

Nara Women's University

高次生命現象における小胞輸送制御因子 Arf1・Arf6の協働:ArfGAPs SMAP1・SMAP2 研究の発展と免疫系における機能解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-05-07 キーワード (Ja): SMAP1・SMAP2の相互作用解析, 高次生命現象, 小胞輸送制御因子 キーワード (En): Arf1, Arf6, ArfGAPs 作成者: 住吉,麻実 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10935/5568

高次生命現象における

小胞輸送制御因子 Arf1・Arf6 の協働

-ArfGAPs SMAP1・SMAP2 研究の発展と免疫系における機能解析-

2021 年

住吉 麻実

目次

目次	2
要旨	4
総合序論	8
第一章 個体における SMAP1 と SMAP2 の相互作用解明	
序論	13
材料と方法	17
結果	
1-1. SMAP1・SMAP2 は細胞内で複合体を形成している	27
1-2. <i>SMAP1</i> ・ <i>SMAP2</i> 二重欠損マウスは胎生致死である	27
1-3. <i>SMAP1</i> ・ <i>SMAP2</i> 二重欠損 MEF において トランスフェリンの取り込みは正常である	28
1-4. <i>SMAP1</i> ・ <i>SMAP2</i> 二重欠損は受精後 7.5 日目胚でアポトーシスを誘導する	31
討論	33
図表	35
第二章 T 細胞の生存維持における Arf1 と Arf6 の協調作用	
序論	51
材料と方法	58
結果	
2-1. 全身性 <i>Arf1</i> 欠損マウスは胎生致死である	72

2-2. <i>Arf1</i> ^{-/-} 胚盤胞は <i>in vitro</i> 培養で正常に増殖する	72
2-3. <i>Arf1</i> コンディショナルノックアウトマウスの作製と系統樹立	73
2-4. <i>Arf1/6</i> 欠損 T 細胞の胸腺分化は正常である	74
2-5. T細胞における <i>Arf1</i> ・ <i>Arf6</i> の欠損はサイトカイン分泌能に影響を及ぼさない	76
2-6. <i>Arf1/6</i> -KO マウスにおける抗体産生能は正常である	77
2-7. <i>Arf1</i> と <i>Arf6</i> は mTORC1 が制御する T細胞の機能に重要ではない	78
2-8. <i>Arf1/6</i> -KO マウスでは大腸粘膜固有層の CD4 ⁺ T細胞数が減少している	79
2-9. TCR 刺激下で <i>Arf1/6</i> 欠損ナイーブ CD4 ⁺ T細胞はアポトーシスが亢進される	80
2-10. T細胞における <i>Arf1/6</i> の欠損は自己免疫疾患の発症を抑制する	83
討論	86
図表	91
総合討論	128
引用文献	132
謝辞	143
研究業績	145

要旨

小胞輸送は、脂質二重層でできた輸送小胞を介して細胞内でタンパク質の輸送を担う機構であり、胚発生から免疫系・神経系に至るまで様々な生命現象において重要な働きをしている。ADP-ribosylation factor (Arf) ファミリーは、小胞輸送の開始を制御する Ras 型低分子量 G タンパク質であり、その機能はグアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide-exchange factor, GEF) と GTP アーゼ活性化タンパク質 (GTPase-activating protein, GAP) を通じた活性型と不活性型のバランスによって制御される。Arf ファミリーには Arf1-6 の 6 つのアイソフォームが存在し、中でも Arf1 と Arf6 の研究が最も進んでいる。Arf1 は Arf2-Arf5 と同様にゴルジ体近傍で小胞輸送に働き、共通の GEF や GAP を多く持つことから機能的な重複が示唆されている。対して、Arf6 は細胞膜付近で働く事、他のアイソフォームとは別のアクセサリタンパクと結合する事、特異的な GEF と GAP を多く持つことなどから、Arf1 と別々の小胞輸送経路で働いていると考えられてきた。一方で、Arf1 と Arf6 の類似した機能についてもいくつかの報告がなされている。例えば、培養細胞を用いた解析から、Arf1 と Arf6 は何れもインテグリンの局在制御を介したがん細胞の移動や、PLD 依存ホスファチジン酸産生を介した mTOR の活性化に関与することが示されている。さらに興味深いことに、酵母ツーハイブリッド系で Arf6 特異的 GAP として知られる SMAP1 と Arf1 特異的 GAP として知られる SMAP2 が互いに結合しうることや、外来性の SMAP1・2 を培養細胞へ共導入すると一部共局在していることが明らかとなっており、Arf1 と Arf6 のそれぞれに対する GAP が相互作用することが示唆された。

本研究では、高次生命現象における小胞輸送制御因子 Arf1・Arf6 の協働の可能性を検証した。第一章では、Arf1・Arf6 の GAP である SMAP1・SMAP2 の相互作用解析に始まり、両者が胚発生過程で相補的に働いており、正常な胚発生に不可欠であることを明らかにした。第二章では、SMAP1・SMAP2 の標的である Arf1・Arf6 に着目して、欠損マウスを用い

た個体発生における *Arf1* の生理機能解析と免疫系における *Arf1*・*Arf6* の機能解析を行い、*Arf1* と *Arf6* とが T 細胞の生存維持機構において協調的に働くことを明らかにした。以下で、各章で取り組んだ内容を詳述する。

第一章では、*SMAP1* と *SMAP2* の相互作用の有無を個体レベルで明らかにするために、*SMAP1/2* 二重欠損マウスの作製に取り組んだ。*SMAP1* 欠損マウスは老齢期に骨髄異型性症候群を発症する一方、*SMAP2* 欠損マウスは精子先体形成異常により雄が不妊となるが、共に成体まで正常に発生することが既に報告されている。一方、*SMAP1* 欠損マウスと *SMAP2* 欠損マウスの交配を行っても、二重欠損マウスの誕生を確認することはできなかった。そこで詳細な解析を進めたところ、*SMAP1* と *SMAP2* の両者を欠損すると、受精後 7.5 日目に胚遠位領域でアポトーシスの亢進が生じ、結果として胚は致死となる事が明らかとなった。これまでに *SMAP* を含め 33 の *ArfGAP* が報告されているが、この結果は、*ArfGAP* 同士で遺伝的・機能的な相補が行われていることを示す初の報告である。また、*Arf GAP* の *SMAP1* と *SMAP2* が相互作用するという知見は、それぞれの標的である *Arf6* と *Arf1* が協調的に働く可能性を強く示唆する。

第一章での発見に基づき、個体レベルにおいて *SMAP1*・*SMAP2* の標的である *Arf1* と *Arf6* が協調的に働くか否かを明らかにすることを考えた。そのためには、まず *Arf1*・*Arf6* それぞれの生理機能を理解する必要がある。全身で *Arf6* を欠損したマウスは既に作製されており、胎生致死であることが報告されている。一方で、*Arf1* の欠損が個体に与える影響は不明であったため、第二章では、初めに全身で *Arf1* を欠損するマウスの作製に取り組んだ。その結果、全身で *Arf1* を欠損すると受精後 3.5~5.5 日の間に死に至ることが明らかとなった。これらの結果を踏まえると、現存するマウスでは、成体レベルにおける *Arf1* の機能解析や *Arf1*・*Arf6* 各欠損マウスの交配による二重欠損マウスの樹立は不可能であることが判明した。そこで、時期・組織特異的に *Arf1* の欠損誘導が可能である *Arf1* コンディショナルノックアウト (*Arf1-cKO*) マウス を新たに作製することにした。*Cre/loxP* システムを利用

し、Arf1 遺伝子の exon2, 3 を欠損標的として loxP 配列を設定し、サザン法と PCR 法を用いて Arf1-cKO マウスの樹立成功を確認した。今回樹立した Arf1-cKO マウスは、将来的に成体における Arf1 の生理機能解析への応用や Arf6-cKO マウス（共同研究者である筑波大・金保教授が樹立済み）との交配によって、個体における Arf1・Arf6 の相互作用研究に応用できる、非常に有益な解析ツールである。実際に樹立したマウスを使用し、個体レベル、特に高次生命機能現象の一つである免疫系における Arf1 と Arf6 の働きを明らかにするため、T 細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Lck-Cre マウスと Arf1、Arf6、Arf1/6、それぞれの cKO マウスを交配することで T 細胞特異的 Arf1 欠損マウス、Arf6 欠損マウス、Arf1/6 二重欠損マウスの 3 種類のマウスを樹立した（以下、それぞれの T 細胞特異的 cKO マウスを Arf1-KO、Arf6-KO、Arf1/6-KO マウスと表記する）。T 細胞は胸腺で分化した後、末梢で機能するため、最初にこれらのマウス由来の胸腺細胞を解析することで T 細胞分化を評価した。その結果、これら 3 種類のマウスにおいて T 細胞分化は一見して正常であった。次に、末梢 T 細胞の機能に関する各種解析を行った。Arf1 経路の阻害剤として知られる brefeldin A は活性化 CD4⁺ T 細胞からのサイトカイン分泌を阻害することが明らかとなっているため、まずは Arf1/6 欠損 CD4⁺ T 細胞におけるサイトカイン分泌能を調べた。その結果、予想とは異なり Arf1・Arf6 の両者を欠損しても、サイトカインの分泌には異常は認められなかった。加えて、卵白アルブミン (OVA) と Alum アジュバントで免疫した際に誘導される OVA 特異的抗体レベルや、mTOR 経路、細胞の移動能のいずれにおいても異常は認められなかった。一方で、Arf1・Arf6 の両者を欠損した時にのみ、T 細胞受容体 (TCR) を介した刺激によってナイーブ CD4⁺ T 細胞で高頻度にアポトーシスが誘導されることを見出した。同様の刺激を加えても、Arf1-KO や Arf6-KO 細胞ではこのようなアポトーシス亢進は認められなかった。TCR 刺激した Arf1/6-KO ナイーブ CD4⁺ T 細胞では、アポトーシス関連因子 Bcl-2 ファミリーの発現バランスに異常が見られること、さらに抗酸化物質である N-アセチルシステインによってアポトーシスが部分的に抑制されたことから、Arf1/6 の欠損により活

性化に伴う活性酸素種への感受性が亢進することが、アポトーシスの原因であることが示唆された。最後に炎症性腸疾患や多発性硬化症などの自己免疫疾患のマウスモデルを使用し、Arf1/6 欠損によるナイーブ CD4⁺ T 細胞の生存維持機構の異常が病態発症に影響を及ぼすか否か検討した。その結果、T 細胞特異的に Arf1 と Arf6 を欠損すると、これら自己免疫疾患の発症が著しく抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、これまで別々の小胞輸送経路で働くと考えられてきた Arf1 と Arf6 が T 細胞の生存維持機構において、協調的に働くこと示す。加えて、Arf1/6-KO マウスが抗体産生能を維持する一方で、自己免疫疾患の発症が抑制されることから、Arf 経路を標的とすることで日和見感染等の副作用が少ない自己免疫疾患の治療法開発に繋がるものと期待される。

総合序論

我々の基本単位である細胞には様々なオルガネラが存在し、各々がネットワーク網を張り巡らせ協調して働いている。そして個々のオルガネラが特異的な役割を示すためにはそれぞれのオルガネラ特有に存在するタンパク質が必要であり、かつそのオルガネラの目的にあった物質の輸送が行われなければならない。例えばリソソームはリソソームに独自のタンパク質分解酵素（加水分解酵素）を保持しているため、細胞内でタンパク質分解工場として働くことができ、そして分解されるべき不要なタンパク質が選択的にリソソームに運ばれるといった具合である (1)。このようにオルガネラ間のタンパク質の輸送は細胞にとって必須な機構のうちの1つである。

オルガネラ間の輸送はタンパク質の作られる過程にもあてはまる。膜貫通タンパク質、細胞外の分泌タンパク質やゴルジ体、リソソームに存在するタンパク質の多くも粗面小胞体表面のリボソームで合成され、シスゴルジへ輸送され、ゴルジ体間を通過する過程で段階的に修飾されるうち（一部の糖鎖修飾ないし糖鎖の再構成、脂質付加、リン酸化）、成熟（プロセッシング）に、輸送される目的地ごとに運ばれる先の選別を受けながらトランスゴルジ側へと移動、やがて各オルガネラに輸送されていく (1, 2)。これら生成、修飾が正しく行われるためには的確、適切に目的輸送物質を選択的に輸送することが大切である。ゴルジ体を含め様々なオルガネラ間の物質の輸送は主として供与側オルガネラ膜が変形し、くびり取られ、そこに積み荷タンパク質が積み込まれるという小胞輸送によって行われる (1)。小胞輸送は、細胞内で様々なオルガネラ間の輸送に働くだけでなく、細胞膜を介して細胞内外との物質のやり取りにも働いており、細胞内への栄養分の輸送や、細胞のシグナル伝達・恒常性の維持にも重要である。そのため、この基本メカニズムの解明研究を行った3名は2013年にノーベル医学生理学賞を受賞している。

小胞輸送は大きく分けて3つのステップ（出芽、輸送、受容側オルガネラへの融合）に分けることができる（図1）。まず活性化状態の小胞輸送開始制御因子が細胞膜に突き刺さり、後に小胞の膜表面を覆い保護する役目を担う被覆タンパク質や、積み荷タンパク質と被覆タンパク質を結びつける役割を持つアクセサリタンパク質といったその輸送形態に必要なエフェクタータンパク質をリクルートする。必要なタンパク質の集積と同時に膜が変形し出芽形態をとる。被覆タンパク質もしくはアクセサリタンパク質が特定の細胞内小器官へ運ばれるべき積み荷タンパク質の細胞質領域に存在する輸送シグナルを認識し、選択的に集合させる。そしてくびり切りがおこり出芽する。その後目的オルガネラへと運ばれていき、やがて目的地にたどり着いた小胞が受容側オルガネラの膜と融合し、積み荷タンパクが輸送されるという過程である（1, 3）。輸送目的地別に小胞輸送開始因子やリクルートされる被覆タンパク質は異なり、このことが積み荷タンパク質の選択性をコントロールしている。小胞輸送ステップがただ正常に行われれば良いというわけではなく、小器官から出芽する膜の移動（順行輸送）と戻りの移動（逆行輸送）は釣り合わなければオルガネラの膜バランスが崩れてしまう。また不可逆性の輸送の場合でも必要以上に供与側のオルガネラにタンパク質が輸送されては、そのオルガネラの働きを妨げることになる。小胞が必要なところで必要な時に必要なだけ組み立てられることが細胞の正常な働きにおいて非常に重要である。この小胞輸送の釣り合いという観点からも注目されるのが、小胞がどのようにどのタイミングで作られるのかということである。すなわち、輸送を担う輸送小胞の形成開始機構がどのように制御されているのかを理解することが小胞輸送の解明において重要である。

小胞輸送開始制御因子として知られるものに、ADP-ribosylation factor (Arf) ファミリーがある。Arf ファミリーは Arf1-6 のアイソフォームからなる Ras 型低分子量 GTP 結合タンパク質である。Arf は GTP が結合した活性化状態と GDP が結合した不活性化状態があり、Arf 機能の ON/OFF を制御しているのが、グアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine

nucleotide-exchange factor , GEF) と GTP アーゼ活性化タンパク質 (GTPase-activating protein, GAP) である (1-5) (図 2)。現在、ヒトでは約 15 種類の Arf GEFs と約 30 種類の Arf GAPs が報告されており、それぞれの GEF や GAP は全ての Arf アイソフォームに対して同等に作用するのではなく、ある程度の特異性をもって働くことが知られている (4)。例えば、Arf6 は他の Arf アイソフォームとは異なり、brefeldin A (真菌の一種である *Penicillium brefeldianum* が産生する化合物) の処理による機能阻害が見られないことが知られているが、これは Arf6 特異的に働くいくつかの GEF が、brefeldin A に対する抵抗性を持つためである (6, 7)。そのため、それぞれの GEF や GAP がどの時期に、どの Arf アイソフォームに対して働くのかを理解することは、Arf の機能を理解することに繋がる。

6 つあるアイソフォームの中で Arf1 と Arf6 についての研究が最も盛んに行われており、これまでの報告から Arf1 は Arf2-5 と同様に、小胞体-ゴルジ間やゴルジ嚢間などゴルジ体近傍の輸送経路に働くのに対して、Arf6 は細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスやリサイクリングなど、細胞膜付近の輸送に働くことが知られている (8, 9)。前述したように、Arf6 は特異的な GEF を多く持ち、さらに他の Arf2-5 と比較して Arf1 とのアミノ酸配列の相同性も低い。これらの結果から、今まで Arf1 と Arf6 は別々の小胞輸送経路に働くと考えられてきた。興味深いことに、培養細胞レベルの研究から Arf6 の GAP である SMAP1 と Arf1 の GAP である SMAP2 が結合し、細胞内で一部が共局在することが明らかとなった。SMAP1 と SMAP2 が実際に生体内でどのように関わりあっているのか、またその関わりはどのような機能を担っているかを明らかにすることは、今まで未知であった Arf1 と Arf6 の関わりを明らかにする上で、重要な鍵となると考えられる。

最近になって、小胞輸送とさまざまな疾患との関与も明らかとなってきている。例えば、クラスリン依存性のエンドサイトーシスに関与するとされている CALM は、アミロイドβ の凝集に関与する酵素の細胞内局在を制御することから、アルツハイマー病との関連が示唆されている (10)。また、Arf ファミリーと同じく Ras 型低分子量 G タンパク質として知

られている Rab ファミリーのアイソフォーム Rab27A の変異は、キラーT 細胞における細胞傷害性顆粒の輸送を阻害し、結果的にグリセリ症候群という免疫疾患の原因となる (11, 12)。このように、小胞輸送は個体の生理機能においても重要な働きをしているため、培養細胞を用いた研究だけではなく、個体レベルの解析が重要である。個体における Arf ファミリーの機能解析という点では、Arf6 の研究が最も進んでいる。全身で Arf6 を欠損したマウスは、肝臓の発達不全により、胎生中期から後期にかけて致死となる事が明らかとなっている (13)。その後、時期・組織特異的に Arf6 の欠損を誘導させることができる Arf6 コンディショナルノックアウトマウスが、共同研究者である筑波大・金保安則教授の研究室で作製されたことにより、神経系や腫瘍血管新生における Arf6 の働きが徐々に明らかとなりつつある (14, 15)。一方、私が研究を開始した時点では、Arf1-5 の欠損マウスを用いた解析の報告はなく、個体における Arf1-5 の重要性については不明な点が多く残されていた。

本研究では、培養細胞レベルで示唆されていた SMAP1 と SMAP2 の相互作用を個体レベルで示すと共に、個体発生における Arf1 の重要性を明らかにした。さらに、Arf1 コンディショナルノックアウトマウスの作製を行うことで、最終的に高次生命現象の一つである免疫系において Arf1 と Arf6 が協調的に働くことを明らかにした。第一章では、個体における SMAP1 と SMAP2 の相互作用、第二章では、全身性 Arf1 欠損マウスの表現型と免疫系の中でも特に T 細胞における Arf1 と Arf6 の機能に関して詳しく述べる。

第一章

Arf GAPs SMAP1 と SMAP2 の相互作用

序論

細胞内小胞輸送は、細胞内の様々な細胞内小器官の間だけではなく、細胞膜を介して細胞内外との物質のやり取りにも働いており、細胞内への栄養分の輸送や不要になった物質をリソソームへと輸送し分解を促すだけではなく、細胞のシグナル伝達・恒常性の維持にも重要である (1, 2)。また、がんやアルツハイマー病などの疾患への関与も示唆されているため医学的にも関心が高まっている (3, 10, 16)。さらに、最近では発生現象との関連も明らかになりつつある。例えば、後期エンドソームとリソソームの形成に必要な Vam2 の欠損マウスでは、細胞内での bone morphogenetic protein (骨形成因子, BMP) とその受容体が細胞表層から初期エンドソームへと移行した後に分解されず、BMP シグナル活性が長期間維持されることにより胎生 7 日目 (E7.0) には予定神経領域の外胚葉において顕著な細胞死 (アポトーシス) が観察され、胎生致死となる事が報告されており、細胞内小胞輸送が行う物質の空間的な制御が発生段階においても重要であるということが分かり始めている (17)。このように、細胞内小胞輸送は基礎生物学から医学への関与が分子レベルで明らかにされつつあり、それぞれの生命現象にどの小胞輸送経路が関与するかを解明することは非常に重要であるとされる一方で、小胞輸送を制御する因子については未だ不明な点が多い。

細胞内小胞輸送のステップは供与側膜上での輸送小胞の形成からスタートする。この時、重要な働きをしている分子として、ADP-ribosylation factor (Arf) が挙げられる(4, 5)。この遺伝子は、Ras, Rab, Ran, Rho といったファミリーメンバーと同様に Ras 型の低分子量 GTP 結合タンパク質スーパーファミリーに属している (3)。哺乳類 Arf には Arf1~Arf6 まで (ヒトには Arf2 が存在しない) のサブファミリーが存在しており、その中でも特に Arf1 と Arf6 の研究が進んでいる(5, 18)。Arf1 は小胞体からゴルジ体への小胞輸送とゴルジ体とエンドソーム間での小胞輸送に、Arf6 は細胞膜からの小胞輸送やアクチンの細胞骨格の制御に、それぞれ重要であると考えられている (9, 19)。Arf は GTP と結合した活性型、GDP と結合し

た不活性型の状態をとり、その制御は GTPase Activating Protein (GAP) と Guanine nucleotide Exchanging Factor (GEF) によって担われる(1-5) (図 2)。不活性型 Arf の GDP が GEF の作用によって GTP と交換され活性型 Arf になると、Arf が細胞膜へと結合し、それが合図となって輸送小胞の形成に必要な膜成分のリクルートと輸送小胞の形成が開始する。また GAP の作用によって活性化された Arf の GTPase により、活性型 Arf の GTP が GDP へと加水分解され不活性型 Arf になると、輸送小胞の形成が終了し細胞膜から離脱する。Arf は自身で活性型・不活性型の状態を選ぶことができないため、小胞形成の場所、小胞輸送の開始と収束のタイミングを制御しているのは GEF と GAP である。

私の研究対象である Small ArfGAP Protein (SMAP) は ArfGAP として小胞輸送を制御している。現在、ArfGAP には SMAP ファミリーを含む 10 のファミリーの存在が知られており (20)、複数の ArfGAP が同じ Arf に働くことが知られている。例えば ArfGAP である ACAP1、ACAP2、ARAP2、Git1、Git2、SMAP1 は Arf6 に働くことで輸送を制御し、一方 ArfGAP1、ArfGAP3、ASAP1、SMAP2 は Arf1 に働くことで輸送を制御している (21)。しかし、どのようにして複数の ArfGAP が同じ Arf を制御しているのか、またそれら ArfGAP の働きが重複しているのかそれとも異なるのかということは現時点では分かっていない。

SMAP1 と SMAP2 は比較的最近発見された ArfGAP 遺伝子である。SMAP1、SMAP2 タンパク質は、それぞれ 440 aa、428 aa で構成されており、お互いに全体で 50 % のアミノ酸相同性を示している (22, 23)。機能的なドメインとして、SMAP1、SMAP2 どちらも ArfGAP ドメインとクラスリン結合ドメインを持ち、SMAP2 に関してのみ CALM 結合ドメインが存在することが報告されている(22, 23)。SMAP1 は当初細胞の膜に結合するタンパク質として単離され、その機能は赤血球の分化と増殖を促進する支持細胞因子ではないかと推定されていた (24)。その後の研究から、大腸菌を用いて作製した SMAP1 の ArfGAP ドメインが、同じく大腸菌を用いて作製した Arf6 タンパク質に対して *in vitro* の評価系で ArfGAP 活性を示すことなどが明らかにされ、SMAP1 は典型的な ArfGAP であることが判明した (22)。ま

た *SMAP1* のホモログである *SMAP2* に関しても、同様に *Arf1* タンパク質に対する *ArfGAP* であることが判明した (23)。

SMAP1、*SMAP2* それぞれをノックダウンした培養細胞を用いた研究からは、*SMAP1*、*SMAP2* がどのように小胞輸送に関与しているかに関する知見がいくつか得られている。*SMAP1* はプルダウン法により直接クラスリンと結合することが示され、さらに培養細胞内で過剰発現させた *SMAP1* はクラスリンを細胞膜に局在させないことから、クラスリン依存性の小胞輸送に関わるものと考えられている(22)。クラスリン依存性の小胞輸送には、積荷タンパク質とクラスリンとを仲介するタンパク質としてクラスリンアダプター (AP) が必要となる (25)。*SMAP1* は、クラスリンとクラスリンアダプターAP-2 とを介して、鉄イオンを細胞内に輸送するトランスフェリン受容体や、細胞間の接着結合に関わっている *E-cadherin* の細胞内への取り込みを制御することが明らかにされている (22, 26)。*SMAP2* は、培養細胞内でクラスリンアダプターの AP-1 や EpsinR と初期エンドソームやトランスゴルジネットワーク (TGN) で共局在することから、TGN と初期エンドソーム間のクラスリン依存性の輸送に関わっていることが考えられる (23)。*SMAP2* の過剰発現は、ゴルジ体の形成に必須の遺伝子である TGN38/46 分子の TGN 上への輸送を遅らせることが明らかにされている (23)。

また、*SMAP1*、*SMAP2* 各々の欠損マウスが作製され、*SMAP* の個体レベルでの研究結果も報告されている (16, 27)。*SMAP1*、*SMAP2* 各々の欠損マウスはどちらも成体まで正常に成長することが分かっているが、*SMAP1* 欠損マウスは、トランスフェリンの取り込みの亢進や増殖因子受容体である *c-Kit* の細胞内輸送阻害などのクラスリン輸送系の脱制御が原因となり、12 ヶ月齢以降の高齢マウスで骨髄異型性症候群を発症しやすくなる(16)。一方 *SMAP2* 欠損マウスは、精子先体の形成時に TGN からつくられる先体前駆小胞が大きすぎ、一つに融合できないことで、通常はフック状である精子頭部が円形になり、オスが不妊になる (27)。すなわち、*SMAP1* と *SMAP2* が細胞内部の異なる場で異なる物質の小胞輸送を

制御するという細胞レベルの解析結果と同様に、両者が個体レベルでも全く異なる機能を担っていると考えられてきた。

しかし、最近となって、酵母のツーハイブリッド系で *SMAP1* と *SMAP2* とが結合することや、外来性の *SMAP1* と *SMAP2* とを COS7 細胞へ共導入した際に一部が共局在することが明らかとなった(図3)。さらに *SMAP1* 単独欠損培養細胞を用いた最近の研究から、*SMAP1* 欠損細胞で *SMAP2* をノックダウンさせるとトランスフェリンの取り込みが阻害されることが報告された (16)。つまり、*SMAP1* と *SMAP2* とはトランスフェリンの取り込みにおいて相補的に働いていることが示唆された。これらのことから、私は *SMAP1* と *SMAP2* との間に未知の遺伝的・機能的な関わりがある可能性を考え、この未知の関わりを明らかにすることを目的として本研究に取り組んだ。*ArfGAP* 間の遺伝的な相補関係や機能的な関わりについての報告は現在までになく、*SMAP1* と *SMAP2* 間の相互の関わりを明らかにすることは小胞輸送における *ArfGAP* の働きを理解する上で非常に重要であり、今後、他の *ArfGAP* 間の関係性や、*ArfGAP* の標的である *Arf* 間の相互作用について理解するための一つの戦略モデルになり得る。

