胞で多種分子を同時に顕微鏡観察し、分子動態と相互作用を定量解析することが、従来解けなかった問題を解決する強力な手法であることを示している。

多様な働きをするダイニンは、最近解かれた構造と、多種分子との相互作用、多様な動態、機能との関係が解明されつつある。今回の新たな知見は、分子モーターが関わる多くの生命機能の解明につながると期待される。

今回明らかになった免疫活性化の仕組みは、ガン免疫療法における抗体医薬の対象タンパク質・CTLA-4 の細胞表面への配置を制御するものだ。抗 CTLA-4 抗体は、既に承認されて治療が始まっている。従来の化学療法に比べて副作用は少ないとされているが、安全性への十分な配慮が必要となる。本成果は、より安全な治療法への進歩や、免疫制御の新しい操作方法への発展など、将来的な応用が期待される。

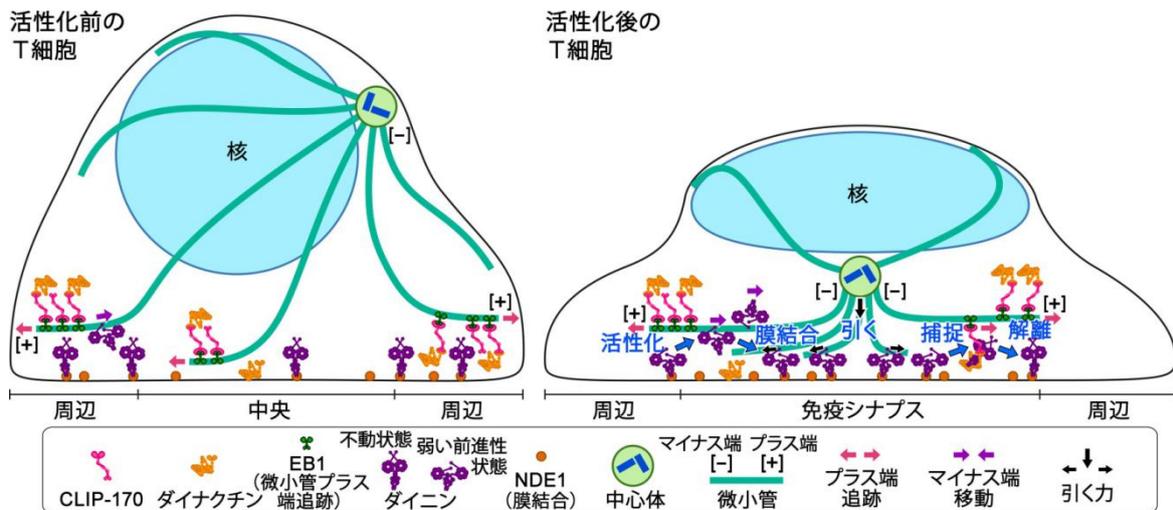


図 1. 抗原刺激された T 細胞において中心体が細胞接着面の中心近傍に移動する仕組み

(左) 抗原刺激を受けていない休止状態の T 細胞では、中心体は細胞核の近傍にあり、微小管が放射状に細胞周辺へと伸長している。モーター分子・ダイニンのほとんどは細胞膜に結合して動かない状態にある。微小管プラス端集積因子である CLIP-170 は、休止状態の T 細胞でもリン酸化されていて、プラス端領域に結合して微小管の伸長を追跡しプラス端方向へ動いている。CLIP-170 とダイニンとはほとんど結合していない。

(右) 抗原刺激を受けた T 細胞では、ダイニンの一部が“活性化”され、ダイニン単独で微小管上をマイナス端方向に遅く動く「弱い前進性状態」になる。前進運動の持続性は低く、1~2 $\mu$ m 未満のマイナス端方向へ運動した後、アンカータンパク質 (NDE1 と推測される) との結合で“膜結合”して止まる。

これと並行して、ダイニンの少数の一部が CLIP-170/ダイナクチン複合体に“捕捉”され、微小管プラス端領域に結合しプラス端方向へ移動する。この移動状態も安定ではなく、1~2 $\mu$ m の追跡後、ダイニンは複合体から“解離”し、アンカータンパク質により膜結合して止まる。

マイナス端方向とプラス端方向の両方向への移動が共存することが重要で、ダイニンが細胞接着面の中央領域すなわち免疫シナプスに集まり、中心体が細胞接着面の中心近傍に移動し、T 細胞が活性化される。

