

Rab8による白血球特異的インテグリン LFA-1の

細胞内輸送の制御機構

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 西脇研究室 桃井康行

リンパ球は生体内を常に循環することで外敵からの生体防御を行う。リンパ球の生体内移動は接着分子インテグリン LFA-1(インテグリン α_L , β_2)と ICAM-1 との接着が重要な役割を果たす。LFA-1はケモカイン刺激や抗原刺激を受けると低分子量Gタンパク質 Rap1や、その下流分子である RAPL 及び Mst1 を介して活性化され ICAM-1 との接着が可能となる。更に、活性化した LFA-1 は細胞前方に集積し、より強固な接着が誘導されることが知られている。しかしながら、LFA-1 の集積メカニズムについては、ほとんど解明されていない。そこで、小胞輸送を制御する低分子量Gタンパク質である Rab ファミリーに注目し、Yeast-two hybrid assay により Mst1 と結合する Rab タンパク質の網羅的解析により Rab8 が同定された。Rab8 は腸管上皮丁端側へのタンパク質輸送や繊毛形成における輸送において中心的な役割を担う。本研究では Rab8 が LFA-1 の小胞輸送を制御していると考え、LFA-1 輸送における Rab8 の役割を解明することを目的として研究を進めた。まず初めに、免疫細胞における Rab8 の局在を明らかにするために、マウスの pro-B 細胞株にヒト LFA-1 を発現させた細胞 (BAF/LFA-1 細胞) に、GFP-Rab8 をレンチウイルスにより導入した。次に、CRISPR/Cas9 system を用いて Rab8a 及び Rab8b のエクソン1のガイドRNA発現ベクターを電気穿孔法にて導入後、ウエスタン法にてスクリーニングし、ゲノムシーケンスによって Rab8a および Rab8b の欠損株(Rab8 DKO細胞)であることを確認した。親株および Rab8 DKO細胞を用いて共焦点顕微鏡、Flow cytometry により、LFA-1 の分布および発現量の変化、細胞形態、透過電子顕微鏡を用いて細胞内構造を解析した。リンパ球における Rab8 の役割を明らかにするために GFP-Rab8a を発現させた BAF/LFA-1 細胞を作製し、免疫蛍光染色法により Rab8 の局在を確認したところ Rab8 はゴルジ体周辺および細胞膜に局在した。次に CRISPR/Cas9 システムを用いて Rab8 欠損株を作成した。Rab8a シングルノックアウト及び Rab8b シングルノックアウトは形態の変化は認められなかったが、Rab8a/Rab8b ダブル欠損 (DKO) 細胞では、免疫蛍光染色法により LFA-1 の局在を検討したところ、細胞運動時において F-アクチンに富む先端膜への LFA-1 の集積が減少し、細胞内に LFA-1 と F-アクチンに富む膜を持つ空胞様構造の形成がみられ、さらに電子顕微鏡像により親株では見られない空胞が細胞質に存在した。FACS 解析により細胞内と細胞表面の LFA-1 発現量を定量したところ Rab8 DKO 細胞では細胞表面発現が低下した。これらの結果より LFA-1 が正しく先端膜に輸送されず細胞

内に LFA-1 が集積する事が明らかとなった。また、このような変化が Rab8 欠損によって直接起こったかどうか確認するために Rab8a 遺伝子を導入したところ、正常な形態変化、LFA-1 局在に復帰した。次に FACS 解析により LFA-1 のインターナリゼーション/リサイクリング解析を行った所 Rab8 DKO 細胞では LFA-1 のリサイクリングが抑制されていることが明らかとなった。Rab8 のファミリー分子としては、Rab10 および Rab13 が知られており、胎児繊維芽細胞(MEF)細胞では、Rab8 と Rab10 に関して機能的代償制があることが知られているため、Rab8 DKO 細胞に GFP-Rab10 及び GFP-Rab13 の遺伝子をレンチウイルスにより導入し巨大小胞形成が消失するか検証したところ、共に影響はみられなかった。免疫蛍光染色法により Rab8 DKO 細胞における Rab10, Rab13 の局在の観察を行った所、巨大小胞膜にそれぞれの Rab が局在することが明らかとなった。Rab8、Rab10 及び Rab13 が協調的に働き LFA-1 のリサイクリングを制御している可能性が示唆された。