本研究で、私は *SMAP1* と *SMAP2* との遺伝的・機能的な相互作用の可能性を調べた。研究の結果、HeLa 細胞での共免疫沈降によって、*SMAP1* と *SMAP2* とが哺乳類細胞内で相互作用することを発見した。また、*SMAP1*・*SMAP2* の二重欠損は受精後 7.5 日目胚 (E7.5) の胚胎遠位領域におけるアポトーシスを促進し、その後胎生致死となるという両者の遺伝的な相補作用を示す知見を得た。すなわち、*SMAP1* または *SMAP2* のうち、少なくとも 1 つの *SMAP* 遺伝子が適切な胚発生には欠かせないことを明らかにした。

材料と方法

実験動物

SMAP1 欠損マウス (*SMAP1*^{-/-}マウス) は、TT2 ES 細胞を用いて作製したキメラマウスと C57BL6 との交配により樹立した *SMAP1*^{f/+}マウスを、CAG-Cre マウスと交配させて作製した (16)。*SMAP2* 欠損マウス (*SMAP2*^{-/-}マウス) は E14 ES 細胞を用いて作製したキメラマウスと C57/BL6 との交配により作製した (27)。C57/BL6 は、日本 SLC より購入したマウスを、奈良女子大学の飼育施設で繁殖させて使用した。動物実験に関しては、奈良女子大学動物実験委員会の承認を受け、講習に参加後、制定されている規定に従って実験を行っている。組換え DNA 実験に関しても、奈良女子大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を受け、その規定に従って実験を行っている。

免疫沈降法

HeLa 細胞に Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用い、HA で標識した *SMAP1* 発現プラスミドベクター (pcDNA3-HA-*SMAP1* (aa1-440)) と Myc で標識した *SMAP2* 発現プラスミドベクター (pcDNA3-Myc-*SMAP2* (aa1-428)) を導入した。発現プラスミドベクターは pcDNA3 の EcoRI/XhoI サイトに各々の断片を組み込んで作製した。培養後の HeLa 細胞を 1.5ml チューブに回収し、プロテインキナーゼインヒビターを含む 0.5 ml lysis buffer を加えて懸濁し、音波破碎を行い、細胞抽出液を作製した。作製した細胞抽出液のうち 475 μ l を免疫沈降に、25 μ l を Immunoblot 法に使用した。免疫沈降は HA tagged Protein PURIFICATION KIT (MBL3320、mAb:clone 5D8) を用いてメーカーの指示にしたがって操作を行った。その後、抗 HA 抗体 (3F10, Roche) 、抗 Myc 抗体 (9E10, Sigma) で各々検出した。化学発光のシグナルを LAS-4000 mini Fluoro image analyzer (Fuji film) で検出した。

マウス胚の観察

SMAP1^{-/-} *SMAP2*^{+/-}マウス同士を交配させ、プラグが着いた日を受精後 0.5 日目とし、受精後 10.5 日目胚 (E10.5)、8.5 日目胚 (E8.5) を取り出した。胚を PBS でよく洗った後、実顕微鏡 (sz4045, Olympus) と Motic Images Plus 2.3S (SHIMADZU) で観察した。

SMAP1、*SMAP2* 二重欠損 MEF の作製

初代 MEF は受精後 13.5 日目の *SMAP1*^{-/-} *SMAP2*^{+/-}マウス胚より常法に従って調製した(28)。調製した初代 MEF を 35 mm ディッシュにて、Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (D5796, SIGMA) 培地で培養した。SV40 large T antigen を発現するプラスミド 2 μg を Eugene HD (Promega) 6.7 μl、Opti-MEM (GIBCO) 91 μl を用いてメーカーの指示に従って導入した。細胞の連続継代によって不死化された細胞株が得られた。不死化 MEF は 10 % fetal bovine serum (FBS) と 100 U/ml penicillin、100 μg/ml streptomycin を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で 37°C、5 % CO₂ で培養した。

レトロウイルス感染による MEF への Cre 導入による欠損誘導は宮城がんセンターの島教授に協力していただいた。パッケージング細胞 plat-E に puromycin 耐性遺伝子と Cre 遺伝子を持つプラスミドを FuGENE HD によって導入した。8 時間後に上清 (ウイルス液) を回収した。MEF を 35 mm ディッシュに播種し、回収したウイルス入り初代 MEF 培養培地で 24 時間培養した。その後 puromycin 入りの選択培地によってウイルスが感染した細胞を単離した。Cre 発現ウイルスを感染させた MEF のクローニングにはペニシリンカップ法を用いた。60 mm ディッシュ一枚につき 300 細胞になるように MEF を播種し、2 週間 37°C 5 % CO₂ インキュベーターで静置培養した。2 週間後ディッシュ中のコロニーを、一つずつワセリンを付けたペニシリンカップで囲い、ペニシリンカップ内でトリプシン処理を行い、剥がしたコロニーを新しい 24 穴プレートに播種し直した。播種し直した細胞が十分に増殖したら、DMSO 入り初代 MEF 培養培地で凍結保存し、一部を PCR による遺伝子型確認に使用した。

c-Kit 発現 MEF の作製

ss-EYFP-Kit 断片 (29)が組み込まれた pcDNA3.1 (+) プラスミドベクター (東北大学昆先生に分与していただいた。) から、制限酵素 Pme I (NEB) 切断によって、ss-EYFP-Kit 断片を含む配列を切り出した。その後、ゲル回収によって ss-EYFP-Kit 断片を含む配列の断片 (以降、インサート断片とする) を回収した。

pMYs-IRES-DsRed レトロウイルスベクター (近畿大学の田中先生に分与していただいた。) は制限酵素 Xho I (NIPPON GENE) によってカットし、DNA Blunting Kit (TaKaRa) を用いて末端平滑化を行った。その後、ベクターのセルフライゲーションを防止するために Alkaline Phosphatase (TaKaRa) を用いて脱リン酸化反応を行った。

DNA Ligation Kit (TaKaRa) を用いてインサート断片 : ベクター = 10 : 1 の量でライゲーション反応後、大腸菌 (DH5 α) へとトランスフォーメーションした。大腸菌はその後 LB (Amp, 100 μ g/ml) プレートに播き、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。プレート中のコロニーをピックアップし、コロニーPCR によって目的のプラスミドをもつ大腸菌を選別した。加えてコロニーPCR によってできた PCR 断片のシーケンスを行うことで目的となる遺伝子を持つか再度確認した。選別した大腸菌は Amp/LB 培地で、37 $^{\circ}$ C で 18 時間大量培養し、Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche) によってプラスミドを精製した。コロニーPCR、PCR 断片のシーケンスに用いたプライマーを以下に示す。

pMYs-IRES-GFP-Fwd: 5'-GAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTC-3'

c-kit-ss-Rev: 5'-AGATGGCTGAGACGTGGCGAATTCTGTCTG-3'

コロニーPCR の条件は以下である。反応液はチューブ 1 本あたり 10 \times Buffer 1.5 μ l, 添付 10 mM dNTPs 0.3 μ l, 100 μ M Fwd Primer 0.075 μ l, 100 μ M Rev Primer 0.075 μ l, MilliQ 水 12.975 μ l, standard Taq 0.075 μ l の計 15 μ l とした。温度条件は 94 $^{\circ}$ C 変性 3 分を 1 回, 94 $^{\circ}$ C 変

性 15 秒, 60°C アニーリング 30 秒, 72°C 伸長 1 分を 32 回, 72°C 伸長を 7 分とした。Applied Biosystems 社の GeneAmp PCR System 9700 を用いた。

精製した c-Kit 発現レトロウイルスベクター 6 µg、gag/pol 3 µg、VSV-G 3 µg を TransIT (TaKaRa) 36 µl、Opti-MEM (GIBCO) 1,200 µl を用いてメーカーの指示に従って 10 cm ディッシュに培養していたパッケージング細胞 293T に導入し、10 % FBS を加えた DMEM で培養した。48 時間後に上清 (ウイルス液) を回収した。MEF をレトロネクチンコートされている 35 mm ディッシュ (TaKaRa) に播種し、回収したウイルス液 1 ml を加えて、72 時間培養した。ウイルスが感染した細胞は EYFP、DsRed 陽性細胞として FACS Aria によって単離した。この実験は近畿大学医学部の田中講師、頼助教に手伝っていただいた。

ゲノム DNA の抽出

マウスの尾、MEF、マウス胚からのゲノム DNA の抽出はそれぞれ以下の方法で行った。

マウスの尾からのゲノム DNA の回収方法

マウスの尾の先端 0.5 cm 程度を切り回収した。回収した尾は、チューブに入れて -80°C で 30 分以上冷凍し、Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5 % SDS) 200 µl と ProteinaseK (10 mg/ml) 2 µl を加え、しっかりボルテックスにかけて混合させ、55°C のインキュベーターで一晩反応させた。尾がばらばらに溶けたことを確認したら、TE で飽和させたフェノール 200 µl をサンプルに加え混合した。10,000 rpm、5 分遠心にかけて上清を回収した。これにイソプロピルアルコール 200 µl を加え、サンプルをゆっくり上下転倒させ、DNA 沈殿を形成させた。その後、10,000 rpm、5 分の遠心にかけて上清を除き、洗いのための 75 % エタノール 400 µl を加え、10,000 rpm、5 分遠心して上清を除いた。沈殿物 (DNA) を乾燥させた後に TE 250 µl を加え 4°C で一晩静置した。

MEF からのゲノム DNA の回収方法

60 mm ディッシュにコンフルエントになるまで培養しておいた MEF に、Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5 % SDS) 500 μ l と ProteinaseK (10 mg/ml) を 5.0 μ l 加え、チップの先端で細胞を剥がしながら溶液と馴染ませたものを 1.5 ml チューブに移し、55°C のインキュベーターで一晩反応させた。その後、TE で飽和させたフェノール 500 μ l をサンプルに加え混合した。10,000 rpm、5 分遠心にかけて上清を回収した。これにイソプロピルアルコール 500 μ l を加え、サンプルをゆっくり上下転倒させ、DNA 沈殿を形成させた。その後、10,000 rpm、5 分遠心にかけて上清を除き、洗いのための 75 % エタノール 1 ml を加え、10,000 rpm、5 分遠心して上清を除いた。沈殿物 (DNA) を乾燥させた後に TE 250 μ l を加え 4°C で一晩静置した。

E7.5 日胚からのゲノム DNA の回収方法

胚を取り出す際は母体由来の placental cone や parietal endoderm は極力取り除いた。取り出した胚をチューブに入れて Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5 % SDS) 500 μ l と Proteinase K (10 mg/ml) を 10 μ l 加え、55°C のインキュベーターで一晩反応させた。翌日、フェノール/クロロホルム法、エタノール沈殿法を用いゲノム DNA を得た。ゲノム DNA は最終的に TE 5 μ l (pH 8.0) に溶かし、PCR に使用した。

PCR 法によるゲノムタイピング

回収したゲノム DNA サンプルの遺伝子型決定は、変異型配列または野生型配列を増幅するためのプライマーと、TaqPolymerase high yield (Greiner Bio One) または LA-Taq polymerase (TaKaRa) で PCR 反応を行った。Gene Amp 9600 PCR System (Applied Biosystems) を使い DNA を増幅させた。以下の組成の反応液 14 μ l に対しサンプル 1 μ l を使用した。

・ TaqPolymerase high yield 用反応液 : チューブ 1 本あたり 10 \times Buffer 1.5 μ l, 添付 10 mM dNTPs 0.3 μ l, 100 μ M Primer (1) 0.075 μ l, 100 μ M Primer (2) 0.075 μ l, MilliQ 水 11.975 μ l,

standard Taq 0.075 μ l の計 14 μ l とした。

・ LA-Taq polymerase 用反応液：チューブ 1 本あたり 2 \times GC Buffer II 7.5 μ l, 添付 2.5 mM dNTPs 1.2 μ l, 100 μ M Primer (1) 0.075 μ l, 100 μ M Primer (2) 0.075 μ l, MilliQ 水 5.075 μ l, LA-Taq 0.055 μ l の計 14 μ l とした。

変異型配列検出用プライマー

SMAP1 用

HS-2: 5'-CCTGCCCTTACCCAGACTGTCTTAG-3'

H3: 5'-CCTCTGCTAACTCTACTCAGGTAAC-3'

SMAP2 用

Neo13: 5'-CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACG-3'

Neo21: 5'-CTTTCCTCCTCAGAAGCCATAGAG-3'

野生型配列検出用プライマー

SMAP1 用

H5: 5'-GTCATCCTGGTTAGCCTCAGTCTTG-3'

H3: 5'-CCTCTGCTAACTCTACTCAGGTAAC-3'

SMAP2 用

SM2-1: 5'-CACTCGGGGTCAAGTGTGCG-3'

SM2-3' : 5'-CCAGAACCCCTCCCCACTC-3'

PCR の温度条件は以下の通りである。

SMAP1 野生型検出・*SMAP2* 変異型検出の条件は、94°C 変性 3 分を 1 回、その後 94°C 変性 15 秒、60°C アニーリング 30 秒、72°C 伸長 1 分のサイクルを 32 回、最後に 72°C 伸長を 7 分とした。

SMAP1 変異型検出の条件は、94°C 変性 5 分を 1 回、その後 94°C 変性 1 分、50°C アニーリング 1 分、72°C 伸長 2 分のサイクルを 35 回、最後に 72°C 伸長を 7 分とした。

SMAP2 野生型検出の条件は、94°C 変性 2 分を 1 回、その後 94°C 変性 1 分、59°C アニーリング 2 分、72°C 伸長 3 分のサイクルを 35 回、最後に 72°C 伸長を 7 分とした。

PCR の反応後、2 % アガロースゲルで PCR 産物 7 μ l を電気泳動にかけて、バンドの有無を検出した。

MEF での取り込み・輸送検定

MEF でのトランスフェリン、c-Kit、SCF の取り込み・輸送検定はそれぞれ以下の方法で行った。

トランスフェリンの取り込み実験

カバーガラスに播種しておいた MEF を無血清 DMEM で一度洗った後に、新しく無血清 DMEM を加え 2 時間、37°C、5 % CO₂ で前培養した。2 時間後、37°C に温めておいた 100 μ g/ml Alexa488-conjugated human transferrin (Invitrogen) 入りの無血清 DMEM を加え遮光しながら 15 分間、37°C、5 % CO₂ で培養し、内在化反応を行った。その後、3.7 %ホルムアルデヒド/PBS で、15 分間室温で固定させた後、PBS で洗浄し、カバーガラスを Prolong Gold with DAPI (Molecular Probe) でスライドガラスに封入した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (C1siReady, NIKON) を用いた。取り込まれたトランスフェリンの定量化はランダムに選択した個々細胞(全細胞範囲)の蛍光強度を Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) により測定した。

c-Kit の取り込み・輸送実験

カバーガラスに播種しておいた MEF に 37°C に温めておいた 100 ng/ml SCF (近畿大学医学部田中先生より分与された) 入りの 10 % FBS-DMEM を加え、30 分間、37°C、5 % CO₂ で培養し、内在化反応を行った。培地を除き、4 °C PBS で洗浄し、3.7 %ホルムアルデヒド/PBS で、15 分間室温で固定させた後、PBS で洗浄した。1 % BSA/0.1 % TritonX-100/PBS により 15 分間室温でブロッキングを行った後、0.1 % BSA/PBS で 200 倍希釈した一次抗体 (Biotin anti-mouse CD117, BioLegend) を室温で 45 分間反応させた。PBS で洗浄後、0.1 % BSA/PBS で 200 倍希釈した二次抗体 (Alexa Fluor® 488 Streptavidin, Life technologies) を室温で 45 分間反応させた。PBS で洗浄後、カバーガラスを Prolong Gold with DAPI (Molecular Probe) でスライドガラスに封入した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (C1siReady, NIKON) を用いた。取り込まれた c-Kit の定量化はランダムに選択した個々細胞 (全細胞範囲) の蛍光強度を Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) により測定した。

SCF の取り込み・輸送実験

カバーガラスに播種しておいた MEF に 37°C に温めておいた 100 ng/ml biotin-SCF (Human SCF Biotinylated Fluorokine Kit, R&D system) 入りの 10 % FBS-DMEM を加え 15 分間、37°C、5 % CO₂ で培養し、内在化反応を行った。培地を除き、4°C PBS で洗浄し、3.7 %ホルムアルデヒド/PBS で、15 分間室温で固定させた後、PBS で洗浄した。1 % BSA/0.1 % TritonX-100/PBS で、15 分間室温でブロッキングを行い 0.1 % BSA/PBS で 200 倍希釈した抗体 (Alexa Fluor® 488 Streptavidin, Life technologies) を室温で 45 分間反応させた。PBS で洗浄後、カバーガラスを Prolong Gold with DAPI (Molecular Probe) でスライドガラスに封入した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (C1siReady, NIKON) を用いた。取り込まれた SCF の定量化はランダムに選択した個々細胞 (全細胞範囲) の蛍光強度を Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) により測定した。

内在性の SMAP1 と内在性の SMAP2 の免疫蛍光染色

細胞、胚での内在性の SMAP1 と SMAP2 との免疫蛍光染色はそれぞれ以下の方法で行った。

細胞の免疫蛍光染色

カバーガラスに播種しておいた MEF を PBS でリンスし、4 % PFA/PBS に 15 分間室温で固定させた後に PBS で洗浄し、1 % BSA/0.1 % TritonX-100/PBS で、30 分間室温でブロッキングを行った。その後、0.1 % BSA/PBS で 100 倍希釈した一次抗体（抗 SMAP1 抗体：HPA030574 (Sigma-Aldrich)、または抗 SMAP2 抗体：HPA021466 (Sigma-Aldrich)）を 4°C で一晩反応させて PBS で洗浄後、0.1 % BSA を含む PBS で 200 倍希釈した二次抗体（goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488, A11008 (Molecular Probe)）を 1 時間室温で反応させた。PBS で洗浄後、カバーガラスを Prolong Gold with DAPI (Molecular Probe) でスライドガラスに封入した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (C1siReady, NIKON) を用いた。

受精後 7.5 日目胚 (E7.5) の免疫蛍光染色

取り出した受精後 7.5 日目胚を PBS でリンスし、4 % PFA/PBS に 15 分間室温で固定させた後に PBT (0.1 % Triton-X/PBS) で洗浄し、10 % FBS を加えた PBBT (1 % BSA/PBT) で、4°C で一晩ブロッキングを行った。10 % FBS を入れた PBBT で 100 倍希釈した一次抗体（抗 SMAP1 抗体：HPA030574 (Sigma-Aldrich)、または抗 SMAP2 抗体：HPA021466 (Sigma-Aldrich)）で、4°C 一晩反応させた。PBBT で胚を洗浄した後、10 % FBS を加えた PBBT で、1 時間室温でブロッキングを行った。一時間後、10 % FBS を入れた PBBT で 200 倍希釈した二次抗体（goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488, A11008 (Molecular Probe)）で、4 時間室温で反応させ、PBT で洗浄後、Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) でスライドガラスに封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (C1siReady, NIKON) で観察を行った。

アポトーシスの検出

アポトーシスの検出には Apop Tag In Situ Apoptosis Fluorescein Detection Kit (Millipore) を使用した。7.5 日胚を 4 % PFA/PBS で 4°C 12 時間固定した。固定後、胚をエタノール：酢酸 (2 : 1) 溶液に -20°C で 20 分間浸した後、添付の説明書に記載の方法に従って処理を行った。最後に、胚を PBS で洗浄し、Plong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) でスライドガラスに封入した後、共焦点レーザー顕微鏡 (C1siReady, NIKON) で観察を行った。

結果

1-1. SMAP1 と SMAP2 は細胞内で複合体を形成している

先行研究から、酵母のツーハイブリッド法で SMAP1 と SMAP2 とが結合していることが明らかとなっている (図 3)。酵母のツーハイブリッド法は真核生物の細胞を用いることにより、より生体内に近い条件でのタンパク質の結合を見ることができるという利点がある一方で、偽陽性が多くみられるという欠点もある。そのため、実際の解析を進める前に哺乳類細胞内でも SMAP1 と SMAP2 とが結合することを証明する実験を行い、SMAP1 と SMAP2 間の相互作用を再度確認することは重要である。そこで両者が細胞内で複合体を形成しているかを共免疫沈降実験で検討した。

SMAP1 と SMAP2 とが *in vitro* で結合するの可否を確認するために、外来性の HA-SMAP1 と Myc-SMAP2 とを共発現させた HeLa 細胞の細胞抽出液を用いて免疫沈降を行った。その結果、抗 HA 抗体によって HA-SMAP1 を沈降させた沈殿物中に Myc-SMAP2 が含まれていることを検出することができた (図 4)。これにより、SMAP1 と SMAP2 とは HeLa 細胞で何らかの形で (直接あるいは間接に) 結合していることが判明した。

1-2. SMAP1・SMAP2 二重欠損マウスは胎生致死である

共免疫沈降の結果から SMAP1 と SMAP2 とは *in vitro* で複合体を形成することが判明した。この結果から両者の間に機能的・遺伝的に何らかの関わりがあることが推察できる。しかし、共免疫沈降の結果からだけでは SMAP1 と SMAP2 との関わりが生体内で実際にどのような機能を担っているのか不明なままである。そこで、SMAP1、SMAP2 二重欠損マウス (SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}マウス) を作製し、マウス個体レベルで解析を行うことで、生体における SMAP1 と SMAP2 の機能的・遺伝的な関わりを明らかにすることを目指した。

SMAP1 と SMAP2 間にどのような遺伝的関わりがあり、その関わりが生体内でどのよう

な機能を担っているのかを検討するために、まず *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/+}マウス同士を交配させ *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/-}マウスの作製を試みた。生後約 1 か月後（離乳期）に生存している仔マウスの遺伝子型を PCR による遺伝子型決定法により計 54 匹調べた（表 1）。その結果、35 匹が *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/-}、19 匹が *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/+}だった。驚くことに、*SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/-}仔マウスの生存は確認できず、このことから *SMAP1* と *SMAP2* の両方を欠損したマウスは離乳期前に致死となることが推察された。

SMAP1・*SMAP2* 二重欠損マウスは離乳期前に致死となると考え、致死となる時期を特定するために、まず受精後 10.5 日目と 8.5 日目の胚を回収し形態を観察した。両方の時期でサイズと形態に異常が見られ、発生が正常に進んでいないと思われる胚が確認できた（図 5）。受精後 10.5 日目の胚を PCR によって遺伝子型を決定した（表 1）。結果、サイズと形態に異常が見られた全ての胚（20 個中 4 個：20%）が *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/-}であり、あるマウスでは空の子宮も確認できた（20 個中 1 個：5%）。受精後 8.5 日目の胚も受精後 10.5 日目の胚と同様にして遺伝子型を決定した。結果、サイズと形態に異常が見られた全ての胚（15 個中 2 個：13%）が *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/-}だった（表 1）。受精後 10.5 日目、8.5 日目の両方でサイズと形態に異常が見られた胚は全て二重欠損胚であったため、さらに遡り、受精後 7.5 日目の胚の回収を行い形態の観察を行ったところ、受精後 8.5 日目胚の回収時に観察されたような、形態に明瞭な異常をきたした胚は確認できなかった。また、PCR によって遺伝子型を決定ところ、35 個の胚のうち、10 個（28.6%）が *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/-}だった（表 1）。

これらの結果は、*SMAP1*・*SMAP2* の二重欠損胚は受精後 8.5 日目前後で致死となること、正常な胚発生には *SMAP1* か *SMAP2* のうち少なくとも片方が必要であることを初めて示すものである。

1-3. *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF においてトランスフェリンの取り込みは正常である

SMAP1^{-/-}*SMAP2*^{+/-}マウスは胎生致死であり、この原因を知るためにより詳しい解析に取り

組んだ。しかし、胚を扱った解析は胚のサイズが小さく非常に扱い辛いことに加え、交配によって *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-}胚を得られる確率は 25 % と低い。そのため、数を確保しさらに詳しい分子メカニズムを解析するには一層の困難が予想される。そこでこの問題を解決するため両方の遺伝子を欠損する *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-} MEF を樹立し解析することで、*SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損に伴う特異的な輸送異常の有無を細胞レベルで明らかにすることにした。

当初、受精後 8.5 日目～9.5 日目の二重欠損胚から直接 *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-} MEF の樹立を試みたが、二重欠損胚は細胞数が少なく異常を呈しているためか樹立することが出来なかった。そこで、まず、SV40 Large T 抗原を発現するプラスミドを導入して不死化した *SMAP1*^{fl/fl}*SMAP2*^{-/-} MEF を樹立した。その後、*SMAP1* をホモに欠損させるため、樹立した細胞に Cre リコンビナーゼを持つレトロウイルスを感染させ、さらに細胞のクローニングを行うことで *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-}株の樹立を行うことにした (図 6)。単一コロニーから細胞を樹立するペニシリンカップ法を用いて、クローニングを行い、PCR によって遺伝子型の確認をした。その結果、*SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-} MEF の樹立に成功したことが確認できた (図 7)。また、樹立に成功した MEF を用いて、*SMAP1* と *SMAP2* の免疫蛍光染色を行い、タンパク質の発現を確認した (図 8)。その結果、遺伝子型によって樹立に成功したと判断した *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-} MEF では、*SMAP1*、*SMAP2* どちらの蛍光も陰性であり、タンパク質の発現においても *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF の樹立が成功したことを確認した。なお、樹立に成功した *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF は野生型 MEF に匹敵する増殖速度を示し、継代して培養ができた。このことから、株化した *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF は正常に増殖し、維持できることがわかった。

SMAP1 単独欠損細胞を用いた先行研究では、*SMAP1* 欠損 *SMAP2* ノックダウン MEF でトランスフェリンの取り込みが見られないという異常が観察されていた (16)。このことから、二重欠損によりトランスフェリンの取り込みを含めたクラスリン依存性の輸送に異常を生じることが、*SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-}マウスの胎生致死を促進させている原因の一つかもしれない

と考え、*SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF でのトランスフェリンの取り込みを調べた。*SMAP1^{+/+}SMAP2^{+/+}*、*SMAP1^{-/-}SMAP2^{+/+}*、*SMAP1^{+/+}SMAP2^{-/-}*、ならびに *SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}* の各遺伝子型の MEF を用いてトランスフェリンを 15 分間取り込ませた結果、予想とは異なり二重欠損 MEF では、*SMAP1* 欠損 *SMAP2* ノックダウン MEF で報告されていたトランスフェリンの取り込み阻害は見られなかった (図 9)。すなわち、*SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}* が取り込んだトランスフェリンの量は、*SMAP1^{-/-}SMAP2^{+/+}* と同程度であり、*SMAP1^{+/+}SMAP2^{+/+}* や *SMAP1^{+/+}SMAP2^{-/-}* と比べてむしろ増加していることが観察できた。このことから、*SMAP2* はトランスフェリンの取り込みへは関与していないことが示された。