また、活性化された「弱い前進性状態」のダイニンの速さは以前に報告されている中心体の移動速度と良く一致した。このことと、微小管とダイニンの配置状態とは、細胞膜に固定されている活性化ダイニンが微小管を引き寄せ、その結果、中心体を移動させているという分子機構を示している。

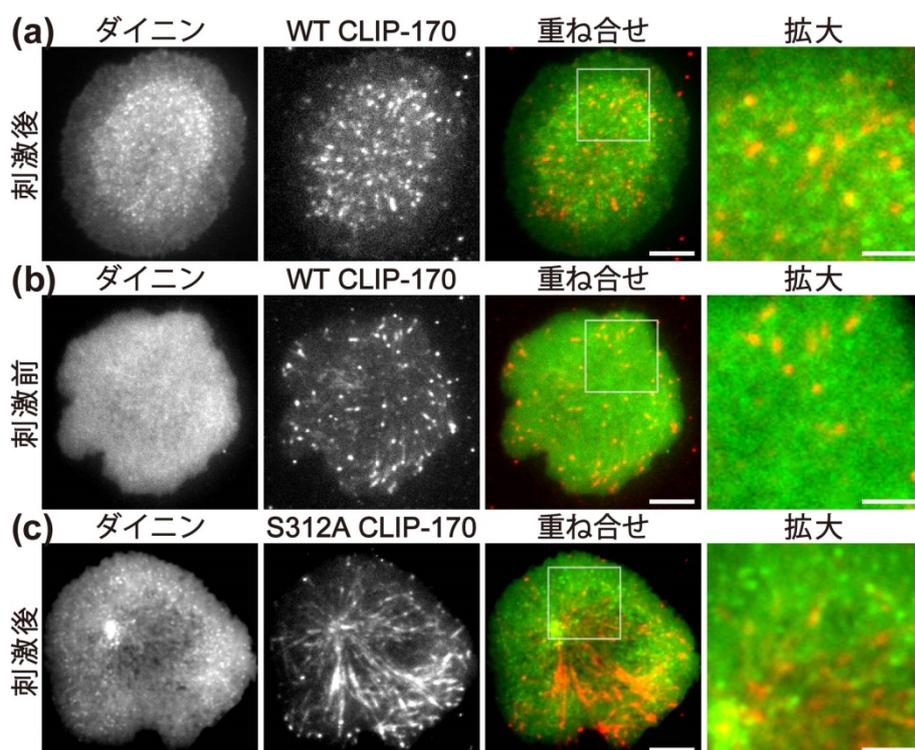


図2. 2色同時蛍光分子イメージングにより、中心体移動にはT細胞刺激とCLIP-170リン酸化の両方が必須であることが示された

緑色蛍光タンパク質 GFP で標識したダイニン（左端）と、赤色蛍光タンパク質 RFP で標識した CLIP-170（左から 2 番目）とを、Jurkat T 細胞（ヒト白血病 T 細胞由来の細胞株）に発現させ、2色同時蛍光顕微鏡で、細胞接着面を観察した。白黒画像を蛍光色で着色したうえで重ね合せ（右から 2 番目）、正方形で示した領域を拡大表示した（右端）。輝点は分子が集めたクラスター。重ね合せで黄色に見える部分は、ダイニンと CLIP-170 が共局在していることを示している。図中のスケールバーは、重ね合せ画像が  $5\mu\text{m}$ （右から 2 番目）、拡大図が  $2\mu\text{m}$ （右端）。

※動画 [https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-018-35593-z/MediaObjects/41598\\_2018\\_35593\\_MOESM3\\_ESM.mov](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-018-35593-z/MediaObjects/41598_2018_35593_MOESM3_ESM.mov)

※WT は wild type の略で、変異体でない本来のままの分子の意。S312A は、リン酸化される 312 番目のセリンをアラニンに置換した変異体で、リン酸化されない状態にある。

### 【用語説明】

(注1) 中心体 (centrosome) : 微小管の形成中心として働く細胞内小器官。微小管形成中心 (microtubule-organizing centre) とも呼ばれる。通常、細胞 1 個に 1 個だけあり、核の近くに存在する。細胞分裂時に複製され、紡錘体の中心として働く。

(注2) 微小管 (microtubule) : 主要な細胞骨格の 1 つ。チューブリンと呼ば

れるタンパク質が重合して形成される外径約 25 nm の管状の構造。形態形成、細胞分裂、細胞内物質輸送、細胞運動など多様な役割を担っている。微小管は静的構造ではなく、伸長と短縮を繰り返しており、細胞内では中心体を起点として細胞周辺へと伸長してゆく。

