

## 免疫監視機構に重要な Rap1GEF の同定とその制御機構

生物科学専攻 免疫学

DS-16903 桃井 康行

リンパ球はケモカイン刺激を受け、三量体 G タンパク質 ( $G_{\alpha}$ ) を介してシグナルが入ると、末梢リンパ節へのホーミングに重要な Leukocyte function associated-1 (LFA-1) が活性化される。以前の研究で、低分子量 G タンパク質である Rap1 はケモカインによって急速に活性化され、LFA-1 依存的な HEV (high endothelial venule) への接着に必要不可欠であることが示された。Rap1 は GEF (Guanine nucleotide exchange factor) の働きによって活性化型の Rap1-GTP へと変換されるが、免疫細胞においてケモカイン刺激の下流で働く Rap1 の GEF は、明らかになっていなかった。

フォスファチジン酸 (PA) は、ケモカイン応答時に PLD (Phospholipase D) によってホスファチジルコリンが加水分解され生成し、Rap1 GEF として RA-GEF-1 が PA と結合することが報告されている。そこで私は、PA と RA-GEF-1 がどのドメインを介して結合するかを Lipid binding assay を行い検証し、PA は、RA-GEF-1 の CDC25-HD ドメイン内の 919-967 番目のアミノ酸を介して直接結合することを見出した。次に、PA と RA-GEF-1 との結合が細胞遊走に関与するかどうか検証するために、マウスのプロ B 細胞 (BAF) に human LFA-1 を発現させた細胞 (BAF/LFA-1 細胞) を用いて、CRISPR/Cas9 システムによって RA-GEF-1 ノックアウトした BAF/LFA-1 細胞を作成した。RA-GEF-1 ノックアウト BAF/LFA-1 細胞は ICAM-1 上での遊走が低下することがわかった。このノックアウト細胞に Wild-type (WT)-RA-GEF-1 を発現させると遊走障害は回復したが、一方で RA-GEF-1 の  $\Delta 919-967$  変異体を発現させるとその遊走障害は回復しなかった。これらの結果より、PA と RA-GEF-1 の結合は、細胞の遊走に重要な役割を果たすことが示唆された。次に、RA-GEFs の Rap1 に対する GEF 活性に PA が関与するかどうか検討した。BAF 細胞を PLD 阻害剤で処理し、ケモカイン刺激による Rap1 の活性化を検討したところ、Rap1 の活性は抑制されなかったため、PA と RA-GEF-1 の相互作用はケモカイン依存的な Rap1 に対する GEF 活性上昇には関与していないことがわかった。そのため、私は PA 産生が細胞内の RA-GEF-1 の局在に関与している可能性を検討した。BAF 細胞に RA-GEF-1-GFP と PASS-mcherry (PA マーカー) を導入し、免疫蛍光染色法により RA-GEF-1 と PA の局在を観察したところ、ケモカイン非存在下では RA-GEF-1 と PA は、共局在していなかったが、ケモカイン刺激を受けた細胞において細胞膜の一部で共局在した。これは、PA がケモカイン刺激後の RA-GEF-1 の細胞膜での局在を決定していることを示唆した。さらにケモカイン刺激によって PA 依存的に RA-GEF-1 は細胞膜へ移行することを確認するために、私は RA-GEF-1 の細胞内局在が PLD 阻害剤及び PA 結合ドメイン欠損によって影響を受けるかどうか検証した。その結果、PLD 阻害剤及び PA 結合ドメイン欠損によって、ケモカイン刺激依存的な細胞膜への RA-GEF-1 の局在化は優位に低下することが明らかとなった。これらの結果より今回の論文では、私は GPCR (G protein-coupled receptor) 依存的な刺激は細胞膜での PA 合成を誘導し、PA との結合を介して RA-GEFs は細胞膜へ誘導され、それはリンパ球の遊走に重要な役割を果たすことを明らかにした。