また先行研究には、*SMAP1* の欠損は MEF において multivesicular bodies (MVB) からリソソームへの c-Kit の輸送を阻害し、分解が阻害されるために細胞内に c-Kit が蓄積するという報告もある (16)。c-Kit は未分化細胞の維持等に関与しており、その蓄積異常が胚発生異常と関連することが期待できる。そこで、*SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}* MEF で c-Kit の輸送阻害が増強するなどの変化を評価すべく c-Kit の輸送実験を行い、*SMAP1^{-/-}SMAP2^{+/+}* MEF と比較することにした。

c-Kit は SCF の受容体でチロシンキナーゼ活性を有している。赤血球、マスト細胞、メラノサイト、生殖細胞などで発現しているが、MEF では発現していないことが知られている。そのため、c-Kit の発現ベクターを作製しウイルスで感染させることで、c-Kit を発現する *SMAP1^{+/+}SMAP2^{+/+}*、*SMAP1^{-/-}SMAP2^{+/+}*、*SMAP1^{+/+}SMAP2^{-/-}*、ならびに *SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}* MEF の作製を行った。最初にプラスミドベクターから取り出してきた c-Kit 断片をレトロウイルスベクターに組み込んだ後、完成したベクターを大腸菌にトランスフォーメーションし、ベクターを持つ大腸菌をコロニー PCR によって選別した。なお、コロニー PCR によってきた PCR 断片は、シーケンスによって配列を読み、目的の遺伝子が組み込まれているかを再度確認した。選別した大腸菌を大量培養し、カラムでベクターを精製した。完成したベクターをウイルス感染によって細胞に導入し、遺伝子を発現している MEF のみをフロー

サイトメーター/cell sorter によって選別することで c-Kit を発現する MEF が完成した。作製した MEF で c-Kit の輸送実験を行った結果、SCF を添加して 30 分後に二重欠損の *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-} MEF で *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/+} MEF と同程度に c-Kit の蓄積が見られた (図 10)。加えて、c-Kit のリガンドである SCF の輸送実験も行った。Biotin-SCF を各時間 (0、30、60 分) 取り込ませ、蛍光標識した Streptavidin で検出した結果、c-Kit と同じように *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-} MEF と *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/+} MEF で SCF の蓄積が見られた (図 11)。以上のトランスフェリンの内在化実験ならびに c-Kit の輸送実験から、二重欠損 MEF は *SMAP1* 欠損 MEF と同等の輸送異常を示し、*SMAP2* は c-Kit と SCF の輸送には関与していないことが示された。すなわち、何れの解析においても、二重欠損 MEF に限定した輸送異常は確認することができなかった。

1-4. *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損は受精後 7.5 日目胚のアポトーシスを誘導する

前述のように *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF に特異的な輸送異常は未だ観察出来ていない。その理由として、胚発生時のある領域の限定した細胞で起こっている異常が、二重欠損胚が胎生致死となる原因である可能性が考えられる。そこで、MEF での輸送異常を引き続き探索することに加え、*SMAP1* と *SMAP2* の同時欠損が胚発生におけるどの段階のどの領域に影響しているのかを明らかにするために胚を用いた解析を行った。

光学顕微鏡下でサイズと形態に異常が確認できる前の受精後 7.5 日目胚を用いた解析を行うことにした。胚発生異常の原因を調べるために、まずは免疫蛍光染色によって野生型胚での *SMAP1*・*SMAP2* タンパク質の発現を調べた。また、ネガティブコントロールとして、*SMAP1* と *SMAP2* それぞれの単独遺伝子欠損胚での免疫蛍光染色も行った。図 12 に示すように、*SMAP1* と *SMAP2* は受精後 7.5 日目胚でユビキタスに発現している。

さらに、受精後 7.5 日目の *SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-}胚の DAPI 染色の結果、胚の構造、特に胚体遠位領域で核の凝縮が見られ、胚葉構造らしきものは確認できず、平面のように見えるこ

とが分かった (図 13)。また、異常胚でアポトーシスが促進しているのかを調べるために、胚全体を用いた TUNEL 染色を行った結果、*SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-}胚 (n=3) の胚体遠位領域において TUNEL 陽性細胞が増加しているのが確認できた (図 13)。なおこの時、*SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{+/+}胚は全て TUNEL 陰性だった (n=7)。以上の観察から、*SMAP1* と *SMAP2* の二重欠損は、受精後 7.5 日目胚の胚体遠位領域でアポトーシスを促進するため胎生致死となる可能性が考えられた。

討論

本研究によって、SMAP1 と SMAP2 が遺伝的に相互作用すること、受精後 7.5 日目前後の胚発生において SMAP1 と SMAP2 が機能を相互補完していることが明らかとなった。マウスの胚発生では、臓側内胚葉、エピブラスト、胚体外外胚葉など、分化した上皮組織が互いにシグナルタンパク質を介して細胞増殖と形態形成を制御している。受精後 7.5 日目前後は原腸陥入を経て、三胚葉構造が形成される時期である。原腸陥入では細胞の増殖や移動が生じ、形態形成を進めることで三胚葉構造がつくられる。特に胚体遠位領域に位置する遠位臓側内胚葉では活発にエンドサイトーシスが行われており、細胞小器官が発達していることに加え、胚発生において非常に重要な役割を担う領域である。したがって、二重欠損胚で観察された胚体遠位領域での構造の乱れやアポトーシスが胎生致死の潜在的な原因と考えられる。また、受精後 7.5 日胚の切片のヘマトキシリン・エオジン染色で三胚葉構造が形成されていない異常胚を見出しており（図 14）、この異常胚が二重欠損胚ではないかと考えている。一方、SMAP1・SMAP2 タンパク質は受精後 7.5 日目胚でユビキタスに発現しているため、観察されたアポトーシスを含む異常が胚体外外胚葉でのシグナル伝達の欠如もしくは細胞自律的なエピブラストの欠陥によって現れたものなのかどうかは不明である。SMAP1 と SMAP2 の欠損がアポトーシス、さらには胚葉の異常をどのようにして引き起こすか、今後の解析が重要になる。現時点では SMAP1 と SMAP2 は小胞輸送系に関与すると考えられることから、胚の形態形成にかかわるシグナルタンパク質の輸送異常に起因することが期待される。胚の形態形成は細胞の増殖や移動によって進むが、これらの過程は TGF β 、FGF、Wnt など種々の受容体を介したシグナルタンパク質により制御されている。例えば、リソソームの成熟に働く Vam2 のノックアウトマウスは、受精後 7 日目に予定神経領域の外胚葉において顕著なアポトーシスを伴い、その後胎生致死となる (17)。その理由として、臓側内胚葉で BMP（注：中胚葉の形成に必須の役割を担う）とその受容体が細胞

表層から初期エンドソームへと移行した後に分解されず、BMP-Smad1/Smad5/Smad8 シグナル伝達経路が長期にわたり活性化することが考えられている。このように、様々なシグナルのバランスやシグナルのオン・オフの時期の制御が正常に形態生成を進めるために重要であることから、*SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損胚で見られたアポトーシスも、*Vam2* 欠損で見られたようなリガンド-受容体タンパク質の輸送異常に伴うシグナルの脱制御によって引き起こされた可能性が考えられる。

二重欠損 MEF におけるトランスフェリンや c-Kit の取り込み・輸送は *SMAP1* 欠損 MEF と同程度であり、野生型 MEF や *SMAP2* 欠損 MEF と比べて増加していることが観察できた。これらの結果から、二重欠損 MEF で見られた c-Kit や SCF の蓄積は *SMAP1* の欠損によって生じた結果であり、今回新たに、*SMAP2* は c-Kit や SCF の輸送にほとんどあるいは全く関与していないことが示唆された。

Arf と同じく小胞輸送の制御に関わる低分子量 G タンパク質・*ARFRP1* の欠損マウスも、*SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損マウスと類似した表現型を示す(30)。*ARFRP1* の欠損は、外胚葉の分化を阻害し受精後 6.5 日目から 7.5 日目の原腸陥入時期に胎生致死を促進する。また組織学的な解析から、受精後 6.5 日目から 7.5 日目の *ARFRP1* 欠損胚では原条領域で核が濃縮しているエピブラスト細胞が確認でき、さらにそれらの細胞は TUNEL 陽性、すなわちアポトーシスが生じていることが報告されている。現在 *ARFRP1* の GAP は未知なままであり、*ARFRP1* 欠損胚と *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損胚が類似した表現型を示すという事実は、*SMAP1* や *SMAP2* が *ARFRP1* の GAP として機能するという可能性を示唆する。

今回明らかになった *SMAP1* と *SMAP2* 間の機能的相補の事実は、*SMAP* の標的である *Arf1* と *Arf6* の間でも似たような機能相補が行われている可能性を強く示唆する。

Stage	SMAP1 ^{-/-} -SMAP2 ^{+/+}	SMAP1 ^{-/-} -SMAP2 ^{+/-}	SMAP1 ^{-/-} -SMAP2 ^{-/-}
P21	19	35	0
E10.5 ^{**}	3	12	4 [*]
E8.5	4	9	2 [*]
E7.5	6	19	10

表 1 マウス胚及び出生後マウスの各遺伝子型

生後 21 日目 (P21)、受精後 10.5 日目 (E10.5)、受精後 8.5 日目 (E8.5)、受精後 7.5 日目 (E7.5) のマウスの遺伝子型を PCR 法によって決定し、それぞれの遺伝子型マウスの数を調べた。受精後 10.5 日目、8.5 日目では、サイズと形態が異常な胚が観察できた (*)。また、受精後 10.5 日目では空の子宮も一つ見られた (**)。

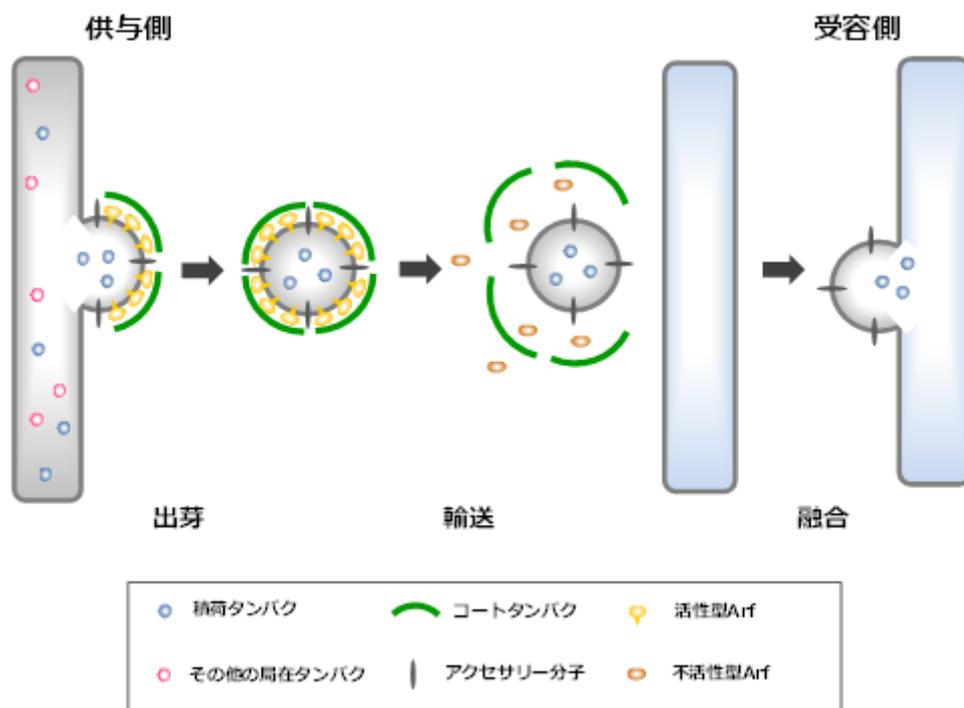


図1 小胞輸送の模式図

GEFの作用によって活性化されたArfが供与側のオルガネラ膜に突き刺さることで、輸送小胞形成に必要なタンパク質が供与膜上にリクルートされてくる。この時、特定の積み荷タンパク質だけを選ぶ特異的なシグナルをもった膜輸送タンパク質やアクセサリ分子の働きで、特定の積み荷タンパクのみ運び出されると考えられている。膜の膨らみはやがてくびり取られて小胞となり輸送されるが、この過程でGAPの働きにより徐々にArfは不活性化型となり、それに伴い被覆タンパクも遊離していく。受容側オルガネラと小胞が融合し目的のタンパク質が輸送される。

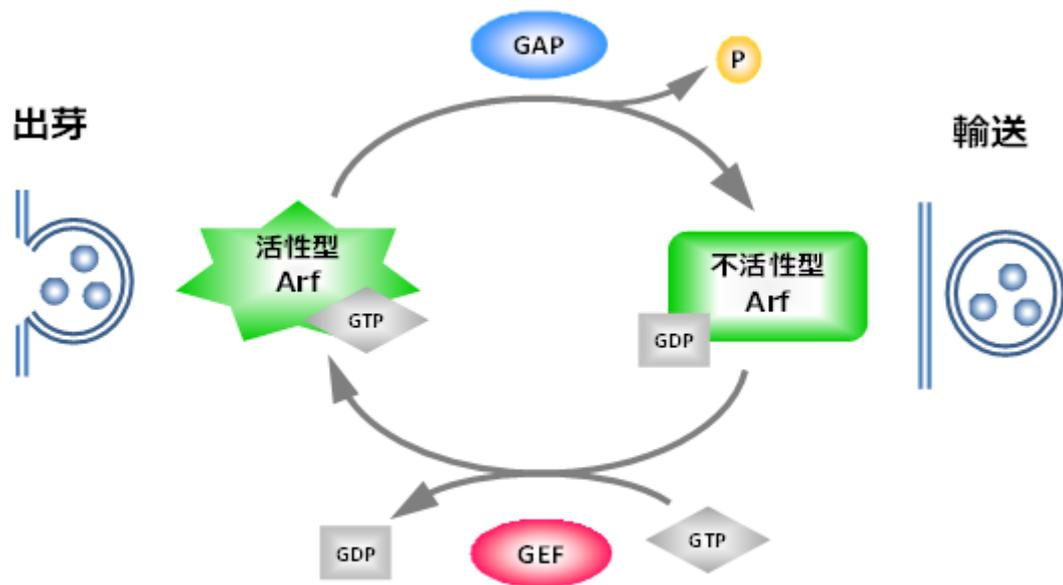


図2 GEF と GAP による Arf の活性制御機構

Arf には GTP が結合した活性型と GDP が結合した不活性型がある。GEF の作用によって不活性型の Arf に結合した GDP が GTP と交換され活性型になると小胞形成に必要なコートタンパク質やアダプタータンパク質の呼び込みが開始し、小胞の出芽が始まる。GAP の作用によって Arf の GTPase 活性が発揮され、Arf に結合した GTP が加水分解され GDP となると不活性型 Arf となり、小胞が膜から遊離し輸送が開始する。

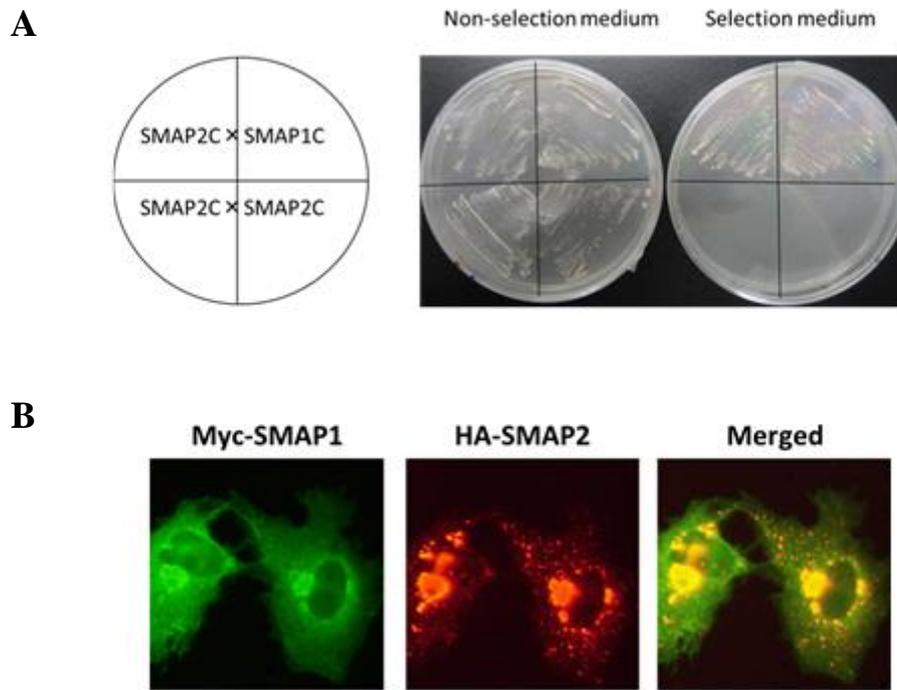


図3 SMAP1 と SMAP2 とは酵母内で相互作用し、培養細胞内で共局在する

(A) 酵母ツーハイブリッド実験の結果。SMAP2C (aa163-428) は SMAP1C (aa129-440) とは結合するが、SMAP2C (aa163-428) とは結合しない。(B) 外来性の SMAP1 と SMAP2 とは細胞内で一部共局在する。Cos7 細胞に HA-SMAP1 と Myc-SMAP2 遺伝子発現ベクターを同時に導入した。タンパク質は抗 HA 抗体と抗 Myc 抗体でそれぞれ検出し、蛍光顕微鏡によって観察した。

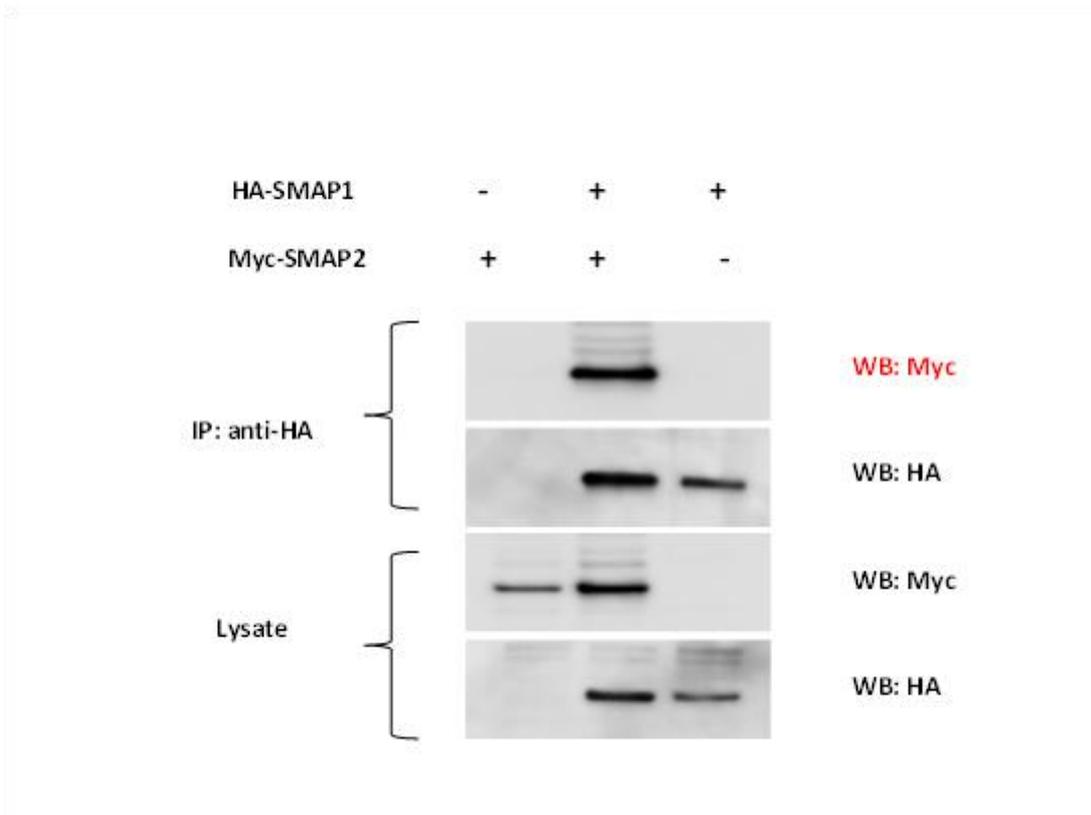


図4 SMAP1 と SMAP2 とは共免疫沈降する

HA で標識した SMAP1 と Myc で標識した SMAP2 それぞれの遺伝子発現ベクターを HeLa 細胞に導入した。上 2 段は、それぞれの細胞からのタンパク質抽出液を抗 HA 抗体によって免疫沈降させた後、抗 HA 抗体ならびに抗 Myc 抗体で各々ウエスタンブロッティングを行った結果。下 2 段はそれぞれの細胞からのタンパク質抽出液を、免疫沈降を行わずに抗 HA 抗体ならびに抗 Myc 抗体で各々ウエスタンブロッティングを行った結果。

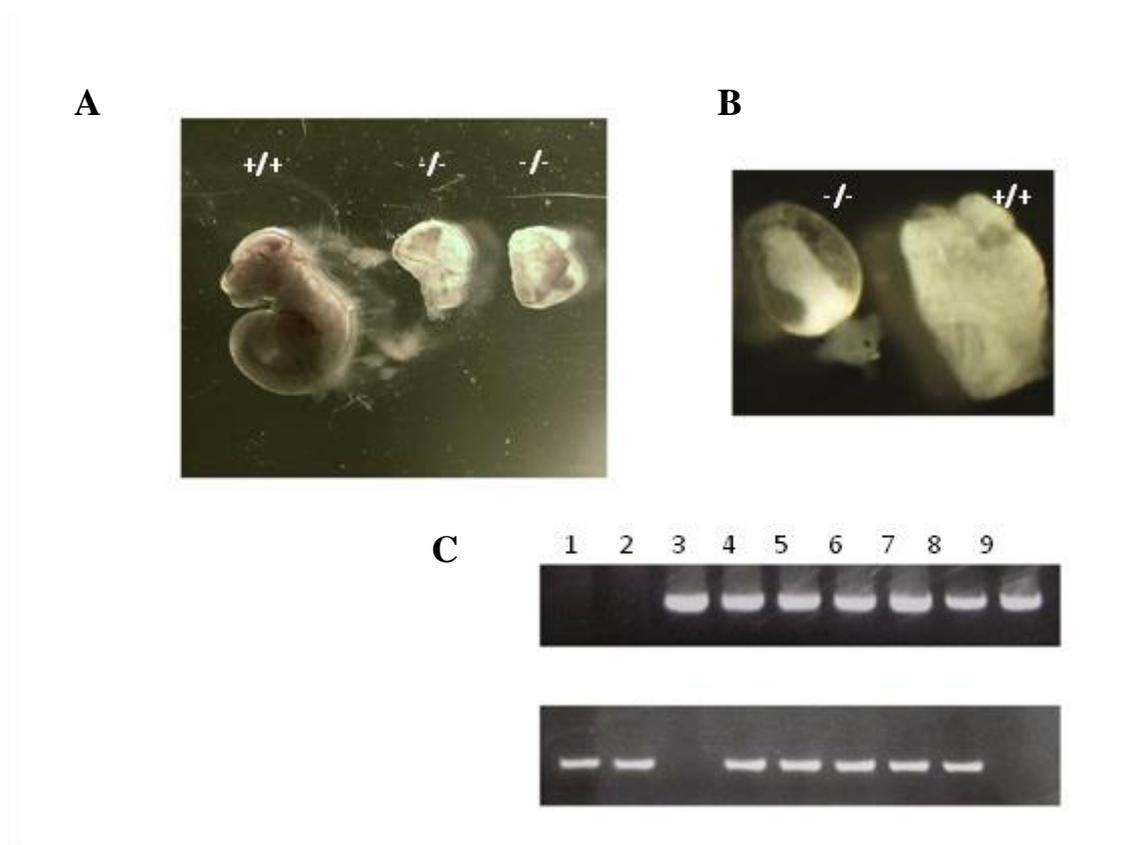


図5 *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損胚の異常

(A) 受精後 10.5 日目の *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損胚 (-/-) (卵黄囊あり)、と同時期の野生型胚 (+/+) (卵黄囊無し)。 (B) 受精後 8.5 日目の *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損胚 (-/-) と同時期の野生型胚 (+/+) (どちらも卵黄囊あり)。 (C) 受精後 8.5 日目胚で、9 つの胚 (レーン 1~9) の *SMAP2* アレルが野生型もしくはノックアウトかどうかを調べた。交配は *SMAP1*⁺*SMAP2*⁺同士で行っているため、*SMAP2* の野生型 (上段) でバンドが見られず欠損時のバンド (下段) が見られるレーン 1 とレーン 2 は *SMAP1* と *SMAP2* の二重欠損胚を表している。上段では *SMAP2* が野生型、下段では *SMAP2* が欠損しているときにバンドが検出できる。

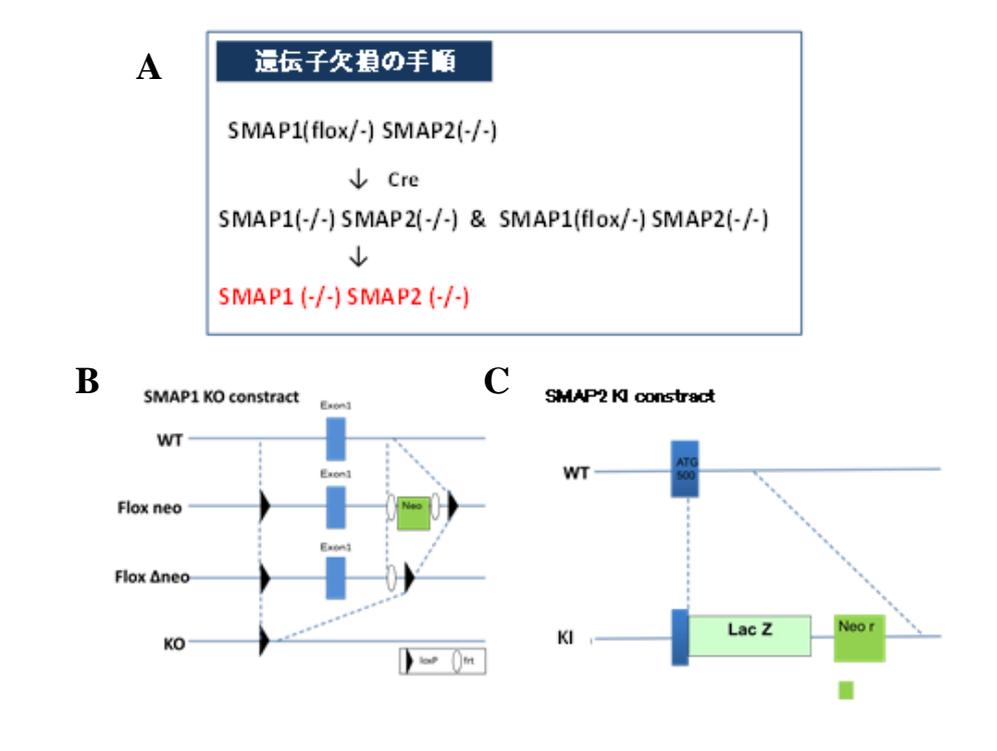
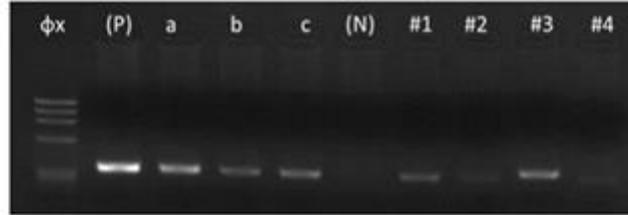