- (注 3) **CLIP-170 (cytoplasmic linker protein 170)** : 微小管プラス端集積因子の 1 つであるタンパク質。リン酸化されていない CLIP-170 は、プラス端領域に比較的安定に結合し、微小管の伸長速度を抑えるが、リン酸化 CLIP-170 はプラス端領域で速く結合解離し微小管の伸長を促進する。他の微小管プラス端集積因子のタンパク質である EB1 (end-binding protein 1) を介して微小管と結合。細長い形をしており、一方の端で EB1 と結合し、他端でダイナクチンと結合する。
- (注 4) **マイクロクラスター** : T 細胞が活性化する際に、T 細胞膜に形成される T 細胞受容体複合体 (TCR/CD3) の数十~数百分子の集合体。シグナル伝達分子も結合する。T 細胞受容体分子複合体が、抗原提示細胞により提示された抗原と結合すると、マイクロクラスターが形成される。これが起点となり、T 細胞受容体シグナルが伝達され、T 細胞が活性化される。マイクロクラスターは中心領域へ集積し、免疫シナプス (注 5) を形成する。
- (注 5) **免疫シナプス** : 抗原提示細胞が T 細胞を活性化する際には、両細胞は強固に接着し、接着面の上にリング状の構造が形成されるが、この構造を免疫シナプスと呼ぶ。各種受容体や情報伝達分子および関連分子が集積し、情報伝達や免疫応答の場として機能する。
- (注 6) **蛍光** : 照明した光とは色 (波長) の異なる光を出す現象のこと、もしくは出された光。蛍光を発する色素 (蛍光色素) を用いて、観察対象を標識して見る蛍光顕微鏡法は、色の違いを利用して、標識した観察対象から出た蛍光のみを選び観察することができるので、背景光をカットして微弱にし、見たいもののみを鮮明に見ることができる。※名前が誤解をしばしば招くが、生物の蛍が光るのは生物発光によるもので蛍光現象とは異なる。
- (注 7) **全反射照明 (TIRF) 法** : 試料と基板ガラスの境界面で、照明光を境界面に平行に近い角度で入射すると、全反射が起こる。全反射の際には、試料側にごく薄く表面から深さ 50~200nm (ナノメートル) 程度の近傍のみに光 (エバネッセント光) が沁み出る。このエバネッセント光を蛍光の照明として用いる手法。
- (注 8) **薄層斜光照明 (HILO 照明) 法** : 対物レンズに照明光を入射するのに、全反射照明よりも少しだけ対物レンズ中心軸寄りにレーザー光を入射すると、試料の内部を薄く照明することができる手法。細胞内を鮮明

に分子イメージングすることができる。

- (注9) **リン酸化**：リン酸基を付加する反応。タンパク質では通常、セリン、トレオニン、チロシンのOH基がリン酸化される。酵素や受容体では、リン酸化は活性化制御に用いられており、シグナル伝達においては、リン酸化はシグナルとして用いられている。
- (注10) **ダイニン (dynein)**：分子モーターの一種で、微小管上をマイナス端（中心体）方向にATPの加水分解エネルギーを使って運動する。細胞運動・細胞内物質輸送・染色体分配などを行う細胞質ダイニンが今回の研究対象。最近、原子レベルの構造が解かれ、多様な動態・多種の他分子との相互作用・多様な機能と、構造との関係が解き明かされつつある。
- (注11) **ダイナクチン (dynactin)**：細胞質ダイニンと結合するタンパク質。計23個のサブユニットで構成され、フィラメント部分と、ショルダー (shoulder) 部分とからなる。ショルダー部分は、フィラメントから出た“肩”と“腕”のような構造をしており、その先端にCLIP-170結合部位がある。

#### 【論文情報】

論文名：CLIP-170 is essential for MTOC repositioning during T cell activation by regulating dynein localisation on the cell surface

著者：Wei Ming Lim, Yuma Ito, Kumiko Sakata-Sogawa, Makio Tokunaga

掲載誌：*Scientific Reports*

DOI：10.1038/s41598-018-35593-z

#### 【問い合わせ先】

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系 教授

徳永 万喜洋（とくなが まきお）

E-mail：mtoku@bio.titech.ac.jp

Tel：045-924-5711

Fax：045-924-5831

#### 【取材申し込み先】

東京工業大学 広報・社会連携本部 広報・地域連携部門

E-mail: media@jim.titech.ac.jp

Tel: 03-5734-2975

Fax: 03-5734-3661