図 6 *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF 樹立の戦略

(A) *SMAP1^{flox}SMAP2^{-/-}* MEF を樹立した。その後、*SMAP1* をホモに欠損させるため、樹立した細胞に Cre リコンビナーゼを発現するレトロウイルスを感染させ、その後ペニシリンカップ法でクローニングを行うことで1細胞に由来する *SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}* 株の樹立を行った。(B) *SMAP1* コンディショナルノックアウトマウス作製のコンストラクト模式図。野生型アレル (WT) の exon1 を loxP 配列 (LoxP) で挟み、選別用のネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) を frt 配列 (frt) で挟む設計になっている (Flox neo)。ネオマイシン耐性遺伝子は FLP を発現するマウスとの掛け合わせによって除くことができ (Flox Δneo)、さらに Cre リコンビナーゼの働きによって exon1 が欠損する (KO) (C) *SMAP2* ノックインマウス作製のコンストラクト模式図。変異アレル (KI) は野生型アレル (WT) の exon1 の最初の ATG 直下に LacZ 遺伝子 (LacZ) を挿入する戦略をとっている。また、LacZ 遺伝子の 3'側のネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) は選別用のマーカーとして使われる。

A



B

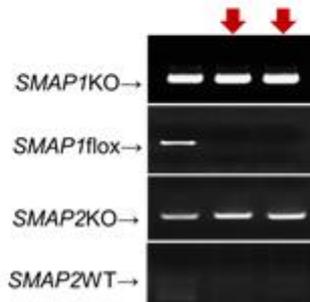


図7 遺伝子型決定 PCR で、*SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF の存在を確認

(A) 一回目のクローニングの遺伝子型確認結果。*SMAP1* が flox の時 (欠損していない時) にバンドが検出される PCR を行った。(P) はポジティブコントロール (マウスの尾部由来 *SMAP1^{flx}SMAP2^{+/+}*)、(N) はネガティブコントロール (マウスの尾部由来 *SMAP1^{-/-}SMAP2^{+/+}*) である。a、b、c は (N) に (P) をそれぞれ 50%、25%、10% 混ぜたものである。#1~#4 は Cre 導入後にペニシリンカップ法で得たコロニー由来の MEF である。#2 と #4 のバンドは薄かったものの #1~#4 の全てでバンドが検出できた。(B) 二回目のクローニング後の 4 つの遺伝子型 (*SMAP1* KO, *SMAP1* floxed, *SMAP2* KO, *SMAP2* WT) の確認結果。一番左のレーンはポジティブコントロール (Cre を導入する前の *SMAP1^{flx}SMAP2^{+/+}* MEF) である。赤い矢印で示している 2 つのレーンが、樹立に成功した *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF の結果である。

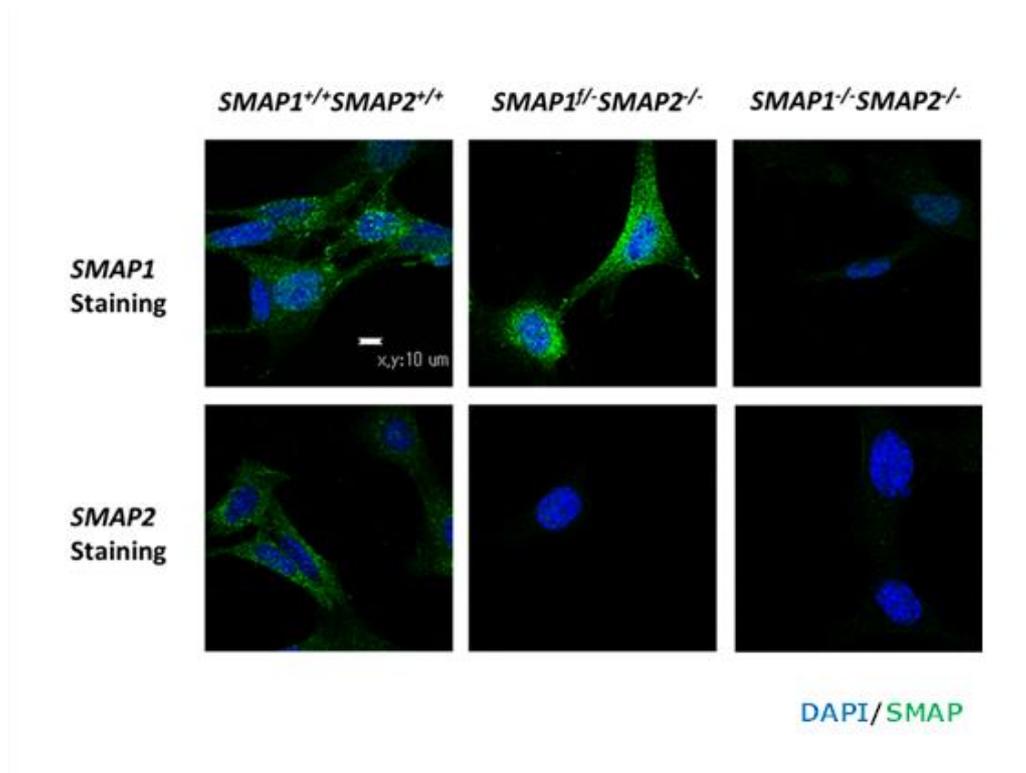


図 8 *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損 MEF での SMAP タンパク質の発現

樹立した *SMAP1*^{f/-}*SMAP2*^{f/-}MEF で *SMAP1* ならびに *SMAP2* タンパク質の発現を調べるために、*SMAP1*^{+/+}*SMAP2*^{+/+}、*SMAP1*^{f/-}*SMAP2*^{f/-}、*SMAP1*^{-/-}*SMAP2*^{-/-}MEF で抗 *SMAP1* 抗体と抗 *SMAP2* 抗体で免疫蛍光染色を行った（緑）。その後、DAPI 染色（青）を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μm を示す。

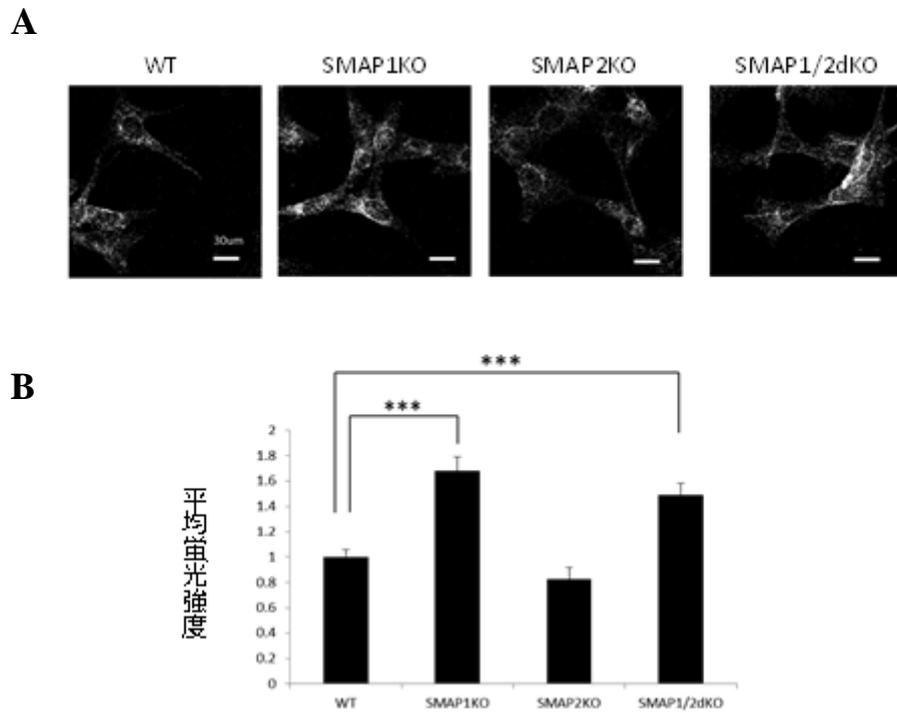
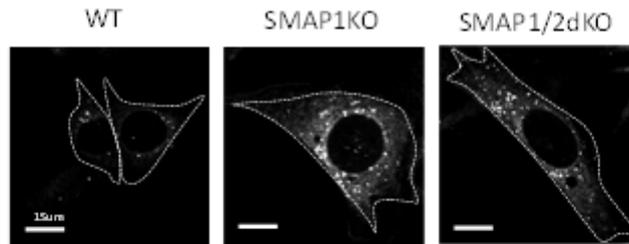


図9 トランスフェリンの取り込み実験結果

(A) WT ($SMAP1^{+/+}SMAP2^{+/+}$)、SMAP1KO ($SMAP1^{-/-}SMAP2^{+/+}$)、SMAP2KO ($SMAP1^{+/+}SMAP2^{-/-}$)、
 ならびに SMAP1/2dKO ($SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}$) MEF を対象に、蛍光標識したトランスフェリンを
 15 分間取り込ませた後に蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは 30 μm を表している。(B)
 (A) の結果から一細胞当たりの平均トランスフェリンの取り込み量を ImageJ によって定量化
 し、 \pm S.D で表示した。WT は $n=45$ 、SMAP1KO は $n=64$ 、SMAP2KO は $n=52$ 、SMAP1/2dKO
 は $n=53$ で定量化した。*** は P 値 <0.001 を表す。

A



B

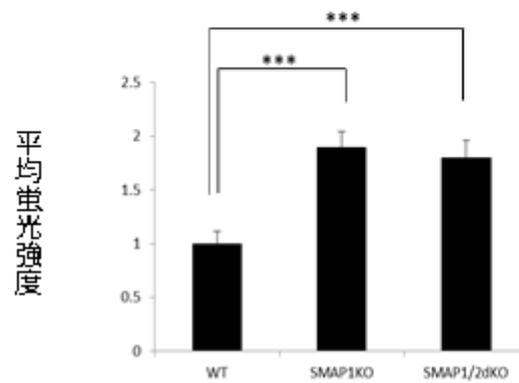


図 10 c-Kit の取り込み、輸送実験結果

(A) WT ($SMAP1^{+/+}SMAP2^{+/+}$)、SMAP1KO ($SMAP1^{-/}SMAP2^{+/+}$)、ならびに SMAP1/2dKO ($SMAP1^{-/}SMAP2^{-/}$) MEF に SCF を添加後 30 分で抗 c-Kit 抗体による免疫蛍光染色を行った。点線は細胞の輪郭をなぞっている。スケールバーは 15 μm を表す。(B) (A) の結果から一細胞当たりの平均 c-Kit の蓄積量を ImageJ によって定量化し、 \pm S.D で表示した。WT は $n=42$ 、SMAP1KO は $n=45$ 、SMAP1/2dKO は $n=51$ である。***は P 値 <0.001 を表す。

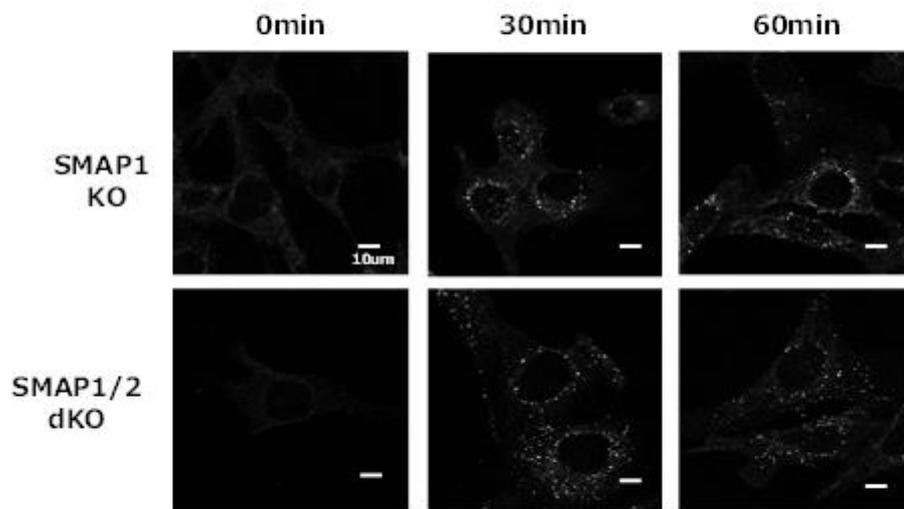


図 11 Biotin-SCF の輸送実験結果

c-Kit を発現させた SMAP1KO ($SMAP1^{-/-}SMAP2^{+/+}$) ならびに SMAP1/2dKO ($SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}$) MEF で SCF の取り込みと輸送を調べた。Biotin 標識した SCF を各時間 (0、30、60 分) 取り込ませ、蛍光標識した Streptavidin によって検出した。スケールバーは 10 μm を示す。

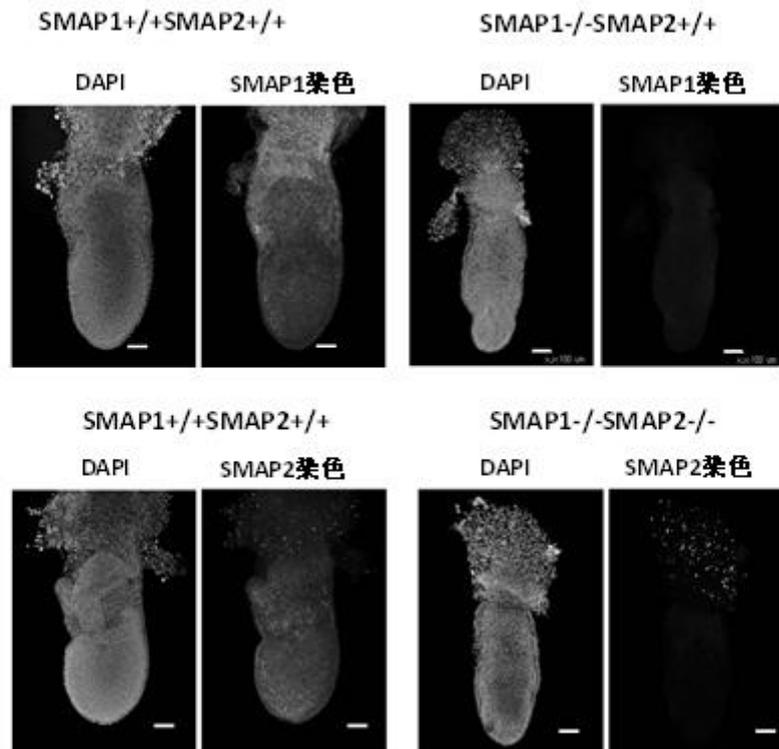


図 12 受精後 7.5 日目胚における SMAP1 と SMAP2 の発現

受精後 7.5 日目の野生型胚で SMAP1 と SMAP2 の局在を調べるために、抗 SMAP1 抗体と抗 SMAP2 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。各々向かって左は DAPI 染色、向かって右は蛍光抗体染色の結果を示す。抗体染色のネガティブコントロールは、SMAP1 と SMAP2 それぞれの遺伝子が欠損している胚を用いた。スケールバーは 100 μm を示す。

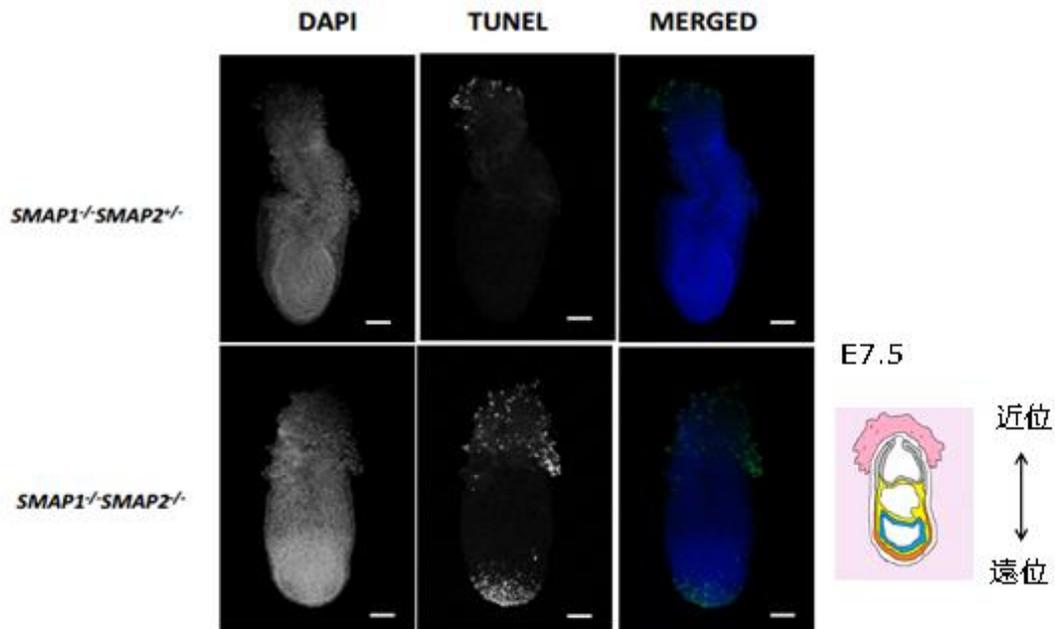


図 13 受精後 7.5 日目の *SMAP1*・*SMAP2* 二重欠損胚では胚胎遠位領域でアポトーシスが
生じている

受精後 7.5 日目の *SMAP1^{-/-}SMAP2^{+/-}* と *SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}* 胚で DAPI 染色と TUNEL 染色を行っ
た。DAPI 染色の結果より *SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}* 胚では胚胎遠位領域で核の濃縮が見られる。ま
た、TUNEL 染色の結果より、*SMAP1^{-/-}SMAP2^{-/-}* 胚の胚胎遠位領域でのみ TUNEL 陽性反応が
見られアポトーシスが生じている。右下に、この時期の胚の模式図を示した。Placental cone
(ピンク)、胚胎外外胚葉 (グレー)、中胚葉 (黄)、外胚葉 (青) 胚胎内胚葉 (オレン
ジ) を表す。

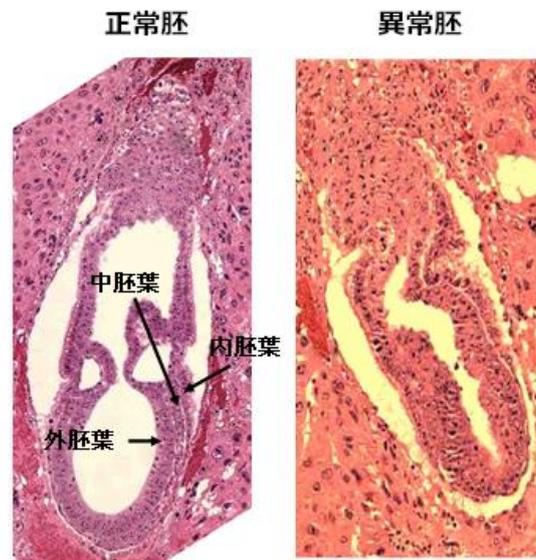


図 14 受精後 7.5 日目胚で、原腸陥入が生じてないと思われる異常胚が観察された。

SMAP1・*SMAP2* 二重欠損胚が得られる交配を行い、受精後 7.5 日目胚をブアン固定・切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。その結果、原腸陥入が生じて三胚葉構造（外胚葉、内胚葉、中胚葉）が形成されている正常胚（左）に対して、中胚葉が形成されず原腸陥入が起きていないと考えられる異常胚（右）が観察された。

第二章

T 細胞の生存維持における

Arf1 と Arf6 の協調作用

序論

小胞輸送は積み荷となる特定のタンパク質や脂質を膜画分である小胞で目的のオルガネラや細胞外に輸送するための機構である。細胞の形態や機能を維持する上で必要不可欠であり、酵母からヒトまで保存されたシステムである。小胞輸送は小胞の出芽、小胞の輸送、小胞の係留、膜融合という順番で行われる(図1)(1, 2)。ホルモンや神経伝達物質の放出(エキソサイトーシス)における小胞輸送機構の解析は多くなされているが、これらの他に神経細胞の突起伸長、細胞質分裂、免疫などさまざまな生命活動にも小胞輸送は関与していることが知られている(2, 3, 11, 14)。これまでの研究により、小胞輸送の過程の概略は判明しているが、これら小胞輸送の一連の過程は多様な分子によって制御されていることが最近の研究から明らかになりつつある(1, 2)。

私の研究対象である Arf ファミリーは Ras スーパーファミリーのメンバーであり、小胞輸送の初期ステップ、小胞の出芽から輸送を制御する。低分子量 G タンパク質である Ras スーパーファミリーは、Arf ファミリーの他に Ras・Rho・Rab・Ran と計 5 つのサブファミリーによって構成されているが、中でも Arf ファミリーと Rab ファミリーが小胞輸送の制御に関与していることが知られている(3)。マウスでは 6 つの Arf アイソフォーム (Arf1-6) が知られており、アミノ酸配列の相同性によって 3 つのクラスに分類される。Class I の Arf1-3 はグループ内で 96% のアミノ酸配列が一致しており、Class II の Arf4 と Arf5 は互いに 90%、Arf1 とは 80% の相同性を持つ(図 15A)。Class III には Arf6 だけが属しており、他の Arf とはアミノ酸配列が異なるだけでなく独自の機能を有することが知られている(4, 31)。Arf の活性はファミリー内で共通しており、三量体 G タンパク質と同様に GTP と結合した活性型と GDP と結合した不活性型の両方の型を取ることによって、分子スイッチとして働いている。活性の制御はグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と GTP アーゼ活性化因子(GAP)によって調節される。Arf は GEF により結合している GDP を GTP と交換することで構造の

変化が生じ、活性状態になり膜と結合することが可能になる (図 2)。また、GAP により Arf の持つ GTPase 活性が活性化されると、Arf は結合している GTP を加水分解して GDP に変えることで不活性化型に変換し、膜から遊離することが知られている (1-5) (図 2)。

Arf の機能解析においては HeLa 細胞に代表されるヒト由来培養細胞を用いた研究が主に行われている。細胞レベルでの解析から、Arf1 は Arf2-5 と同じく、ゴルジ体近傍で COPI 被覆小胞の輸送を制御しているのに対し、Arf6 は主に細胞膜付近でクラスリン被覆小胞を介したエンドサイトーシスやリサイクリングを制御するとの報告がなされている (19, 32)。siRNA による Arf1-5 分子の単独ノックダウン実験では小胞輸送に異常が見られないのに対し、同時に二種類の Arf をノックダウンすると小胞輸送に異常が生じることが報告されている (19) (図 15B)。例えば Arf1 ならびに Arf4 のダブルノックダウンでは、小胞体からシスゴルジ体間の小胞がチューブレーションを起こす、もしくは早期エンドソームのトランスフェリン受容体リサイクリング経路や、エンドソームからトランスゴルジへ向かう逆行輸送といった小胞輸送に異常が見られている (33)。Arf1・Arf3 のダブルノックダウンの研究でも Arf1 と Arf3 双方がリサイクリングエンドソームの輸送に関与することが報告されている (34)。これらの結果に加え、Arf1-5 は互いに非常に相同性が高く (31) (図 15A)、局在場所も近接しているため、現在のところ Arf1 は単独で必ずしも細胞機能に必須のタンパク質ではなく、他のアイソフォームと相補的に輸送過程を制御しているとの見解が主流である。それに対し、Arf6 は単独ノックダウンでも細胞内リサイクリングや、インテグリン・E-カドヘリンといった細胞接着に重要なタンパク質を輸送するエンドサイトーシス経路に異常が生じる(35)。これらの背景から、これまで Arf1 と Arf6 はそれぞれ別々の場所で異なる小胞輸送経路を制御するものと考えられてきた。

一方で、Arf1 と Arf6 の間の類似した機能についてもいくつか報告がなされている。例えば、それぞれインテグリンの局在を制御することによってがん細胞の移動能を制御するという報告や、PLD 依存的なホスファチジン酸産生を介して mTOR の活性化に関与する

という報告がある (35–38)。加えて、第一章で述べたように、酵母のツーハイブリッド系で Arf1 の GAP である SMAP2 と Arf6 の GAP である SMAP1 の結合が認められると共に、外来性の SMAP1 と SMAP2 とを COS7 細胞へ共導入した際に一部が共局在する (図 3)。さらに SMAP1 と SMAP2 それぞれの単独欠損マウスが正常に生まれてくるのに対し、両者を欠損させたマウスは受精後 7.5 日目までに致死となることから、これまで別々に働くと考えられてきた SMAP1 と SMAP2 が個体において重複した機能を担うことが明らかとなっている (39)。これらの知見から、少なくとも個体における特定の条件においては Arf1 と Arf6 が協調した役割を担う可能性が想定される。しかし、全身で Arf6 を欠損させたマウスは、肝臓発達障害が主因で 17.5 日胚付近で致死になることが明らかとなっており (13)、Arf1 を全身で欠損させたマウスも胎生致死を示すことが今回の解析により明らかとなった (以下に詳述)。そこで、時期・組織特異的に遺伝子欠損を誘導可能なコンディショナルノックアウトマウスを作製することで、個体、特に高次生命現象の一つである免疫系における Arf1 と Arf6 の協調作用の有無を明らかにすることにした。

細胞内小胞輸送は細胞の増殖、分化、移動など多様な細胞応答を制御していることから、免疫細胞においても同様に重要な役割を果たしていることが予想される。事実、Rab ファミリーのアイソフォームである Rab27 はキラーT 細胞からの細胞傷害性顆粒の分泌経路を制御することが報告されており、ヒト *RAB27A* 遺伝子の異常は II 型グリセリ症候群という免疫疾患の原因となる (11, 12)。また、同じく Rab ファミリーアイソフォームの CRACR2A は、T 細胞において標的細胞との接触面に形成される免疫シナプスと呼ばれる分子複合体への小胞輸送を制御することで、T 細胞の活性化に関与することが報告されている (40)。

免疫系は侵入した異物を素早く察知して炎症応答を誘導する『自然免疫系』と無数の異物それぞれに対して特異的に反応して排除する『獲得免疫系』の二つに分けることができる (41–43)。T 細胞や B 細胞といったリンパ球は獲得免疫系で働く免疫細胞であり、一度感染した病原体を記憶することで、二度目の感染に対して迅速かつ強力で働くことができる。

T 細胞は骨髄の T 細胞前駆細胞が胸腺へと移動し、自己と非自己を区別できる適切な T 細胞受容体 (TCR) を発現するための選別過程を経て、成熟した T 細胞へと分化する (41-43)。その後、血流に乗って末梢組織へと出ていき、脾臓を含む二次リンパ組織で抗原提示細胞によって活性化されることで、異物の排除に働く。TCR 遺伝子には α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖、 δ 鎖の 4 種類が存在し、 α 鎖と β 鎖からなる TCR を発現する $\alpha\beta$ T 細胞と、 $\gamma\delta$ 鎖からなる TCR を発現する $\gamma\delta$ T 細胞に大別され、獲得免疫系における異物排除の大部分は $\alpha\beta$ T 細胞によって担われている (41-43) (以降、本論文では $\alpha\beta$ T 細胞のことを T 細胞と表記する)。胸腺における T 細胞分化の過程は、細胞膜上に発現する CD4 分子・CD8 分子を指標として、未分化な順に CD4・CD8 の何れも発現していないダブルネガティブ (DN) 細胞、両者を発現するダブルポジティブ (DP) 細胞、CD4 または CD8 のいずれか一方のみを発現するシングルポジティブ (SP) 細胞の 3 つの段階に分けることができ、最終的に CD4 のみを発現する SP 細胞 (CD4SP 細胞) がヘルパー T 細胞 (CD4⁺ T 細胞)、CD8 のみを発現する SP 細胞 (CD8SP) 細胞がキラー T 細胞 (CD8⁺ T 細胞) として働く (41-43) (図 16)。胸腺分化過程において、特に DP 細胞の段階は、機能的かつ自己抗原に反応しない TCR を発現した T 細胞のみを選別する、いわゆる『正の選択』・『負の選択』がなされる重要な時期である。『正の選択』とは、非機能的 TCR を発現する T 細胞を細胞死によって排除する過程であり、『負の選択』とは自己抗原に強く反応する TCR を発現した危険な T 細胞を細胞死によって排除する過程である (42, 43)。これらの選択を生き残った DP 細胞は SP 細胞へと分化し、胸腺から末梢へと出て行くが、この過程を特に “egress” と呼ぶ。

胸腺を出てから一度も抗原と出会ったことのない T 細胞 (ナイーブ T 細胞) は、IL-7 などの刺激によって生存を維持されつつ、脾臓をはじめとする全身の二次リンパ組織を巡回する。そして二次リンパ組織で抗原提示細胞によって提示される特異抗原を通じた TCR 刺激によって活性化し、自身で分泌した IL-2 を使って生存と増殖を行うようになると共に、エフェクター T 細胞へと分化する。この時、エフェクター機能を獲得した CD8⁺ T 細胞は、

標的細胞膜上で孔を形成する酵素を含んだ細胞傷害性顆粒を分泌できるキラーT細胞へと分化する(41-43)。一方、ナイーブCD4⁺T細胞は、エフェクター機能を獲得する過程で、細胞を取り巻くサイトカイン環境に応じて機能的に異なる様々なヘルパーT細胞サブセットへと分化する。代表的なものに、1型ヘルパーT細胞(Th1)、2型ヘルパーT細胞(Th2)、17型ヘルパーT細胞(Th17)、濾胞ヘルパーT細胞(Tfh)、制御性T細胞(Treg)などが挙げられるが、これらサブセットは異なる種類のサイトカインを産生することで様々な免疫応答の制御を行っている(42, 43)(図17)。例えば、IL-4によって誘導されるTh2は、IL-4、IL-5、IL-13を産生し寄生虫の排除に働くのに対し、IL-21とIL-6によって分化が誘導されるTfhはIL-21などを産生し、B細胞の活性化を助けることで抗体産生に寄与している(42, 43)。IL-2とTGF- β によって誘導されるTregは、IL-10やTGF- β を産生することで他のT細胞の働きを抑制し免疫系の暴走を抑えている(42, 43)。なお、炎症性疾患・アレルギー疾患・自己免疫疾患などT細胞が関わる免疫病態の多くは、Tregとその他のヘルパーT細胞のバランスが崩れた状態だと理解されている。このように、サイトカインを産生することはヘルパーT細胞の重要な役割であり、ヘルパーT細胞の機能解析では一般的にサイトカインの産生能が調べられる。中でも細胞内サイトカイン染色法は、活性化したヘルパーT細胞からのサイトカイン分泌を試薬によってブロックした後、細胞内にあるサイトカインを特異的抗体によって染色することで1細胞あたりのサイトカイン産生能を解析することができるため、ヘルパーT細胞の研究に多用されている(図18)。この細胞内サイトカイン染色法において、サイトカインの分泌をブロックする試薬として一般的に使用されているのがArf GEFの阻害剤・brefeldin Aである(44, 45)。そのため、ヘルパーT細胞の機能においてArfが重要な役割を担う可能性は高いと推測されていたにも関わらず、これまでT細胞特異的にArfファミリーを欠損可能なマウスは存在していなかったため、T細胞でArfが果たす役割についてほとんど解析が進んでいないのが現状である。

本研究では、ヘルパーT細胞におけるArf1・Arf6それぞれの機能解明と、Arf1とArf6の

協調作用の有無を明らかにすることを目的とした。初めに、全ての exon を欠損した *Arf1* 遺伝子欠損マウス (*Arf1*^{-/-}マウス) を作製したが、*Arf1*^{-/-}マウスは着床後すぐに死亡することが判明した。全身で *Arf6* もしくは *Arf1* を欠損するマウスは共に胚性致死であるため、欠損マウスの交配による *Arf1*・*Arf6* 二重欠損マウスの作製は不可能であり、現存するマウスだけでは免疫系における *Arf1* と *Arf6* の機能を解析することは出来ない。そこで、新たに時期・組織特異的に *Arf* 遺伝子を欠損させることが可能なコンディショナルノックアウトマウスを作製することにした。*Arf6* のコンディショナルノックアウト (*Arf6*-cKO) マウスについては既に共同研究先で作製されていたため、私は *Arf1* のコンディショナルノックアウト (*Arf1*-cKO) マウスの作製に着手した。Cre/loxP システムを利用し *Arf1* 遺伝子の exon 2 ならびに exon 3 を欠損標的とし loxP 配列を設定し、サザン法と PCR 法を用いて *Arf1*-cKO マウスの樹立を確認した。樹立した *Arf1*-cKO マウスと *Arf6*-cKO マウス、さらにこれらマウスの交配によって樹立した *Arf1*・*Arf6* の両方の欠損を同時に誘導可能な *Arf1/6* コンディショナルノックアウトマウスを作製し、T細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Lck*-Cre マウスと交配することで3種類のT細胞特異的 *Arf* 欠損マウス (T細胞特異的 *Arf1* 欠損マウス : *Arf1*-KO、T細胞特異的 *Arf6* 欠損マウス : *Arf6*-KO、T細胞特異的 *Arf1/Arf6* 二重欠損マウス : *Arf1/6*-KO) を樹立し、解析に取り組んだ。解析の結果、*Arf1/6*-KO マウス由来のナイーブ T細胞のみが、TCR を介した刺激による活性化過程において、アポトーシス関連因子 *Bcl-2* ファミリーの発現バランスが崩れることでアポトーシスに陥りやすくなっていることを発見した。一方で、当初予想していたようなサイトカインの分泌阻害は、何れのマウス由来の T細胞にも認められなかった。さらに個体レベルの解析から、*Arf1/6*-KO マウスにおいては、T細胞を介した抗体応答が正常に保たれている一方、病原性 Th17 を介した自己免疫疾患の発症に耐性があることが明らかとなった。本研究により、活性化過程における T細胞の生存維持機構において、*Arf1* と *Arf6* が相補的な役割を担うという知見が得られた。加えて、*Arf1* と *Arf6* を欠損させたマウスで自己免疫病態の発症が著しく抑制されると

の知見は、Arf 経路を標的とした自己免疫疾患の新規治療法開発に繋がるものと期待される。

材料と方法

実験動物

全てのマウスは C57BL/6 へ 7 世代以上戻し交配を行った。T 細胞特異的 Arf1/6 二重欠損マウスは、*Arf1* コンディショナルノックアウト (*Arf1^{fl/fl}*) マウス[accession No. CDB1027K; <http://www2.clst.riken.jp/arg/micelist.html>]と *Arf6* コンディショナルノックアウト (*Arf6^{fl/fl}*) マウス (筑波大学・金保教授より分与) を交配することで *Arf1^{fl/fl}Arf6^{fl/fl}* マウスを樹立し、さらに T 細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Lck-Cre* マウス (46) と交配させて樹立した。コントロールマウスとして、週齢が一致した *Arf1^{+/+}Arf6^{+/+}* マウス、ならびに同ケージで飼育もしくは同腹の *Arf1^{fl/fl}Arf6^{fl/fl}Lck-Cre* マウスを使用した。*Rag2^{-/-}* マウスは Taconic 社と共同研究者・理研・小安重夫教授により作製された。全身で tdRFP を発現するマウス (以下、RFP マウス) はウルム大学の H.J. Fehling 博士から作製・分与された *Rosa26-tdRFP* レポーターマウスより作出された (47)。特に断りが無い場合、胸腺における T 細胞の分化解析には 5-7 週齢のマウスを、その他の解析には 7-12 週齢のマウスを用いた。全てのマウスは、所属大学のガイドラインに従い、SPF 基準にて飼育した。動物実験に関しては、奈良女子大学もしくは関西医科大学動物実験委員会の承認を受け、講習会に参加後、制定されている規定に従って実験を行った。組み換え DNA 実験に関しても、所属大学組み換え DNA 実験安全委員会の承認を受け、その規定に従って実験を行った。

Arf1 遺伝子欠損マウスの作製

Arf1 遺伝子の全ゲノム配列を持つ C57BL/6J BAC (RP23-316M1, BACPAC) から遺伝子破壊に必要な DNA 断片を Red/ET システム (Gene Bridge) を用いた DNA 相同組み換えにより回収した。図 19 に示すように、遺伝子破壊用のプラスミド (以降、ターゲティングベクター) は相同組み換えにより、*Arf1* の全ての open reading frame (ORF) 配列の代わりに loxP

と隣接するネオマイシン耐性 (neo) 遺伝子発現カセットの PGK-Neo-pA を挿入した。非相同性組み換え体を減少させるために、ターゲティングベクターの下流に相同組み換えが起これば欠失するが起こらなければ組み込まれて発現し細胞を殺すようにしたジフテリア毒素の断片 (DT-A) を付加した。ターゲティングベクターを制限酵素 Sal I で直鎖状にした後、TT2 ES 細胞へエレクトロポレーションにより導入した。PCR スクリーニングにより相同組み換え陽性の ES 細胞を 8 つ選出し、さらにサザンハイブリダイゼーションにより正しく相同組み換えした ES 細胞を 5 つ確認した。これらの ES 細胞のうち、3 つの ES 細胞クローンを選び、マウス 8 細胞期胚に注入しキメラマウスを作製した。100 %キメラマウス雄と C57BL/6 の雌とを交配させ、そのうち 2 系統で破壊した *Arfl* アレルの伝播を確認した。その後、全身で Cre 遺伝子を発現する CAG-Cre マウスと交配し、neo 遺伝子発現カセットを取り除いた。*Arfl*^{-/-}マウスの作出は *Arfl*^{+/+}同士を掛け合わせて行った (図 19)。

***Arfl*-cKO マウスの作製**

図 20 に示すように、*Arfl* 遺伝子を持つ BAC (RP23-316M1) から遺伝子破壊に必要な DNA 断片である A 断片 7.46 kb および C 断片 4 kb を Red/ET システムを用いて DNA 相同組み換えにより回収し、B 断片 540 bp は PCR 法を用いて回収した。ターゲティングベクターは DT-ApA/conditional KO FW ベクターの特定の場所に、上記の 3 つの断片を組み込んで作製した。上流から相同組み換えに必要な A 断片 7.46 kb と Cre/loxP システムで欠損するために loxP 配列で挟んだ *Arfl* exon 2, 3 を含む 540 bp 断片、FLP/frt システムで取り除くことができるよう frt 配列で挟んだ neo 遺伝子発現カセット、相同組み換えに必要な C 断片 4.0 kb、DT-A カセットの順で作製した。ターゲティングベクターを制限酵素 AscI で直鎖状にした後、TT2 ES 細胞へエレクトロポレーションにより導入した。PCR スクリーニングにより相同組み換え陽性の ES 細胞を 15 個選び、さらにサザンハイブリダイゼーションにより正しく相同組み換えした ES 細胞を 3 個確認した (データ示さず)。選別して得られた 3 系統の ES クロ

ーンを各々ICR マウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションで注入し、キメラマウスを製作した。ES 細胞の寄与率が 100%のキメラマウス雄と C57BL/6 の雌とを交配させ、3 つ全ての系統で改変ゲノムの伝播を確認した。その後、全身で FLP 遺伝子を発現する CAG-FLP マウスと交配し、neo 遺伝子発現カセットを取り除いた。cKO マウスの系統の維持は *Arf1^{flf}* 同士を掛け合わせて行った (図 20)。

ゲノム DNA の抽出

マウスの尾、胚盤胞からのゲノム DNA の抽出はそれぞれ以下の方法で行った。

マウスの尾からのゲノム抽出

-20°C で保存したマウスの尾に Lysis Buffer (10 mM, Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS, Proteinase K (10 mg/ml)) を加えて、55°C のインキュベーターで一晩反応させた。フェノールを加えて混合後 10,000 rpm で 5 分間遠心して上清を回収した。イソプロピルアルコールを加えて上下転倒させ DNA 沈殿を形成させ、10,000 rpm で 5 分間遠心して上清を除いた。75 %エタノールを加えて 10,000 rpm で 5 分間遠心して上清を除いた。ゲノム DNA を乾燥させた後、TE 50 µl を加えて溶解した。

胚盤胞からのゲノム抽出

観察後、Lysis Buffer (10 mM, Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS, Proteinase K (10 mg/ml)) を加えて、55°C のインキュベーターで一晩反応させた。フェノール・クロロホルムを加えて混合後 10,000 rpm で 5 分間遠心して上清を回収した。クロロホルムを加えて混合後 10,000 rpm で 5 分間遠心して上清を回収した。グリコーゲン、5 M NaCl を加え混合後、100 % EtOH を加え上下転倒し-80°C で 30 分反応させた。10,000 rpm、4°C で 30 分間遠心して上清を除き、75 %エタノールを加えて 10,000 rpm、4°C で 5 分間遠心して上清を除いた。ゲノム DNA を乾燥させた後、TE 10 µl を加えて溶解した。

PCR 法によるゲノムタイピング

マウスの尾の遺伝子タイピング

ゲノム DNA サンプルをテンプレートに、Gene Amp PCR System9700 (Applied Biosystems) を用いて PCR を行い、DNA 増幅を 2 %アガロースゲル泳動で確認した。反応液はチューブ 1 本あたり MilliQ 水 11.565 μ l、Taq High Yield 添付 10 \times Buffer 1.5 μ l、Taq High Yield 添付 dNTPs 0.3 μ l、100 μ l FW プライマー 0.03 μ l、100 μ l REV プライマー 0.03 μ l、サンプル 1.5 μ l、Taq High Yield (Greiner) 0.075 μ l の計 15 μ l とした。flox-neo-/WT 検出用の温度条件は 94 $^{\circ}$ C での変性 3 分の後、94 $^{\circ}$ C での変性 15 秒、60 $^{\circ}$ C でのアニーリング 30 秒、72 $^{\circ}$ C での伸長 1 分のサイクルを 32 回、72 $^{\circ}$ C での伸長 7 分を 1 回とした。ゲノムタイピングには flox-neo-/WT 検出用 PCR プライマーを用いた。配列は以下の通り。

【flox-neo-/WT 検出用プライマー】

FW プライマー・Arf1-cKO-A : 5'-GCTTGATCTTCGTAGTGGACAGCAATGAC-3'

REV プライマー・Arf1-cKO-C-3 : 5'-TGAGGAAAAGGAAGAATTAGTGCCAGGGAC-3'

loxP 検出用の温度条件は 94 $^{\circ}$ C での変性 2 分の後、94 $^{\circ}$ C での変性 1 分、59 $^{\circ}$ C でのアニーリング 2 分、72 $^{\circ}$ C での伸長 3 分のサイクルを 35 回、72 $^{\circ}$ C での伸長 7 分を 1 回とした。ゲノムタイピングには loxP 検出用 PCR プライマーを用いた。配列は以下の通り。

【loxP 検出用 PCR プライマー】

FW プライマー・Fw-cTV2 : 5'-CGTCTAAGAAACCATTATTATCATGAC-3'

REV プライマー・Rev-cTV3 : 5'-GAACTTCGGATCCTAGTGAACCTCTTCGAG-3'

胚盤胞の遺伝子タイピング

ゲノム DNA サンプルを、Gene Amp PCR System9700 (Applied Biosystems) を用いて PCR を行い、DNA 増幅を 2 %アガロースゲル泳動で確認した。PCR 反応液はチューブ 1 本あた

り MilliQ 水 3.05 μ l、KOD-FX 添付 2 \times Buffer 7.5 μ l、KOD-FX 添付 dNTPs 3 μ l、100 μ l FW プライマー 0.075 μ l、100 μ l REV プライマー 0.075 μ l、サンプル 1 μ l、KOD-FX polymerase (TOYOBO) 0.3 μ l の計 15 μ l とした。温度条件は 94 $^{\circ}$ C での変性 2 分の後、98 $^{\circ}$ C での変性 10 秒、60 $^{\circ}$ C でのアニーリング 30 秒、68 $^{\circ}$ C での伸長 1 分のサイクルを 40 回、68 $^{\circ}$ C での伸長 15 分を 1 回とした。ゲノムタイピングには WT 検出用と KO 検出用 PCR プライマーを用いた。配列は以下の通り。

【WT 検出用プライマー】

FW プライマー・Arf1 F : 5'-TTGTGACCACCATTCCCACCATTG -3'

REV プライマー・Arf1 R2 : 5'-GTGCACTAATGTGGCCATGTTTC-3'

【KO 検出用プライマー】

FW プライマー・neo2 : 5'-CATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACG -3'

REV プライマー・Arf1-C : 5'-AGGGCTCTCAATCTCAGGAAGAAGCCTGGC -3'

胚盤胞の採取と *in vitro* 培養

Arf1^{+/+} 同士のマウスを交配し、プラグを確認した 3 日後の午前中に雌マウスの子宮を摘出し、ハンクス液で灌流する。子宮から採取された胚盤胞は 24 穴プレート内のピルビン酸、非必須アミノ酸、15 % fetal bovine serum (FBS) 含有高グルコース Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma) で 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ で培養した。7 日目に、各胚をデジタルカメラ (Moticam, SHIMADZU) が搭載された Olympus (IX70) 顕微鏡で撮影し、PCR にて遺伝子タイピングを行った。一部は Hoechst 33342 (TAKARA) や抗 GM130 抗体で染色し、LEICA (DMI 3000B) 顕微鏡で観察後、PCR にて遺伝子タイピングを行った。内部細胞塊 (ICM) と栄養外胚葉 (TE) の面積は Motic Images Plus 2.3S を使って測定し、Excel にて ICM の割合の統計解析を行った。

抗体

マウスに対する以下の抗体は製品説明書に示された濃度で使用した。本研究で使用した抗体の詳細は次の通りである。抗 Mcl-1 抗体 (#600-401-394) は Rockland Immunochemicals 社より購入した。抗 Erk2 抗体 (D2) は Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。蛍光標識された抗 CD4 抗体 (GK1.5)、抗 CD8 抗体 (53-6.7)、抗 CD62L 抗体 (MEL-14) は TONBO 社より購入した。ビオチン標識された抗 CD44 抗体 (IM7) や、蛍光標識された抗 CD25 (PC61) 抗体、抗 IL-17A 抗体 (TC11-18H10.1)、抗 CD98 抗体 (RL388)、抗 CD71 抗体 (RI7217)、抗 CD45.1 抗体 (A20)、抗 CCR7 抗体 (4B12)、抗 Annexin V 抗体 (#640912) は Biolegend 社より購入した。抗 GM130 抗体 (610822) や蛍光標識された抗 Foxp3 抗体 (MF23)、抗 CXCR5 抗体 (2G8) は BD Biosciences 社より購入した。蛍光標識された抗 PD-1 抗体 (RMPI-30) は eBioscience 社より購入した。抗 HSP90 抗体 (#4874)、抗 phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) 抗体 (D57.2.2E)、抗 Bim 抗体 (#2819)、抗 Bcl-2 抗体 (D17C4)、抗 Bcl-xL 抗体 (54H6) は Cell Signaling Technology 社より購入した。

定量リアルタイム PCR

RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用い、製品説明書に従って細胞から total RNA を回収した。回収した RNA から PrimeScript™ RT Master Mix (TAKARA) を用いて製品説明書に従って逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、以下に示すプライマーセットを使用し、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO) と Rotor-Gene Q (QIAGEN) を用いて製品説明書に従って PCR 反応と遺伝子発現の評価を行った。

マウス *Arf1* のプライマーセット

(5'-ACAGAGAGCGTGTGAACGAG-3' と 5'-TGGCCTGAATGTACCAGTTC-3')

マウス *Arf6* のプライマーセット

(5' TCCTAATGAGCGTCCTCCAC-3' と 5'- TCCTAGGAATGGGTTTTGGA-3')

マウス *Cyclophilin A* のプライマーセット (相対定量用コントロール)

(5'- ATGGCACTGGCGGCAGGTCC-3' と 5'- TTGCCATTCCTGGACCCAAA-3')

フローサイトメトリー解析

細胞の懸濁、洗浄、抗体希釈には FACS バッファー (0.1 % sodium azide, 0.1 % BSA, HBBS) を用いた。表面抗原については、適宜蛍光標識抗体で染色した後、死細胞除去の目的で 7-アミノ-アクチノマイシン D (7-AAD, Sigma) 含有 FACS バッファーに懸濁した上で、7-AAD 陰性画分を生細胞として解析した。細胞内サイトカイン染色は、対象細胞を brefeldin A (eBioscience) 共存下に 10 ng/ml PMA (Sigma) および 0.2 µg/ml Ionomycin (Sigma) で 4 時間刺激した後、Fixation & Permeabilization Buffer (eBioscience) もしくは Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) により固定・細胞膜透過処理を行った後、目的分子に対する抗体染色を行った。染色された細胞はフローサイトメーターFACSCanto™ II (BD Biosciences)を用いて蛍光強度情報を取得し、FlowJo Software (Tree Star)を用いてデータ解析した。

細胞培養

RPMI1640 (Fujifilm) に 10 % ウシ胎児血清 (HyClone) 、55 µM 2-メルカプトエタノール、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、1 mM ピルビン酸、非必須アミノ酸 (Fujifilm) 、10 mM HEPES を添加したものを complete-RPMI1640 培地 (以下、培地) として細胞培養に用いた。

細胞調製

脾臓、パイエル板、腸間膜リンパ節からの細胞調整

脾臓、パイエル板 (PPs) 、腸間膜リンパ節 (MLN) をナイロンメッシュ (77 µm) に挟

んだ上でシリンジのゴム部分でホモジェナイズし、コンカルチューブに回収した。脾臓については赤血球溶解のため、細胞を 1 ml の Ack lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) に再懸濁後、氷上で 2 分間静置した。培地で洗浄後、2 ml の培地に再懸濁し 77 μm ナイロンメッシュに通したものを脾臓細胞として扱った。

CD4⁺ T 細胞の調整

脾臓細胞からの CD4⁺ T 細胞の単離は MojoSort™ Mouse CD4 T Cell Isolation Kit (Biolegend) を使用し、添付の説明書に記載の方法に従って行った。

ナイーブ CD4⁺ T 細胞の調製

ナイーブ CD4⁺ T 細胞のみを回収するために、CD4⁺ T 細胞を PECy7 標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 CD62L 抗体、ビオチン標識抗 CD44 抗体、APC 標識抗 CD25 抗体で 4°C、30 分間染色した。洗浄後、さらに Brilliant Violet 421™ Streptavidin (Biolegend) と 4°C、15 分間、遮光状態で反応させた。培地で洗浄後、 1.5×10^7 細胞/ml になるように 7-AAD を含む培地に再懸濁し、セルソーター (FACS Aria™ III) によって CD4⁺CD62L^{lo}CD44^{hi}CD25⁻ 分画の細胞を回収してきたものをナイーブ CD4⁺ T 細胞とした。

大腸粘膜固有層リンパ球の回収

大腸から脂肪や血液を取り除いた後、1 cm 程度ずつで切断し、PBS 中で腸内容物を洗浄した。上皮系細胞を取り除くため、5 mM EDTA ならびに 1 mM dithiothreitol を添加した 10 ml HBSS 中で 37°C、30 分振とう後、2 mM EDTA、0.5 % BSA、100 U/ml ペニシリン、ならびに 100 μg/ml ストレプトマイシンを添加した PBS で良く洗浄した。洗浄した組織をさらに細かく切断し、1.3 mM CaCl₂、0.5 mM MgCl₂、Liberase TM (Roche; 200 μg/ml)、ならびに DNase I (Roche; 10 μg/ml) を添加した HBSS 中で 37°C、30 分振とうした。培地で洗浄後、培地で

希釈した 40 % Percoll (GE Healthcare) 溶液で再懸濁した上で、培地で希釈した 80 % Percoll 溶液の上にパスツールピペットを用いて重層した。920g で 20 分間遠心後、中間層 (40 % Percoll 溶液と 80 % Percoll 溶液の境界面) に集積する細胞集団をリンパ球画分として分取した。

細胞増殖解析

脾臓由来 CD4⁺ T 細胞を PBS で 2.5×10^6 細胞/ml に調整し、3 μ M の eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 450 (eF450) を添加後、37°C で 5 分間標識した。培地で洗浄後、培地に再懸濁し、24 well-plate にて培養した。1 回の細胞分裂によって eF450 の蛍光が半減することを利用し、フローサイトメトリーで eF450 の蛍光レベルを測定することで細胞増殖を評価した。

Homeostatic proliferation

eF450 で標識した脾臓由来 CD4⁺ T 細胞を PBS で 5×10^6 細胞/ml に調製し、200 μ l (1 匹当たり 1×10^6 細胞) ずつ Rag2^{-/-}マウスに静脈内投与することで、Homeostatic proliferation を誘導した (図 33A)。4 日後に Rag2^{-/-}マウスの脾臓細胞を調製し、解析に用いた。

各種ヘルパーT 細胞サブセットへの分化誘導

ナイーブ CD4⁺ T 細胞を抗 CD3 ϵ モノクローナル抗体 (clone 145-2C11; 5 μ g/ml) と抗 CD28 モノクローナル抗体 (clone 37.51; 1 μ g/ml) で刺激する際に、以下に示すサイトカインを添加し 4 日間培養することで各種ヘルパーT 細胞へと分化誘導した。

- Th1 : マウス IL-12 (10 ng/ml)

- Th2 : マウス IL-4 (10 ng/ml)
- 非病原性 Th17 : マウス IL-6 (30ng/ml) ならびにヒト TGF-β1 (3 ng/ml)
- 病原性 Th17: マウス IL-6 (30 ng/ml) 、マウス IL-23 (50 ng/ml) 、マウス IL-1β (30 ng/ml) 、
ならびに抗マウス IL-2 抗体 (1 μg/ml)
- Treg : マウス IL-2 (10 ng/ml) ならびにヒト TGF-β1 (20 ng/ml)

また、分化を誘導した細胞からのサイトカイン分泌能を評価するために Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific)で添付の製品指示書に従って 24 時間再刺激した後、培養上清を回収した。培養上清中のサイトカイン量は、ELISA MAX™ Deluxe Set (Biolegend) を用いた ELISA 法を行った後に、iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories) で 450 nm の吸光度を測定することで計測した。

実験的自己免疫脳髄炎モデル

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質の 35-55 残基に相当するペプチド・MOG₃₅₋₅₅ (1 匹当たり 200 μg) にフロイント完全アジュバント (1 匹当たり 200 μl) ならびに *M. tuberculosis* H37Ra 死菌 (終濃度 5 mg/ml) を加えて作製したエマルジョンを、年齢性別が一致した 7~9 週令のマウスの側腹部に皮下注射し免疫した。また、血液脳関門を破壊させ、免疫細胞を中枢神経系に侵入させるため、0 日目と 2 日目に百日咳毒素 (1 匹当たり 200 ng) を腹腔内に投与した。臨床スコア (図 39H) は Ingunn M Stromnes & Joan M Goverman の方法に従い、二重盲検法で毎日 0-5 のスコアを評価した (48)。

大腸炎モデル

脾臓由来ナイーブ CD4⁺ T 細胞を PBS で 10⁶ 細胞/ml に調整し、200 μl (1 匹あたり 2×10⁵ 細胞) ずつ *Rag2*^{-/-} マウスに静脈内投与した。数日おきにマウスの体重を測定し、約 3 週間

病態をモニターした。尚、動物実験倫理の指針に基づき、実験中の体重が初期体重の 70-80 % 以下に減少した個体については安楽死を施し実験を終了させた。

大腸病理標本

マウスから採取した大腸組織を 4 %パラホルムアルデヒド含有 PBS にて 4°C で一晩固定した後、関西医科大学・総合研究施設においてパラフィン切片の作製ならびにヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。得られた切片の画像は NanoZoomer (浜松ホトニクス) を用いて撮影・デジタル化した。

グルコースの取り込み能解析

細胞を 0.5 % FCS 含有 RPMI1640 に懸濁し、蛍光性グルコースアナログである 2-NBDG (50 μ M) を加えて 2 時間培養した。細胞を洗浄後、フローサイトメトリーにより 2-NBDG の蛍光 (励起 488 nm) 強度を評価した。

細胞生存維持における ROS の影響評価

細胞内の活性酸素種 (ROS) レベルを測定するために、対象細胞を 5 μ M の CellROX Deep Red Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて 37°C で 30 分間染色した後、適切な細胞表面マーカー抗体で染色して、フローサイトメトリーによる解析を行った。また、アポトーシスと ROS の関係の評価するために、CD4⁺ T 細胞を 10 mM の *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) 共存下・非共存下に 3 日間刺激した。その後、製品指示書に従って Annexin V ならびに 7-AAD で細胞を染色し、死細胞の割合をフローサイトメトリーによって評価した。

SubG1 細胞解析

SubG1 細胞の割合を評価するために、細胞を 75 %のエタノールで細胞の固定・透過処理

を 4°C で 2 時間行った後、10 µg/ml 7-AAD で DNA を染色した。

卵白アルブミン (OVA) 特異的抗体応答の測定

Th1 環境下における OVA 特異的抗体応答は、Sigma Adjuvant System (SAS, Sigma) と共に 25 µg の OVA を腹腔内投与することで誘導した。Th2 環境下における OVA 特異的抗体応答は、Imject Alum adjuvant (Thermo Fisher Scientific) と共に 100 µg の OVA を腹腔内投与した後、14 日目に同様の方法で追加免疫を行うことで誘導した。最初の免疫から 28 日目に麻酔をかけたマウスから全採血を行い、採取した血液を 37°C で 30 分間静置後、引き続き 4°C で 2 時間静置することで血餅を凝集させた。5,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を回収し、これを血清とした。10 µg/ml OVA を 96 ウェルプレートに固相化した後、PBS で希釈した 5 % スキムミルクでブロッキング処理を行った。本プレートに 1 % スキムミルク含有 PBS で適宜希釈した血清を 37°C で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05 % Tween 20 含有 PBS) でプレートを洗浄し、次いで 1 % スキムミルク含有 PBS で 3,000 倍に希釈した HRP 標識抗マウス Ig 抗体 (GE Healthcare) を添加し 37 °C で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液にて再度プレートを洗浄し、TMB を基質としたペルオキシダーゼ反応を用いて抗体の検出を行った。反応を終濃度 0.5 M の硫酸を添加することで停止させ、iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories) を用いて 450 nm の吸光度を測定することで、抗体価の評価を行った。

糞便中 IgA の測定

採取した糞便量を計量の上、2 mM PMSF ならびに 0.2 mg/ml benzamidine を添加した PBS を 100 mg 当たり 500 µl 加え、vortex で良く攪拌した。15,000 rpm で 10 分間、4°C で遠心し、上清を回収したものをサンプルとした。サンプル中の IgA 量は、SBA Clonotyping System-C57BL/6-HRP (Southern Biotech) を用いて、製品説明書に従って ELISA 法によって

評価した。

SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

コントロールならびに Arf1/6-KO マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を抗 CD3ε モノクローナル抗体 (clone 145-2C11; 5 µg/ml) と抗 CD28 モノクローナル抗体 (clone 37.51; 1 µg/ml) で 2 日または 4 日間刺激し、細胞を溶解バッファー (20 mM Tris-Cl (pH7.4), 12.5 mM β-glycerophosphate, 2 mM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM benzamidine, 1 % Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 % aprotinin) で溶解した後、2-メルカプトエタノール含有 SDS サンプルバッファー (Laemmli's SDS sample buffer) を加えて加熱処理した。得られたサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し PVDF 膜に転写後、5 % スキムミルク含有 TBS で 37°C、1 時間ブロッキングを行った。引き続き 37°C で 1 時間もしくは 4°C で 24 時間、一次抗体反応を行った後、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare) または HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) および化学発光 (ECL plus, Amersham Biosciences) を用いて対象分子を検出した。ウェスタンブロットの分析と定量には LAS4000 イメージングシステム (GE Healthcare) を用いた。

組織染色

摘出した脾臓、腸間膜リンパ節 (MLN)、パイエル板 (PPs) を 1 % ホルムアルデヒドで固定した。固定した組織は 4°C において 10、20、30 % スクロース溶液に順に置換後、OTC コンパウンド (Sakura Finetechnical) で包埋し、-80°C で凍結させた。クリオスタット (Leica Biosystems) で作製した 10 µm の凍結切片を冷アセトンで 3 分間固定し、PE 標識抗 CD3ε 抗体 (145-2C11)、AlexaFluor488 標識抗 B220 抗体 (eBioscience; RA3-6B2)、ならびに抗 desmin rabbit 抗体 (Abcam; Y66) で染色した後、さらに AlexaFluor633 標識抗 rabbit IgG (Molecular Probes) で染色した。作製した試料は共焦点顕微鏡 FV1200 (Olympus) にて観察し、FV10-ASW

(Olympus) と Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems) を用いて画像解析を行った。

統計解析

統計解析には Student's t-test または Mann-Whitney U test を用い、p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判断した。

結果

2-1. 全身性 *Arf1* 欠損マウスは胎生致死である

Arf1 ホモ欠損マウスを解析するため、*Arf1* ヘテロ欠損マウス同士の交配を行い、*Arf1* ホモ欠損マウスの作製を試みた。*Arf1* ヘテロ欠損マウス同士の交配によって得られた、生後 21 日目のマウス 147 匹の遺伝子型を PCR にて決定したところ、80 匹が *Arf1* ヘテロ欠損マウス、67 匹が野生型マウスであり、*Arf1* ホモ欠損マウスは存在しなかった (表 2)。致死性となる時期を特定するため、*Arf1* ヘテロ欠損マウスどうしの交配によって得られた受精後 12.5 日目の胚を集め、PCR によって遺伝子型を調べたが、*Arf1* ホモ欠損胚は 1 匹も確認出来なかった (表 2)。一方、受精後 3.5 日目の胚盤胞を調べたところ、45 個の胚盤胞のうち、26.7%にあたる 12 個の胚盤胞が *Arf1* ホモ欠損であり、これはメンデルの分離の法則にしたがって *Arf1* ホモ欠損胚盤胞が存在することを示している。ホモ欠損 *Arf1*^{-/-}胚盤胞は、野生型 *Arf1*^{+/+}やヘテロ型 *Arf1*^{+/-}胚盤胞と外観では区別がつかないが (図 21A, B)、受精後 5.5 日目の円筒胚時期では細胞が乖離した異常胚が確認できており (図 21C)、この異常胚が *Arf1* ホモ欠損胚である可能性が考えられる。

これらの結果から、*Arf1* は胚盤胞期までの発生には必要ないが、着床後の胚発生に必須であることが明らかとなった。これは培養細胞内では *Arf1* 単独をノックダウンさせても特に異常が見られないとする従来の報告とは大きく異なる (19)。我々の研究成果により単独 *Arf1* の個体での重要性が示唆され、*Arf1* 機能解明が急がれる一方、KO マウスは早期の胎生致死であるが故に個体レベルでの生理機能解析が行えないことも判明した。

2-2. *Arf1*^{-/-}胚盤胞は *in vitro* 培養で正常に増殖する

着床後という早いステージで *Arf1*^{-/-}胚が死亡することは増殖の障害、または細胞系列特異的欠陥によって生じた細胞の機能不全で説明することができる。*Arf* は酵母の有糸分裂に必

須であると報告されているが、受精後 3.5 日目の *Arf1*^{-/-}胚盤胞は野生型や *Arf1*^{+/-}胚盤胞と外観上は見分けがつかない (図 21A, B)。 *Arf1*^{-/-}胚が死亡する原因を探るために、*in vitro* 培養系を用いて *Arf1*^{-/-}胚盤胞の機能障害の有無を調べた。胚盤胞を *in vitro* で培養して 7 日後、*Arf1*^{-/-}と野生型の胚盤胞において同様に栄養外胚葉と内部細胞塊が観察された (図 22A)。野生型、*Arf1*^{+/-}、*Arf1*^{-/-}胚盤胞の間で栄養外胚葉に対する内部細胞塊の面積比において有意な差は見られなかった (図 22B)。受精後 3.5 日目の胚を 7 日間培養後、ヘキストや抗 GM130 抗体で染色したが、核やシスゴルジの形態に異常は見られなかった (図 23A, B)。同様な結果は *neo* カセットを欠損させたマウスからも得られた (データ示さず)。これらの結果から、*Arf1* はマウスの胚盤胞の外見や *in vitro* での増殖には必ずしも必要ではない事が示唆された (49)。

2-3. *Arf1* コンディショナルノックアウトマウスの作製と系統樹立

上述のように *Arf1*^{-/-}マウスは胚発生の初期段階で致死となることが判明した。そこで、免疫系における *Arf1* の生理機能解析を行うため、時期・組織特異的に *Arf1* の欠損を誘導可能な *Arf1* コンディショナルノックアウト (*Arf1*-cKO) マウスの作製に取り組んだ。*Arf1*-cKO マウスを作製するにあたり、コンディショナル Cre/loxP システムを使った。Exon 2, 3 の欠損により、exon 1 のメチオニンから 51 番目のアミノ酸でフレームシフトが生じ、62 アミノ酸生成時にストップコドンが現れ、結果として生じた転写産物は不完全な形なため、*Arf1* の機能を消失できる可能性が高いと考え、exon 2, 3 を欠損部位に選んだ。Exon 2, 3 を loxP 配列で挟んだ *Arf1* exon 2, 3 flox neo 遺伝子座を持つターゲティングベクター (TV) を作製した。その後、制限酵素によって TV を一本鎖にし、エレクトロポレーションによって TT2 ES 細胞に導入した。ネオマイシン胎生遺伝子 (*Neo*) を持つ ES 細胞のみコロニーを形成できる培地 (G418 含有) で ES 細胞を選別した。その中から目的通りの改変遺伝子を持つ ES 細胞を PCR によって選別し、キメラマウスを作製した。まず、キメラマウスと C57BL/6

を交配し、*Arf1 exon 2, 3 flox neo* 遺伝子座を持つマウスの系統を持つマウスの系統を樹立した。目的通りの *Arf1 exon 2, 3 flox neo* 遺伝子座を持つマウスであることの確認は、マウスの尾より回収したゲノム DNA の遺伝子型を PCR によって調べた（データ示さず）。*Neo* 遺伝子が *Arf1* の発現に影響を与えるのを避けるため、FLP/frt システムにて *Arf1 exon 2, 3 flox neo* 遺伝子座を持つマウスの *Neo* カセットを取り除いた。*Neo* を除いた *Arf1 exon 2, 3 flox* 遺伝子座をヘテロに持つマウス (+/*flox-neo*-) どうしの交配を行い、PCR によってホモの *flox* マウス (*flox-neo*-/*flox-neo*-) が確認されたことから (図 24)、*Arf1*-cKO マウスの系統樹立に成功したと結論づけた。*Arf1 exon2,3 flox* 遺伝子座をホモに持つマウスで、生存、成長、生殖能力に異常は見られなかった（データ示さず）。

2-4. *Arf1/6* 欠損 T 細胞の胸腺分化は正常である

理化学研究所のデータベース、RefDIC (<http://refdic.rcai.riken.jp/welcome.cgi> : [RMPSTC027003](#)、[RMPSTC028001](#)) では、脾臓の CD4⁺ T 細胞・CD8⁺ T 細胞において、Arf ファミリーの中でも特に Arf 1 と Arf6 の発現が高いことが示されている。そこで、T 細胞を対象に Arf 経路の役割と Arf1・Arf6 の協調作用の有無を調べることにした。全身性の Arf1 または Arf6 の欠損マウスは共に胚性致死であるため (13, 49)、*Arf1* コンディショナル KO (*Arf1*-cKO) マウス、*Arf6* コンディショナル KO (*Arf6*-cKO) マウス、ならびに *Arf1*-cKO マウスと *Arf6*-cKO マウスの交配によって生まれた *Arf1/6*-cKO マウスと、T 細胞特異的 Cre リコンビナーゼを発現する *Lck*-Cre マウスとを交配することで、それぞれ T 細胞特異的 *Arf1* 欠損、*Arf6* 欠損、ならびに *Arf1/Arf6* 二重欠損マウスの 3 種類のマウスを樹立した (以下、それぞれの T 細胞特異的欠損 cKO マウスを *Arf1*-KO、*Arf6*-KO、*Arf1/6*-KO マウスと表記する)。対象遺伝子の発現消失は、脾臓由来 CD4⁺ T 細胞における定量リアルタイム PCR によって確認した (図 25)。T 細胞は胸腺で分化した後に、末梢で機能することが知られている (42, 43)。そこで、まず樹立した 3 種類のマウスの胸腺における T 細胞分化を評価した。

これらのマウスにおける胸腺細胞数と脾臓細胞数はコントロールマウスと有意な差は認められなかったが (図 26A, 27A) 、より詳細な解析を行った結果、*Arf1/6-KO* マウスにおいてのみ、脾臓における $CD4^+$ T 細胞数と $CD8^+$ T 細胞数が減少し (図 27B) 、反対に胸腺における $CD4SP$ 細胞数と $CD8SP$ 細胞数が増加していることが明らかとなった (図 26B, 26C) 。またこの時、*Arf1-KO* マウスや *Arf6-KO* マウスでは *Arf1/6-KO* マウスで見られたような脾臓における $CD4^+$ T 細胞・ $CD8^+$ T 細胞の減少は認められなかった (図 27B) 。胸腺における $CD4SP$ 細胞数・ $CD8SP$ 細胞数の増加の主な原因として、①胸腺分化過程における『正の選択』が促進し DP 細胞から SP 細胞への分化が効率的に進んでいる、もしくは②SP 細胞の胸腺から末梢への移動 (egress) が抑制されている、の二つの可能性が考えられる。可能性①の『正の選択』とは、胸腺の DP 期において、胸腺上皮細胞が提示した自己抗原に適度に認識できる TCR を持った T 細胞を選ぶ過程のことであり、ここで選ばれた細胞が SP 細胞へと分化するポテンシャルを持っている。『正の選択』によって選ばれた DP 細胞は TCR β 鎖 (TCR β) と細胞表面受容体 CD69 の両方を細胞表面に高く発現する (TCR β^+ CD69 $^+$) ことが知られているが (50)、コントロールマウスと各 T 細胞特異的 *Arf* 欠損マウス間で DP 細胞における TCR β^+ CD69 $^+$ 細胞の割合に有意な差は認められなかった (図 26D) 。次に、可能性②を調べるため、胸腺から末梢への成熟 SP 細胞の移動効率を調べた。SP 細胞は、CD62L の発現が高く CD69 の発現が低い (CD62L hi CD69 lo) SP 細胞に分化したての“未成熟”細胞と、CD62L の発現が低く CD69 の発現が高い (CD62L lo CD69 hi) “成熟”細胞とに区別することができ (51)、成熟細胞になった上で末梢へと移動する。そこで、SP 細胞における CD62L の発現と CD69 の発現を比較した。その結果、*Arf1/6-KO* マウスはコントロールマウスと比較して、 $CD4SP$ ・ $CD8SP$ 共に成熟 SP 細胞の割合が多くなっていた (図 26E) 。コントロール SP 細胞と比較して *Arf1/6* 欠損 SP 細胞の末梢への移動が抑制されていることを同一個体内で比較するために、コンジェニックマーカーである CD45.1 の発現の有無によって区別できるようにしたコントロールマウス由来の骨髓細胞 (CD45.1 $^+$) と *Arf1/6-KO* マウス由来の

骨髄細胞 (CD45.1) を 1:1 で混合し、全身に蛍光タンパク質 RFP を発現するドナーマウスに移植し、骨髄キメラマウスを作製した (図 28A)。その結果、骨髄キメラマウスの胸腺 CD4SP 細胞に対する脾臓 CD4⁺ T 細胞の割合 (egress index) が、Arf1/6-KO マウス由来である RFP/CD45.1 細胞で有意に減少していた (図 28B)。これらの結果から、Arf1/6-KO マウスでは成熟した SP 細胞の胸腺から末梢への移動が抑制されており、それに伴い脾臓における CD4⁺ T 細胞数や CD8⁺ T 細胞数が減少していたものと考えられた。

2-5. T 細胞における Arf1・Arf6 の欠損はサイトカイン分泌能に影響を及ぼさない

ArfGEF 阻害剤である brefeldinA が活性化 T 細胞からのほぼ全てのサイトカイン分泌を完全に阻害することを受け、次に Arf 欠損 CD4⁺ T 細胞でも同様にサイトカインの分泌が阻害されているか否かを調べた。その結果、予想に反し、Arf1/6-KO マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を活性化した時に分泌される IL-2 の量は、コントロール細胞と同程度であった (図 29A)。また、Arf1/6 の欠損により、brefeldin A の作用とは関係のない新しい分泌経路によって IL-2 の分泌が補完されている可能性を考え、brefeldin A 存在下に Arf1/6 欠損 CD4⁺ T 細胞からの IL-2 分泌能を調べた。しかし、Arf1/6 欠損 CD4⁺ T 細胞でもコントロール細胞と同様に brefeldin A の濃度に依存した IL-2 の分泌阻害が観察され (図 29B)、Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞においてもサイトカイン分泌が brefeldin A の標的分子によって制御されていることが明らかとなった。Arf 欠損が IL-2 以外のサイトカイン分泌に影響を及ぼすかを調べるため、Arf1/6-KO マウス由来ナイーブ CD4⁺ T 細胞を *in vitro* で様々なヘルパー T 細胞 (Th1、Th2、Th17) へと分化させた上で、各ヘルパー T 細胞に特徴的なサイトカインの分泌量を調べた。その結果、Th2 へと分化させた細胞からの IL-4 の分泌量は若干低下していたものの、Th1 や Th17 へと分化させた細胞から分泌される IFN- γ ・IL-17 の量はむしろコントロール細胞よりも亢進していた (図 29C)。これらの結果から、Arf1 と Arf6 は必ずしも活性化 T 細胞からのサイトカイン分泌に必要ではないことが明らかとなった。

2-6. Arf1/6-KO マウスにおける抗体産生能は正常である

免疫系において CD4⁺ T 細胞が担う最も重要な役割の一つは、B 細胞を活性化し、抗体産生を助けることである。胸腺から出たナイーブ T 細胞が、二次リンパ組織で樹状細胞から抗原提示を受けて活性化すると、今度は活性化したヘルパーT 細胞が同じ抗原を認識する B 細胞を選択的に活性化する。活性化された B 細胞は胚中心と呼ばれるリンパ節内の構造へと移動し、濾胞ヘルパーT 細胞 (Tfh) の助けによって最終的に形質細胞と呼ばれる抗体産生細胞へと分化し、抗体を産生する (42, 43) (図 30)。 *In vivo* において T 細胞における Arf 欠損が抗体応答に影響を与えるのか否かを明らかにするため、卵白アルブミン (OVA) と Th1 タイプの免疫応答を誘導することが知られている SAS アジュバントもしくは Th2 タイプの免疫応答を誘導することが知られている Alum アジュバントを混合し、腹腔内に投与してマウスを免疫した (52, 53)。 Arf1/6-KO マウス血清中の OVA に対する抗体価を調べた結果、 *in vitro* で見られた結果とは異なり、Th1 タイプの免疫誘導下で OVA 特異的抗体価が低下していた一方、Th2 タイプの免疫応答誘導下では正常なレベルの OVA 特異的抗体が産生されていた (図 31A)。脾臓と腸間膜リンパ節 (MLN) の組織学的な解析結果から、Arf1/6-KO マウスのリンパ節はコントロールマウスのリンパ節と同様に T 細胞領域・B 細胞領域がはっきりと分かれた構造が見られ、リンパ節の構造に大きな異常は認められなかった (図 31B, 31C)。複数ある二次リンパ組織の中でも、MLN やパイエル板 (PPs) といった腸管関連リンパ組織は、特に腸内細菌に対する分泌型 IgA 抗体の産生に重要である。そこで、PPs における Tfh の割合と糞便中の IgA 抗体の量を、コントロールマウスと Arf1/6-KO マウス間で比較した。 Arf1/6-KO マウスの PPs では CD4⁺ T 細胞に占める Tfh の割合がコントロールマウスに比して若干低下していたが、糞便中 IgA の量に有意な差は認められなかった (図 31D, 31E)。このように、Arf1/6-KO マウスのリンパ節では Th1 条件下における抗体価の減少や Tfh の割合の減少などが認められるものの、腸管における B 細胞の抗体産生を助ける能力は

総じて維持されていることが明らかとなった。

2-7. Arf1 と Arf6 は mTORC1 が制御する T 細胞の機能に重要ではない

セリンスレオニンキナーゼ mTOR の機能複合体 mTORC1 は、細胞外の栄養状態を認識して細胞の生存や代謝などを制御するハブタンパク質であり、抗がん剤として知られるラパマイシンの標的分子である (54)。ショウジョウバエ S2 細胞を使った実験から、Arf1 がアミノ酸を介した mTORC1 の活性化に寄与していること、さらに Arf6 が PLD1-mTORC1 経路を介した腫瘍細胞の増殖を制御していることが報告されている (37, 38, 55)。そこで、Arf 欠損が T 細胞における mTORC1 シグナルに影響を与えるか否かを調べた。mTORC1 は、活性化すると S6 キナーゼのリン酸化・活性化を通じてその下流分子である S6 タンパク質のリン酸化を誘導することが知られている。Arf1/6-KO マウス由来の脾臓 CD4⁺ T 細胞ではリン酸化 S6 (pS6) の発現がコントロールと比較してわずかに低下していた (図 32A)。また、mTORC1 は活性化 T 細胞のグルコース代謝を制御していることが知られているので、TCR 刺激による蛍光性グルコースアナログ (2NBDG) の取り込み量を調べたところ、これについても Arf1/6-KO 細胞で低下が認められた (図 32B)。一方で、mTORC1 シグナルの活性化に伴い発現が誘導されることの知られるアミノ酸トランスポーター CD98 の発現レベルは、コントロール細胞と Arf 欠損 T 細胞の間で差が認められなかった (図 32C)。さらに別の mTORC1 シグナルターゲットであるトランスフェリン受容体 CD71 についても、その発現レベルは、TCR 刺激して 24 時間後には Arf 欠損細胞でわずかに低い傾向があったものの (図 32C)、72 時間後にはコントロール細胞との差が無くなった (データ示さず)。これらの結果は、Arf 欠損細胞で mTORC1 シグナルのわずかな低下が見られるものの、機能的には T 細胞の活性化過程における代謝プログラミングを充足していることを強く示唆する。

mTORC1 シグナルと Arf 経路の関係をより明確にするため、ヘルパー T 細胞の分化プログ

ラムに注目した解析にも取り組んだ。mTORC1 経路の阻害剤であるラパマイシンで処理することで Th17 への分化が抑制される一方、Treg への分化が亢進することが報告されている (56)。また、T 細胞特異的に Raptor (mTORC1 の構成タンパク質) を欠損させたマウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞でも Th17 への分化抑制が認められることから、mTORC1 シグナルは Th17 と Treg の分化バランスに重要であると考えられている (57, 58)。そこで Th17・Treg それぞれの細胞の分化を誘導するサイトカイン存在下に、コントロールならびに Arf1/6-KO マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞の分化を誘導した。Arf1/6 を欠損しても、Th17 誘導条件で出現する IL-17A⁺ 細胞の割合 (コントロール : 28 %、Arf1/6-KO : 37 %) ならびに Treg 誘導条件で出現する Foxp3⁺細胞の割合はコントロール細胞と同程度もしくはそれ以上であり (コントロール : 68 %、Arf1/6-KO : 89 %) (図 32D)、問題なく Th17 や Treg へと分化できることが示された。これらの結果より、Arf 経路は mTORC1 が関与する T 細胞機能に重要でない結論づけた。

2-8. Arf1/6-KO マウスでは大腸粘膜固有層の CD4⁺ T 細胞数が減少している

リンパ球減少下では、恒常性を維持させるために末梢 T 細胞の急激な増殖 (homeostatic proliferation) が誘導される。マウスにおける Homeostatic proliferation の反応は、B 細胞・T 細胞の両方を欠如した Rag2 遺伝子欠損 (Rag2^{-/-}) マウスに少数の CD4⁺ T 細胞を移入することで誘導され、この時、移入する CD4⁺ T 細胞を細胞増殖マーカー (eF450) でラベルしておく、腸内細菌抗原の認識によって誘導される即時性の増殖応答 (fast-dividing) と IL-7 などのサイトカイン環境によって誘導される遅延性の増殖応答 (slow-dividing) の、2 種類の増殖応答が確認できることが知られている (図 33A, 33C) (59)。Rag2^{-/-}マウスにコントロールマウス由来 CD4⁺ T 細胞と Arf1/6-KO マウス由来 CD4⁺ T 細胞を混合した上で移植して homeostatic proliferation を誘導した際 (図 33B)、コントロール細胞と Arf1/6-KO 細胞間で slow-dividing に差は無いにも関わらず、fast-dividing が Arf1/6-KO 細胞でほとんど消失し

ていた（コントロール：18.8 %、Arf1/6-KO：4.77 %）（図 33C）。これは、腸内細菌に対する Arf1/6 欠損細胞の応答が減弱されていることを示唆する。事実、Arf1/6-KO マウスの大腸粘膜固有層（LP）において CD4⁺ T 細胞が著しく減少していた（図 34A）。また、図 28A で用いたマウスにおいて、脾臓 CD4⁺ T 細胞に対する MLN CD4⁺ T 細胞や LP CD4⁺ T 細胞の割合を、コントロールマウス由来 CD4⁺ T 細胞と Arf1/6-KO マウス由来 CD4⁺ T 細胞間で比較したところ、脾臓 CD4⁺ T 細胞に対する LP CD4⁺ T 細胞の割合が Arf1/6-KO マウス由来 CD4⁺ T 細胞で有意に減少していた（図 28C）。この結果は、Arf1/6-KO マウスの LP で観察された CD4⁺ T 細胞の減少は、図 28B で見られたような脾臓における CD4⁺ T 細胞数の低下を単純に反映した結果ではなく、腸管に特徴的な現象であることを示す。

2-9. TCR 刺激下で Arf1/6 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞はアポトーシスが亢進される

Arf1/6-KO マウスの大腸で CD4⁺ T 細胞が減少していたことを受け、Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞は大腸への移動能が低下している、もしくは大腸における CD4⁺ T 細胞の生存・増殖に異常があるという、二つの仮説を立てて検証を行った。定常状態における T 細胞の腸への移動には、CC ケモカイン受容体 CCR9 と $\alpha 4\beta 7$ インテグリンが重要であるため (60, 61)、まず CCR9 の発現解析を試みたが、コントロールマウスの LP 由来 CD4⁺ T 細胞で細胞表面の CCR9 の発現を検出することが出来なかった（データ示さず）。これは、CCR9 と同じ CC ケモカイン受容体である CCR7 で報告されているように、リガンドと結合することで細胞膜から細胞内へと速やかに内在化しているためだと考えられる (62)。一方、 $\alpha 4\beta 7$ の発現レベルは Arf1/6-KO マウスの LP 由来 CD4⁺ T 細胞でむしろわずかに増加していた（図 34B）。インテグリンは単に細胞表面に発現すれば良いというものではなく、リガンドに対する親和性が正しく制御されて初めて接着因子として機能する。リガンドに対するインテグリンの親和性はインサイドアウトシグナルと呼ばれるシグナル伝達経路で調節されており、細胞の接着・伸長・移動にとって極めて重要である (63)。リンパ球では、ICAM-1 リガンドと

インテグリン LFA-1 間の親和性について最も研究が進んでおり、CCL21 に代表されるケモカイン刺激を介したインサイドアウトシグナルによって、ICAM-1 に対する LFA-1 の親和性が低親和性から高親和性へと構造的に変化する (64)。Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞でインテグリンが正常に機能しているか否かを検証するために、CCL21 刺激時の ICAM-1 コートプレートに対する細胞接着面積を比較した結果、コントロール細胞と Arf1/6-KO 細胞で有意な差は認められなかった (データ示さず)。事実、コントロール CD4⁺ T 細胞 (CD45.1⁺) と Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞を 1:1 で混合した上で Rag2^{-/-}マウスに移入した結果、CD45.1⁺細胞と CD45.1⁻細胞が 1:1 の割合を保ちながら大腸へと移動していた (図 34C)。これらの結果により、LP における Arf 欠損 CD4⁺ T 細胞の減少が細胞の移動能低下を反映したものであるとの仮説は否定された。

次に、Arf 欠損が大腸における T 細胞の生存・増殖に影響を与えるという仮説に焦点を当てた解析を行った。大腸粘膜固有層に存在する CD4⁺ T 細胞は腸内細菌に常に曝されており、抗原を認識した TCR が刺激を受け続けることにより活性化状態が維持されている。そこで TCR を介した活性化が Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞の生存・増殖に影響を与える否かを調べた。TCR 複合体を構成する CD3 ϵ と補助刺激受容体 CD28 に対する抗体を用いて *in vitro* で Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞を刺激 (以下、TCR 刺激) した結果、eF450 の蛍光レベルが示す細胞の増殖能にほとんど影響が無いにも関わらず、TCR 刺激の強さに依存して Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞 (CD45.1⁻) の割合が著く減少していたため、Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞は TCR 刺激に伴い細胞死が誘導されることが示唆された (図 35A, 35B)。それに対し、Arf1 もしくは Arf6 の何れか一方のみを欠損した CD4⁺ T 細胞では、TCR 刺激によるこのような細胞減少は認められなかった (図 35C, 35D)。さらに TCR 刺激した Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞では、アポトーシスによって DNA が分解された細胞集団を示す “subG1 細胞” の割合が増加していた (図 35E)。加えて、汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK で Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞を処理すると、8 %だった細胞の割合が 30 %へと増加し、TCR 刺激に伴い誘導される細

細胞死が部分的に回復していた (図 35F)。興味深いことに、Arf1/6 の欠損により誘導される TCR 刺激時のアポトーシス亢進は、ナイーブ CD4⁺ T 細胞でのみ見られ、エフェクターCD4⁺ T 細胞では見られなかった (図 35G)。また、IL-7 によるナイーブ CD4⁺ T 細胞の生存維持にも影響がなかったが (図 35G)、この結果は Arf1/6 を欠損しても homeostatic proliferation の slow-dividing には差がないという図 33C の結果と一致している。これらの結果より、TCR 刺激によって誘導される T 細胞活性化過程において、Arf1 と Arf6 がナイーブ CD4⁺ T 細胞の生存維持に関与することが明らかとなった。

IL-2、IL-4、IL-7、ならびに IL-21 といった共通γ鎖サイトカインは、活性化 T 細胞の生存を促進することが知られている (65)。そこで、次に TCR 刺激時における Arf1/6 欠損ナイーブ T 細胞の生存に共通γ鎖サイトカインが与える影響を調べた。当初の予想に反し、IL-2 や IL-7 は Arf 欠損細胞の生存にほとんど影響を与えなかったが、一方で IL-4 と IL-21 を加えた Arf1/6 欠損細胞では、Z-VAD で処理した時と同程度またはそれ以上まで生存レベルが回復していた (図 35H)。このことから、IL-4 と IL-21 が周囲に存在する環境では、Arf1/6 欠損に伴う細胞死が抑制される可能性が示唆された。

T 細胞におけるアポトーシスの要因には、Fas を始めとする細胞表面受容体を介した外因性のものと (66)、アポトーシス関連因子 Bcl-2 ファミリーのバランスによって制御される内因性のものがある (67-70)。Fas の発現は Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞で正常だったので (データ示さず)、Bcl-2 ファミリーメンバーに焦点を当てた解析に取り組んだ。Bcl-2 ファミリーは、Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 をはじめとするアポトーシス抑制に働くものと、Bim を代表とするアポトーシス誘導に働くものに分類することができる。Arf1/6-KO 細胞では、TCR 刺激時に Bim の発現がコントロール細胞と比較して非常に亢進しており、また IL-21 を加えることによってこの Bim の発現亢進が弱められていた (図 36A, 36B)。Bim は分子量が大きい順に BimEL、BimL、BimS の 3 つのアイソフォームが知られており、中でも BimEL と BimL が T 細胞のアポトーシスに関与することが報告されている (71)。ウエスタンブロッティングを

用いた解析から、Arf 欠損細胞では Bim アイソフォームの中でも、特に BimL の発現が大幅に亢進されていることが明らかとなった (図 36C)。次に、アポトーシス抑制に働く Bcl-2 ファミリーの発現を調べた。Arf1/6-KO 細胞で Bcl-2 の発現がわずかに亢進していたが、IL-21 添加時の Bcl-2 の発現はコントロール細胞と同等であり、この発現の差はアポトーシスの原因とは直接関係ないと結論づけた (図 36A, 36B)。また、Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞では、TCR 刺激時の Mcl-1 の発現が低下し、反対に Bcl-xL の発現はわずかに増加していた (図 36D)。しかし IL-21 添加時の結果では、コントロール細胞・Arf1/6-KO 細胞で共に Bcl-XL の発現低下が認められる一方、Mcl-1 の発現は Arf1/6-KO でコントロール細胞と同程度までに回復しており (図 36D)、これらの結果を考慮すると、Bim の発現上昇と Mcl-1 の発現低下が TCR 刺激時の Arf1/6-KO 細胞におけるアポトーシス亢進の原因であると考えるのが妥当である。Arf 欠損細胞における Bcl-xl の発現上昇のメカニズムや生理的意義の有無については、今後の課題である。

活性酸素種 (ROS) は T 細胞の活性化過程においてアポトーシスを亢進することが知られており (72)、TCR 刺激時に抗酸化物質である N-アセチルシステインを加えることで、Arf1/6-KO 細胞における死細胞 (Annexin V⁺7AAD⁺ 細胞) の割合が有意に低下した (図 37A)。一方で、ROS のレベル自体はコントロール細胞と比較して Arf1/6-KO 細胞で低かったことから (図 37B)、Arf1/6-KO 細胞では ROS を介したアポトーシスに対して感受性が高くなっている可能性が示唆された。

以上の結果をまとめると、Arf1 と Arf6 は TCR 刺激によるナイーブ CD4⁺ T 細胞の生存維持機構において協調的に働いており、Arf1 と Arf6 を同時に欠損させた際には、Bcl-2 ファミリーの発現バランスに異常が生じることと、ROS への感受性が向上することが相まって、TCR 刺激に伴うアポトーシスが亢進するものと考えられる。

2-10. T 細胞における Arf1/6 の欠損は自己免疫疾患の発症を抑制する

Arf 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞における生存維持機構の異常が、腸管の免疫応答に与える影響を直接評価するために、ヒトの潰瘍性大腸炎やクローン病など炎症性腸疾患 (IBD) のマウスモデルとして一般的に使用されている、ナイーブ CD4⁺ T 細胞移入大腸炎モデルを用いた。このモデルでは、Rag2^{-/-}マウスにナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入することで、腸内細菌に反応した T 細胞が大腸粘膜固有層において異常に活性化され、病原性 Th17 細胞へと分化することで、大腸炎の発症が誘導される (図 38) (73)。実際、この実験モデルにおいて、コントロールマウス由来ナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入した Rag2^{-/-}マウスでは、大腸炎の進行を反映するように移入後 2 週間程度で体重が減少し始め、3 週間後には移植前の 80% 程度にまで体重が減少した (図 39A)。対して、Arf1/6 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入した Rag2^{-/-}マウスでは、このような体重減少は認められず (図 39A)、大腸の組織切片からも、組織構造の破壊や細胞浸潤など大腸炎の病理的な特徴は観察されなかったことから (図 39B)、Arf1/6-KO ナイーブ CD4⁺ T 細胞には大腸炎を誘導する能力が無いことが分かった。上述したように、大腸炎発症メカニズムにおいて病原性 Th17 の役割が重要なので、Arf1/6 の欠損によって病原性 Th17 への分化や生存に影響があるか否かを調べた。In vitro で IL-6、IL-23、IL-1β などのサイトカインによってナイーブ CD4⁺ T 細胞から病原性 Th17 へと分化を誘導した結果、病原性 Th17 を示す IL-17A⁺ 細胞の割合はコントロールと比較して Arf 欠損細胞でむしろ増加していた (コントロール: 6.3%、Arf1/6-KO: 14%) (図 39C)。また、in vitro で分化させたコントロール病原性 Th17 と Arf 欠損病原性 Th17 を 1:1 (コントロール: 53%、Arf1/6-KO: 47%) で混合した上で Rag2^{-/-}マウスに移入することで、病原性 Th17 の生存能を比較した。細胞を移入してから 7 日後にレシピエントマウスの大腸を解析したところ、移入時と同様にコントロール細胞と Arf 欠損細胞の割合は 1:1 (コントロール: 54%、Arf1/6-KO: 46%) に保たれていた (図 39D)。加えて、Arf1/6 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入した Rag2^{-/-}レシピエントマウスでは、コントロールナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入した時と比較して、大腸だけではなく脾臓をはじめとする全身の組織で CD4⁺ T 細胞の割合が低

下していた (図 39E)。一方この時、Arf1/6 CD4⁺ T 細胞に占める IL-17A⁺細胞の割合はコントロール CD4⁺ T 細胞に占める割合よりもむしろ 3 倍近く増加していた (図 39F)。さらに、コントロールと Arf1/6 欠損のナイーブ CD4⁺ T 細胞を 1:1 (コントロール:52.7%、Arf1/6-KO:47.3%) で混合して Rag2^{-/-}マウスに移入したところ、移入 5 週間後のレシピエントマウスの大腸では Arf1/6 欠損細胞がほぼ消失し、残存する T 細胞の大部分はコントロール細胞由来であった (コントロール:97.7%、Arf1/6-KO:2.3%) (図 39G)。以上の結果から、Arf1/6-KO マウス由来ナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入した Rag2^{-/-}マウスに大腸炎が発症しなかったのは、病原性 Th17 細胞の分化や生存の異常によるものではなく、病原性 Th17 への分化以前の段階である、ナイーブ CD4⁺ T 細胞活性化過程におけるアポトーシスの亢進に起因することが強く示唆された。

また、大腸炎モデルと同じく、病原性 Th17 を介した自己免疫疾患として知られる多発性硬化症のマウスモデル・実験的自己免疫性脳髄炎 (EAE) でも、Arf1/6-KO マウスにおいてはコントロールマウスで見られるような全身の麻痺症状は認められず、ほぼ完全に病気の発症が抑えられていた (図 39I)。これらの結果は、Arf 経路が Th17 を介した自己免疫疾患の発症に必要であること、そしておそらくその背景には TCR 刺激に伴う T 細胞の生存維持機構への関与が存在することを示唆している。

討論

本章では、第一章で明らかとなった初期胚発生における SMAP1 と SMAP2 の相補性にヒントを得て、高次生命現象における Arf1 と Arf6 の協調作用の有無を調べた。個体における Arf1 と Arf6 の解析を行うために、まず全身で Arf1 を欠損するマウスを樹立し、Arf1 がマウスの胚発生に必須であることを見出した。*In vitro* 培養後の受精後 3.5 日目の *Arf1*^{-/-}胚盤胞の増殖能は野生型と遜色なく、また増殖に伴う核やゴルジ体の形態異常も認められなかった。一方で胚盤胞時期以降の発生途中で異常が生じることから、なぜ Arf1 が着床後には欠かせず、胚盤胞時期ではそうではないのかを今回の実験では明らかにすることはできなかった。今後、*Arf1*-cKO マウスを用いた研究を進めるうちに *Arf1*^{-/-}胚が発生の極めて初期に死亡する原因も特定できる可能性があるかと期待している。過去に報告された Arf1 単独ノックダウンでは異常が見られないという研究結果 (19)と我々の *Arf1*^{-/-}マウスの結果に不一致が生じていることへの説明として 2 つ可能性が考えられる。1 つ目は、HeLa 細胞のようながん細胞由来の培養細胞と胚に存在する正常な細胞との違いである。がん化している HeLa 細胞では、Arf1 の発現が減少しても、何らかの理由で他の Arf が機能を相補できるのに対し、がん化していない正常細胞ではそのような相補機構が機能しないという可能性である。もしかすると、ヒトとマウス間の種の違いがこの差を生んでいるのかもしれない。2 つ目に、ノックダウン細胞に残る少量の Arf1 が HeLa 細胞では通常の機能を果たすには十分な量であった可能性も考えられる。これら仮説の検証には今後のより詳細な解析が求められる。*Arf1*^{-/-}マウスの解析で今回得られた、受精後 3.5 日目までは正常に発生するのに対し、受精後 5.5 日目で異常胚が見られるという結果から、Arf1~5 のうち 2 つ以上の Arf が同様の場所で相補的に働くという従来信じられてきた Arf の一般的な特徴は、全ての局面に当てはまるとは限らず、少なくとも Arf1 は独自の作用機構を時期・組織特異的に持っていることが示唆された。今回樹立に成功した *Arf1*-cKO マウスを用いれば、さまざまな組織特異的な Arf1

の機能明らかにしていけるものと期待している。

Arf1-cKO と *Arf6-cKO* とを交配させることで、*Arf1/6-cKO* マウスを樹立し、さらに T 細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Lck-Cre* マウスと交配させることにより、T 細胞における *Arf1* と *Arf6* の協調作用の有無を調べた結果、*Arf1* と *Arf6* が T 細胞の活性化過程において生存維持機構を制御すること、さらには *Arf1* と *Arf6* を介した生存維持機構が大腸炎や EAE といった自己免疫疾患の発症に必須の役割を果たしていることを示唆する結果を得た。*Arf1* と *Arf6* の協調作用は、免疫系に限らず他の組織においても存在している可能性がある。例えば、*Nestin-Cre* マウスとの交配によって神経幹細胞特異的に *Arf1* を欠損したマウスや *Arf6* を欠損したマウスは、共に脳の神経細胞でミエリン化された神経軸索が減少しているという類似した表現型を示すことが報告されていることから(14, 74)、神経系においても *Arf1* と *Arf6* は同じ小胞輸送経路を制御しているかもしれない。

一方で、当初予想していた結果とは異なり、*Arf* GEF の活性阻害剤 brefeldin A の処理によって見られるような $CD4^+$ T 細胞からのサイトカイン分泌の阻害は、*Arf1* ならびに *Arf6* 両者を欠損した $CD4^+$ T 細胞では認められなかった。Brefeldin A は *Arf* GEF の中でも GBF1、BIG1、BIG2 をターゲットとすることが知られているが、これら GEF は *Arf3* や *Arf5* といった他の *Arf* アイソフォームに対しても作用しうることが明らかとなっている (6)。従って、*Arf1/6* 欠損 T 細胞におけるサイトカイン分泌が他の *Arf* ファミリー分子によって制御されている可能性は十二分にありうる。実際、siRNA を用いて *Arf1*、*Arf3*、*Arf4* もしくは *Arf5* の単独ノックダウンを行っても、何ら異常は観察されないのに対し、siRNA によって 2 種類以上の *Arf* 分子を同時にノックダウンした場合には、小胞輸送のそれぞれ特定の段階において輸送阻害が生じるとの報告がなされている (19)。

Arf1/6-KO 細胞において、TCR 刺激に伴うアポトーシス誘導因子・Bim の発現が亢進する一方、アポトーシス抑制因子・Mcl-1 の発現低下が認められた。別のアポトーシス抑制因子・Bcl-xL については、*Arf1/6* を欠損した時の方がむしろ発現上昇が認められたが、先行

研究において末梢 T 細胞の生存やエフェクター T 細胞の分化過程に Bcl-xL は必要ないと報告されており (75)、活性化過程における Arf1/6-KO ナイーブ CD4⁺ T 細胞のアポトーシス亢進は、Bim と Mcl-1 の発現異常に起因するものと推定された。実際、*N*-アセチルシステイン処理により Arf1/6-KO T 細胞におけるアポトーシスが顕著に抑制されることから、少なくとも部分的には ROS の関与が示唆され、事実、T 細胞における ROS の蓄積は Bim の発現を誘導するという報告もある (76)。一般に、Bim の発現は PI3K/Akt 経路ならびに Ras/Erk 経路によって負に制御されていると考えられている。前者の PI3K/Akt 経路は転写因子 Foxo を介した転写レベルでの Bim の発現制御に関わり、後者の Ras/Erk 経路は Erk を介して Bim の 65 番目のセリン残基をリン酸化することでプロテアソームによる分解を促す (71, 77)。PI3K/Akt 経路は Th17 分化に重要であることが知られているが、Arf1/6 を欠損しても Th17 への分化に影響が無いばかりでなく、PI3K/Akt 経路のターゲットとして良く知られている mTORC1-S6 キナーゼ軸の標的分子・S6 タンパク質のリン酸化状態も Arf1/6-KO 細胞で概ね正常であった。さらに、Arf1/6 を欠損しても Ras/Erk 経路の下流で制御される CD62L や CD69 の発現レベルには影響しないことを確認している (データ示さず)。これらの結果を考慮し、Bim の発現異常は PI3K/Akt 経路もしくは Ras/Erk 経路の異常によるものではないとの結論に至った。

それではどうして小胞輸送制御因子である Arf1・Arf6 を欠損させると、TCR 刺激時に Bim の発現が亢進するのだろうか？小胞輸送は適切な時期に、適切な分子を、適切な場所へと運ぶメカニズムであるため、小胞輸送が Bim の発現を直接制御している可能性と、小胞輸送の異常が間接的に Bim の発現に関わる可能性の両方が考えられる。小胞輸送による直接的な Bim の発現制御の一つは、適切な時期に Bim の分解を誘導することである。細胞質に存在している Bim はミトコンドリアへと輸送され、アポトーシスへと寄与した後、分解されることが知られている。Bim の分解が適切な時期に行わなければ、過剰にアポトーシスを誘導されることが予想されるが、事実、オートファジー関連因子である *BECN-1* 欠損させ

た CD4⁺ T 細胞は TCR 刺激によって Bim の蓄積に伴いアポトーシスが誘導されることが報告されている(78)。Arf1・Arf6 はそれぞれオートファゴソームの形成に関与するという研究報告があるため(79, 80)、Arf1・Arf6 がオートファジーの場を作ることが Bim の分解に直接関与している可能性が考えられる。興味深いことに、BimEL の分解はオートファジー経路と Erk を介したリン酸化によるプロテアソーム依存的分解の両方で制御される一方、BimL は Erk によるリン酸化サイトを持たないため、オートファジー経路にのみ依存した分解を受ける。Arf1/6 欠損 T 細胞において、BimEL よりも BimL の発現が大幅に上昇していたのは、Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞でオートファジーの異常によるものかもしれない。

小胞輸送の異常が間接的に Bim の発現を誘導するメカニズムとしては、小胞体ストレス (ER ストレス) の関与が考えられる。ER ストレスとは、何等かのストレスによって変性したタンパク質や折りたたみ不全なタンパク質が小胞体に蓄積することで、最近の研究報告では Arf 経路が制御する小胞輸送と ER ストレス応答との関係が示されている(81)。持続した ER ストレスが Bim の発現を誘導することを考え合わせると、Arf1/6 欠損 T 細胞におけるアポトーシス亢進の背景に ER ストレスが存在する可能性も想定される。何れにせよ、今回の研究では、活性化過程におけるアポトーシス亢進と Arf1・Arf6 を繋ぐメカニズムの解明にまで至ることが叶わなかった。

Arf1/6-KO マウスでは、Th2 環境下における抗体産生反応が正常に誘導される一方、EAE や大腸炎を含む炎症性疾患への応答はほぼ完全に抑えられていた。また、Th1 免疫応答が重要な役割を果たす寄生虫 *Leishmania major* の感染排除実験において、Arf1/6-KO マウスで *Leishmania major* に対する抗体がコントロールマウスと同程度に産生される一方、感染局所における Th1 の活性化が不十分なため寄生虫の完全な排除に至らないという結果が得られている (データ示さず)。Arf1/6-KO マウスが、抗体産生は正常であるにも関わらず、炎症反応への応答が抑制されるという複雑な表現型を示す理由の一つとして、異なる環境要因を反映している可能性が考えられる。私は、共通γ鎖サイトカインファミリーの一員である

IL-21 と IL-4 が、Arf1/6-KO T 細胞におけるアポトーシスを抑制するとの結果を得ている。二次リンパ組織の GC は抗体産生に重要な場所である。GC では Tfh が大量の IL-21 を産生することにより B 細胞が抗体産生細胞へと分化するのをサポートしており、大腸のような非リンパ組織と比べると、IL-21 が豊富に存在する GC において Arf1/6-KO 細胞は生き延びやすいのかもしれない (図 40)。実際、コントロールマウス由来の骨髄細胞と Arf1/6-KO マウス由来の骨髄細胞を 1:1 で混合して移植した骨髄キメラマウスにおいて、Arf1/6-KO マウス由来の細胞が MLN では維持されているにもかかわらず、大腸では著しく減少していた。

2017 年時点で、世界には約 250 万人の多発性硬化症の患者に加え、クローン病をはじめとした炎症性腸疾患に苦しむ患者が約 680 万人存在する (82)。このような自己免疫疾患に対するアプローチとして、T 細胞や B 細胞など獲得免疫系をターゲットとした免疫抑制剤による治療が主流であるが、免疫抑制剤を用いた治療は、細菌やウイルスに対する抗体応答をも抑制してしまい、日和見感染のリスクが高くなるという問題がある。本研究では、Arf1・Arf6 両者を欠損させることで、EAE や誘導性大腸炎といった病態モデルの発症をほぼ完全に抑えうる一方、少なくとも Th2 環境下において外来抗原に対する抗体応答が正常に起こることを明らかにした。このことは、多発性硬化症や炎症性腸疾患といった自己免疫疾患に対する治療を考える上で、Arf 経路が魅力的な薬剤標的の候補になることを意味している。興味深いことに、ゲノムワイド関連解析データベース (GWAS : <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) において、多発性硬化症の発症と Arf GAP の一種である ASAP1 の遺伝子変異の間に統計学的な関連があることが示されている。加えて、他の ArfGAP である ASAP2 や ArfGEF・Cytohesin 1 はクローン病と潰瘍性大腸炎への関連がそれぞれ示されており、さらに注目すべきは、これら疾患との関連が示されている全ての ArfGEF や ArfGAP が Arf1 ならびに Arf6 の両方に対して作用するという事実である (83)。さらなる解析を通じて、これら GEF や GAP など Arf 経路の上流の制御因子が治療ターゲットとなりうるか検証していきたい。

	+/+	+/-	-/-	Empty	Total
P21	67	80	0	0	147
E12.5	2	5	0	3	10
E3.5	11	22	12	0	45

表 2 *Arf1* ヘテロ欠損マウス同士の交配によって得られた個体の遺伝子型

Arf1 ヘテロ欠損マウスどうしを交配させ、*Arf1* ホモ欠損マウスを作製した。P は生後、E は胎生の日数を表す。(+/+)、(+/-)、(-/-) はそれぞれ遺伝子型が、野生型、*Arf1* ヘテロ欠損型、*Arf1* ホモ欠損型であることを示す。

A

相同性	Arf2	Arf3	Arf4	Arf5	Arf6
Arf1	96%	96%	80%	80%	68%

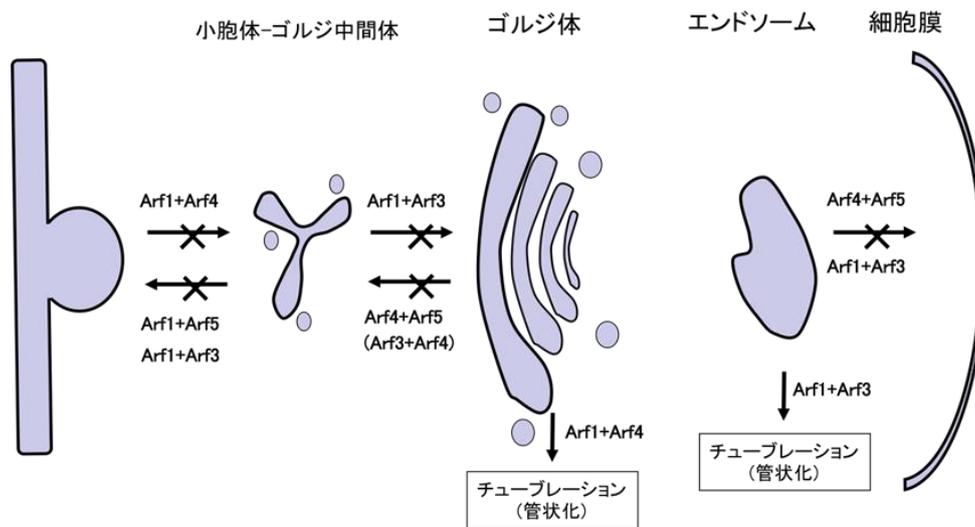
B

図 15 ノックダウン実験からみる小胞輸送における Arfs の影響と相同性

(A) マウスにおける Arf1 と他の Arf とのアミノ酸の相同性。Arf1 と同じクラス I に属する Arf2 と Arf3 は 96 %、クラス II の Arf4,5 との間では 80 %、最も相同性が低いとされる Arf6 でも 68 % という何れも高い相同性を示している。(B) Arf1-5 をダブルノックダウン法で発現率を低下させたときの各々の表現型を表している。Arfs 単独のノックダウンでは特に異常が見られない。例えば Arf1 と Arf4 を同時にノックダウンさせると COPI のリクルートができず小胞体から小胞体-ゴルジ中間体の小胞が形態異常となる。さらにゴルジ体ではシスゴルジの形態維持が正常に行われずチューブレーションを起こす。このように Arf1-5 のダブルノックダウンでは小胞輸送に異常が見られる。(Volpicelli-Daley, et al., 2005 より一部改変)

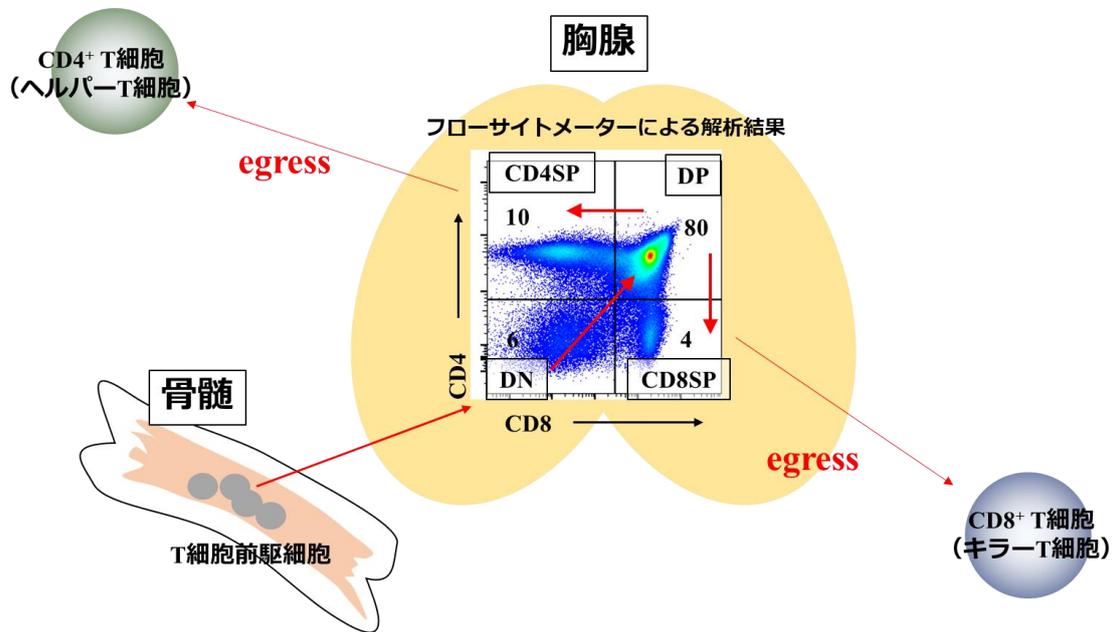


図 16 T 細胞の分化過程

骨髄から胸腺へと移住した T 細胞前駆細胞は、CD4・CD8 の両方を発現する DP 細胞へと分化した後、CD4 のみを発現する CD4SP 細胞または CD8 のみを発現する CD8SP 細胞へと分化する。その後、血流を介して末梢へと出て行き (egress)、CD4⁺ T 細胞 (ヘルパーT 細胞) や CD8⁺ T (キラーT 細胞) 細胞として働く。胸腺における分化過程は、CD4 の発現と CD8 の発現をフローサイトメーターによって解析することで調べることができる。X 軸に CD4 の発現レベル、Y 軸に CD8 の発現レベルを示す。1 つのドットが 1 細胞に対応しており、個々の細胞における CD4 と CD8 の発現レベルを二次元でプロットしたものである。この図で示すように、胸腺細胞は 4 つの細胞集団 (DN、DP、CD4SP、CD8SP) に分けることができる。数字は、胸腺細胞における各細胞集団の割合 (%) を示す。

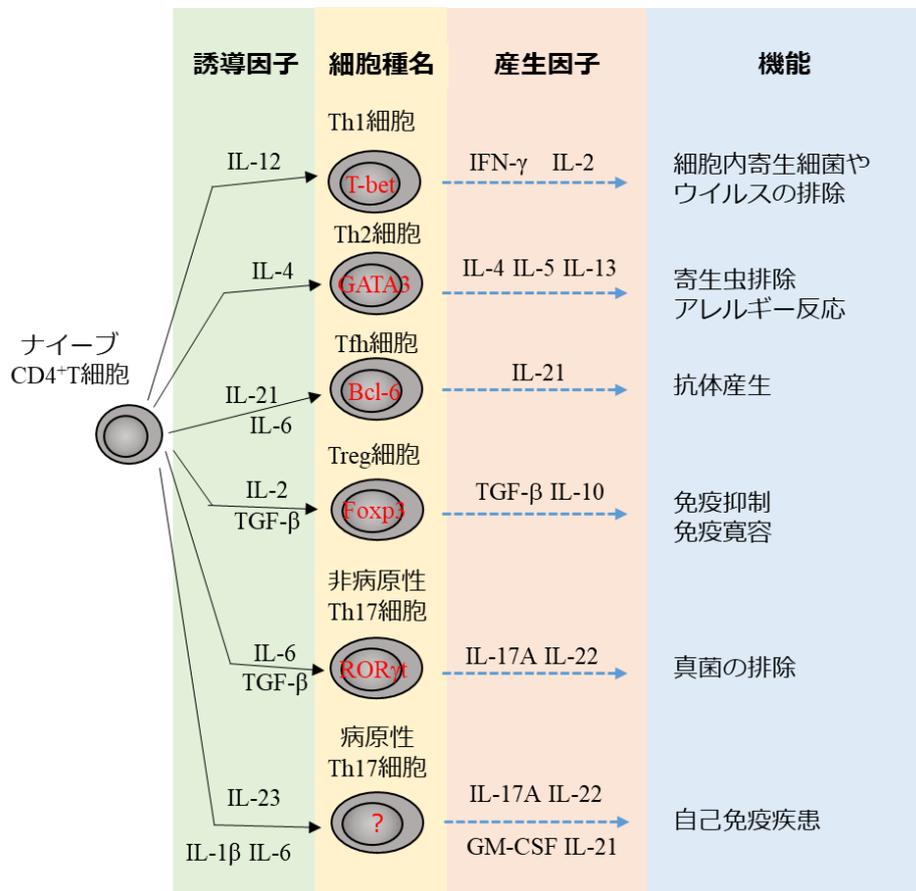


図 17 ナイーブ CD4⁺ T 細胞から各種ヘルパー T 細胞への分化

ナイーブ CD4⁺ T 細胞が活性化すると、周りのサイトカイン環境（誘導因子）によって特定のマスター転写因子（赤文字）の発現が誘導される。それにより特定のヘルパー T 細胞サブセットへと分化し、それぞれのサブセットの機能に特化したサイトカイン（産生因子）を産生するようになる。

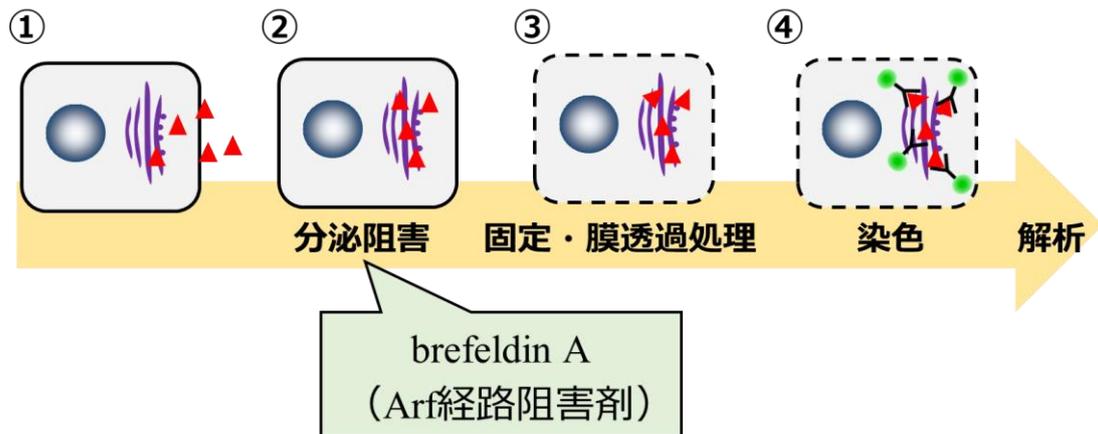


図 18 細胞内サイトカイン染色法のステップと Arf 経路阻害剤 brefeldin A

細胞内サイトカイン染色法とは、細胞内のサイトカインを特異的抗体によって染色する方法である。活性化 T 細胞からのサイトカイン (▲) の分泌を brefeldin A によって阻害し、細胞の固定・膜透過処理後、蛍光標識されたサイトカイン特異的抗体 (●) によって染色する。また、染色した細胞を、フローサイトメーターを用いて解析することで、一細胞当たりのサイトカイン産生能を調べる事が可能となる。

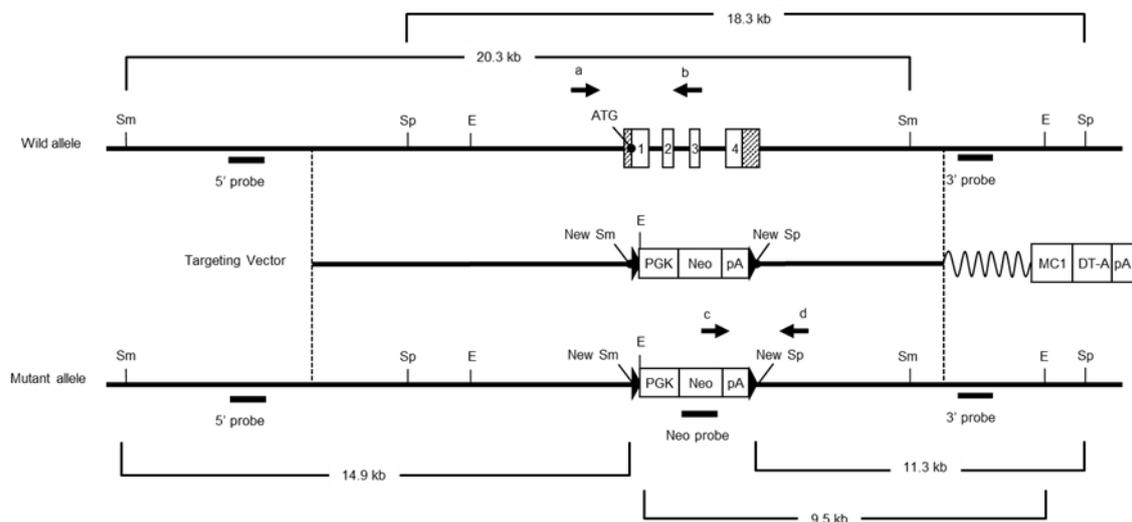


図19 *Arf1*^{-/-}マウス作製の概略図

ノックアウト用プラスミドの Targeting Vector は上流の相同領域 8 kb、*Arf1* の ORF 配列を loxP で挟んだ neo 発現カセット、下流の相同領域 4 kb、DT-A カセットの順で構築した。Sp : SpeI、Sm : SmaI、E : EcoRI、プライマー a : *Arf1*-F2、プライマー b : *Arf1*-R2、プライマー c : neo2、プライマー d : *Arf1* C、PGK : ホスホグリセロキナーゼのプロモーター、Neo : ネオマイシン耐性遺伝子、DT-A : ジフテリアトキシン A 断片。

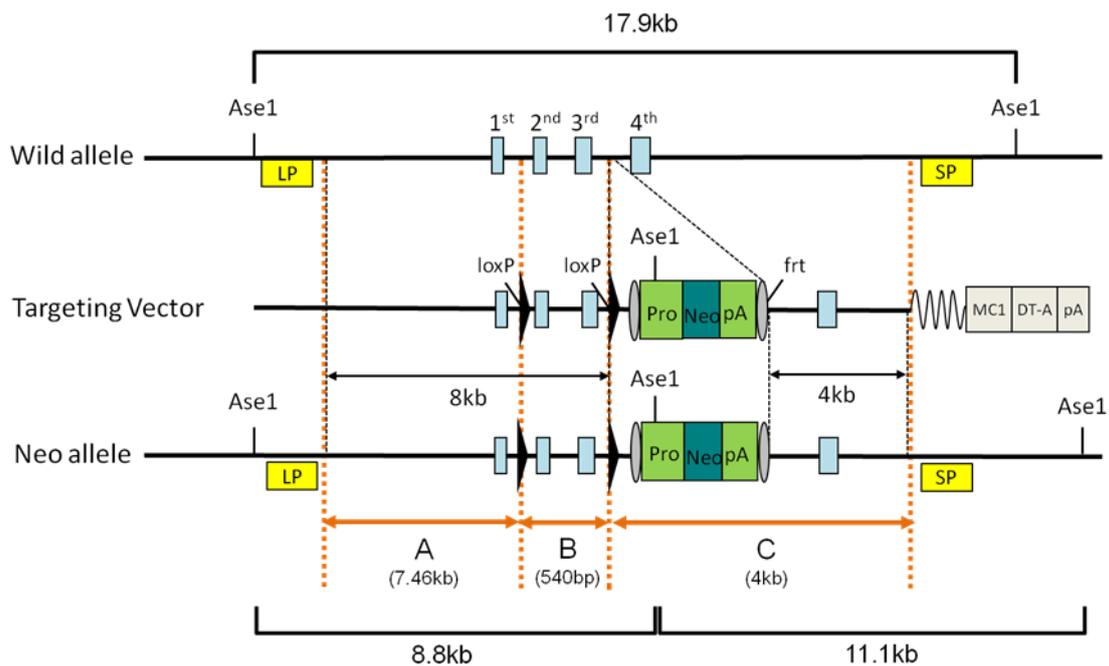


図 20 *Arf1* cKO マウス作製の概略図

exon2 (2nd) と exon3 (3rd) を loxP で挟み、将来的に欠損させる領域とした。コンディショナルノックアウト用プラスミドのターゲティングベクターは上流の相同領域 A 断片 7.46 kb、Cre/loxP システムで欠損するために loxP 配列で挟んだ *Arf1* exon 2, 3 を含む B 断片 540 bp、FLP/frt システムで取り除くことができるよう frt 配列で挟んだ neo 遺伝子発現カセットと下流の相同領域 C 断片 4.0 kb、DT-A カセットの順で構築した。PGK : ホスホグリセロキナーゼのプロモーター、Neo : ネオマイシン耐性遺伝子、DT-A : ジフテリアトキシン A 断片。

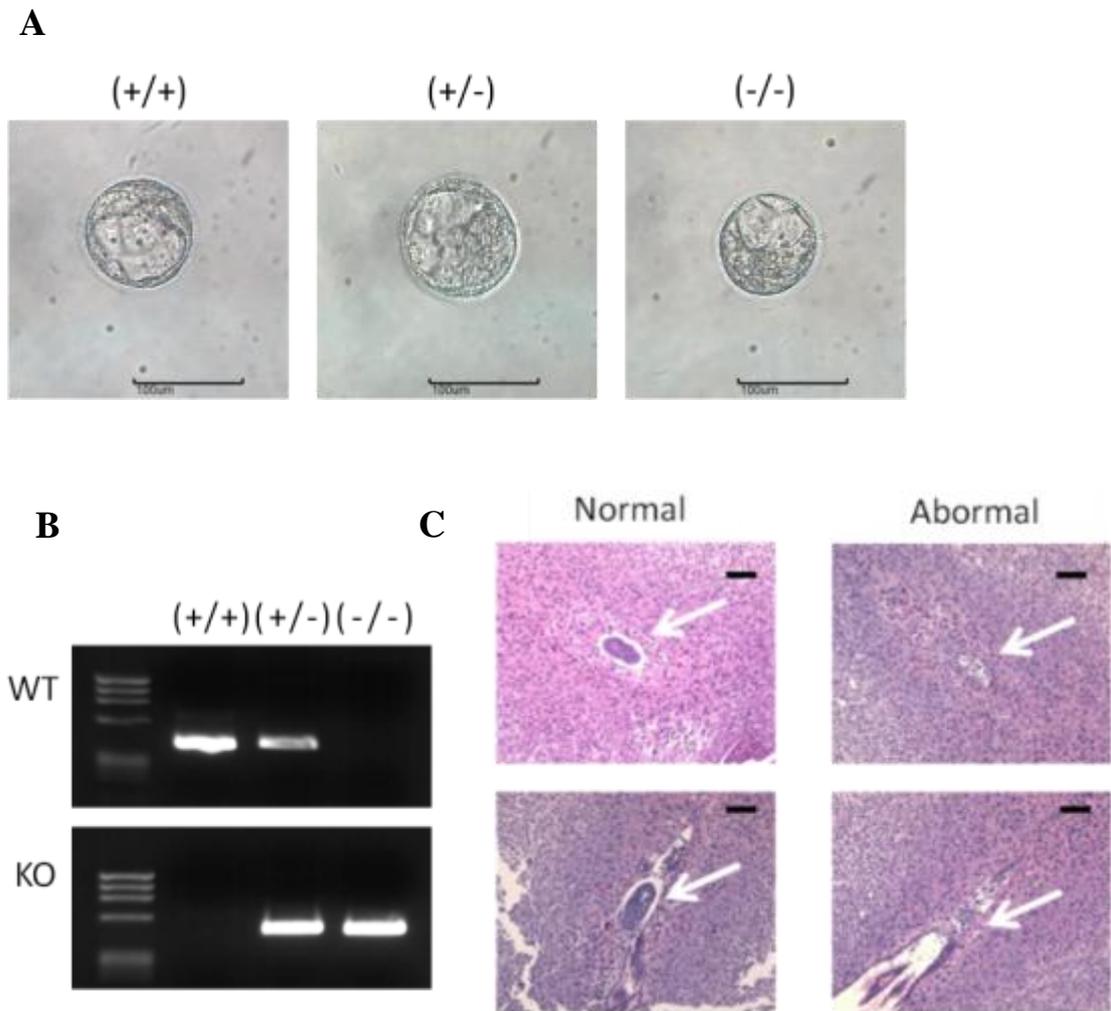


図 21 受精後 3.5 日目の胚盤胞、5.5 日目胚の外観と遺伝子タイピング結果

(A) 採取した受精後 3.5 日目の野生型 (+/+), ヘテロ (+/-), *Arf1* 欠損 (-/-) 胚盤胞。スケールバーは 100 μm。(B) 採取した受精後 3.5 日目の胚盤胞からゲノムを抽出し、遺伝子タイピングした結果。上の写真は野生型アレルを、下の写真は *Arf1* 欠損アレルを検出する PCR の結果。泳動したサンプルは左から ΦX/*Hae* III マーカー、野生型 (+/+), ヘテロ (+/-), *Arf1* 欠損 (-/-) 胚盤胞である。(C) 受精後 5.5 日目の胚の切片をヘマトキシリン・エオジン染色した結果。矢印は胚を示している。スケールバーは 100 μm。

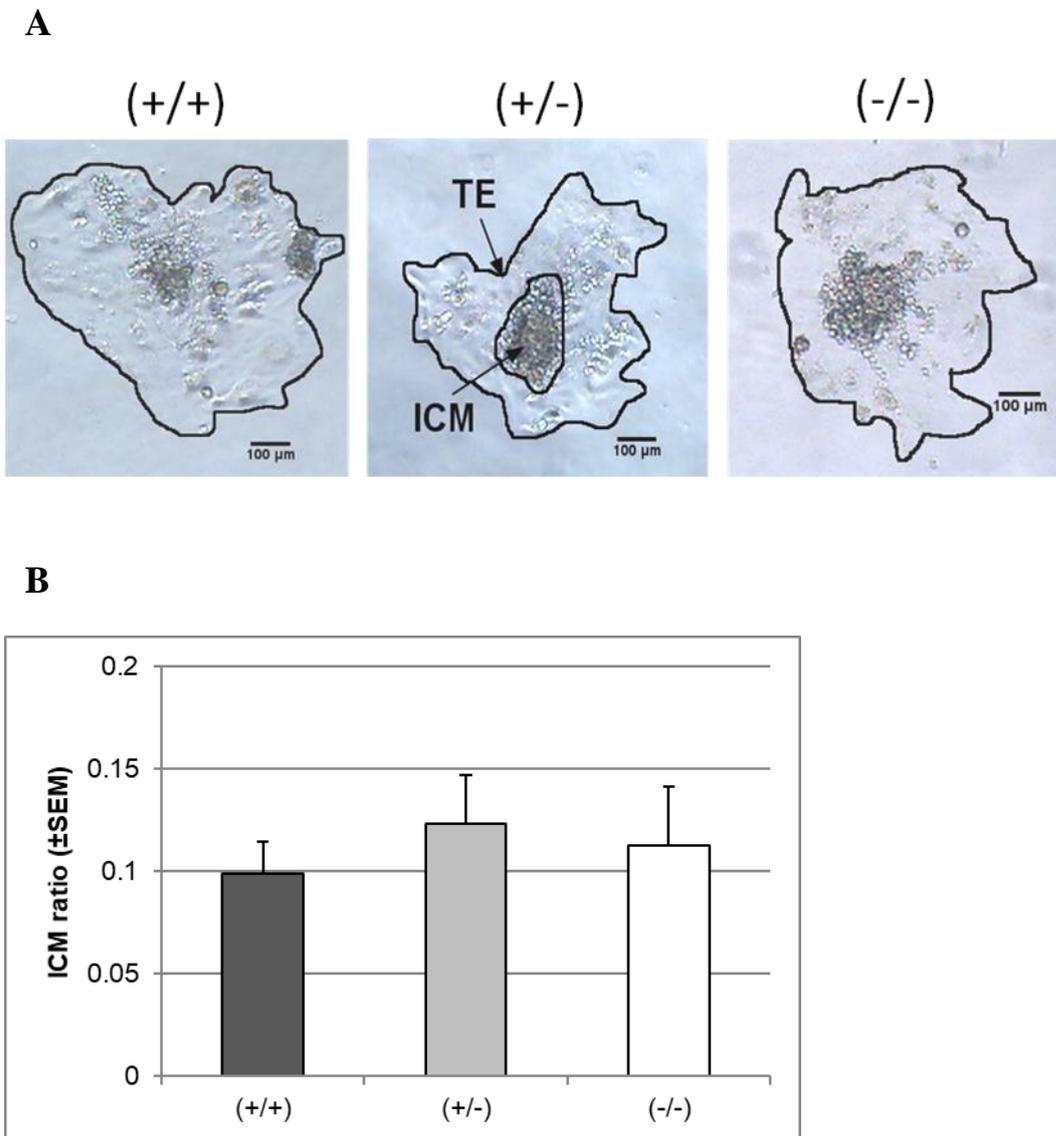


図 22 *In vitro* 培養で *Arf1* 欠損胚盤胞は正常に増殖する

(A) 7 日間の *in vitro* 培養後の野生型 (+/+), ヘテロ (+/-), *Arf1* 欠損 (-/-) 胚盤胞写真。スケールバーは 100 μm 。(B) *In vitro* 培養後の野生型 (+/+), ヘテロ (+/-), *Arf1* 欠損 (-/-) 胚の栄養外胚葉 (TE) 面積に対する内部細胞塊 (ICM) 面積の平均割合。データは野生型 (n=6), ヘテロ型 (n=11), *Arf1* 欠損型 (n=6) より取得し、測定値をグラフに示した (平均値 \pm 標準偏差で表した)。

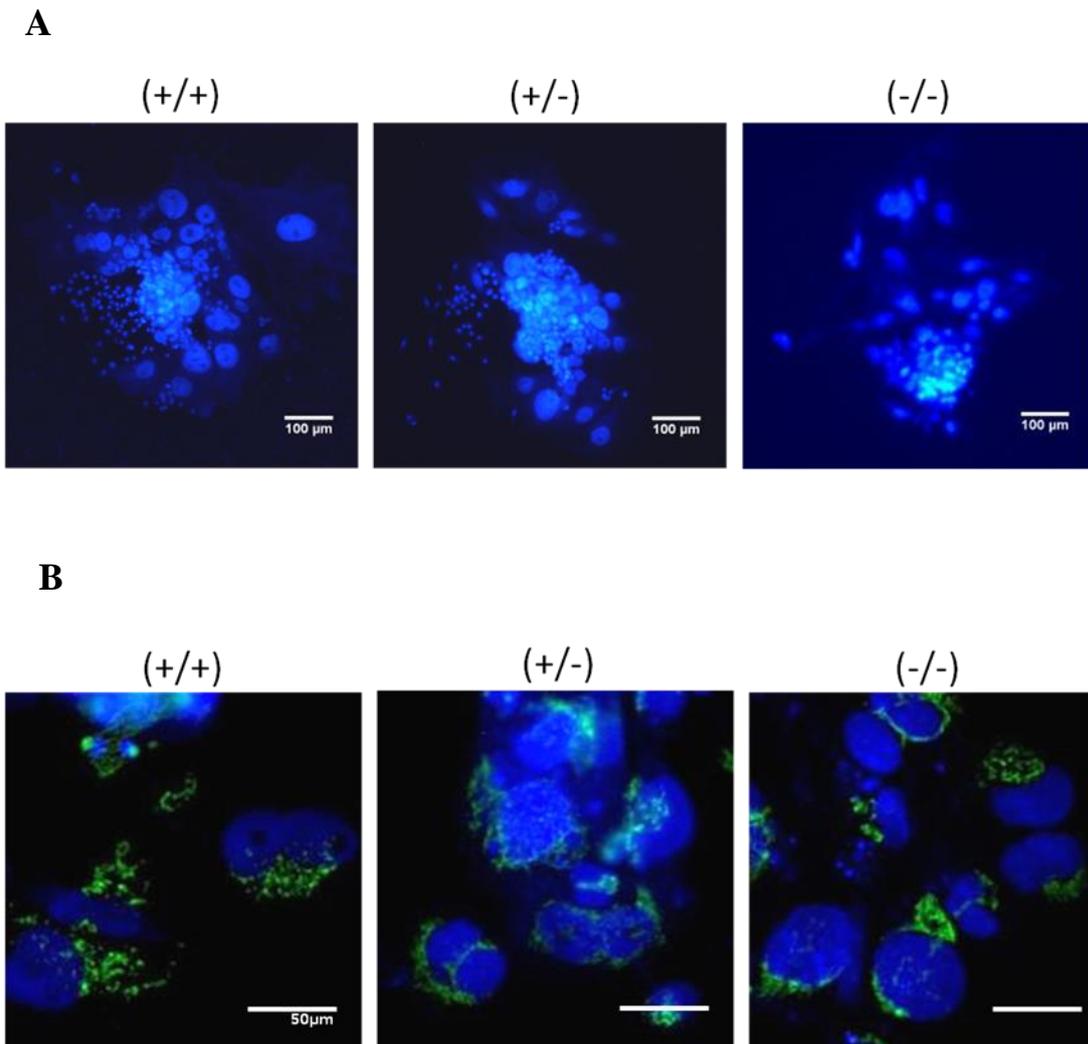


図 23 *In vitro* 培養後の *Arf1* 欠損胚盤胞の核やシスゴルジの形態に異常は見られない

(A) 受精後 3.5 日目の野生型 (+/+)、ヘテロ (+/-)、*Arf1* 欠損 (-/-) 胚盤胞を *in vitro* 培養後、ヘキスト (青) で免疫蛍光染色した結果。スケールバーは 100 μm 。(B) 受精後 3.5 日目の野生型 (+/+)、ヘテロ (+/-)、*Arf1* 欠損 (-/-) 胚盤胞を *in vitro* 培養後、ヘキスト (青) と抗 GM130 抗体 (緑) で免疫蛍光染色した結果。シスゴルジマーカーの抗 GM130 抗体とヘキストの染色イメージを Merge した写真。スケールバーは 50 μm 。

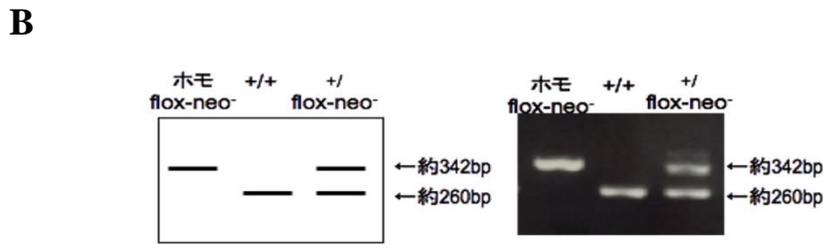
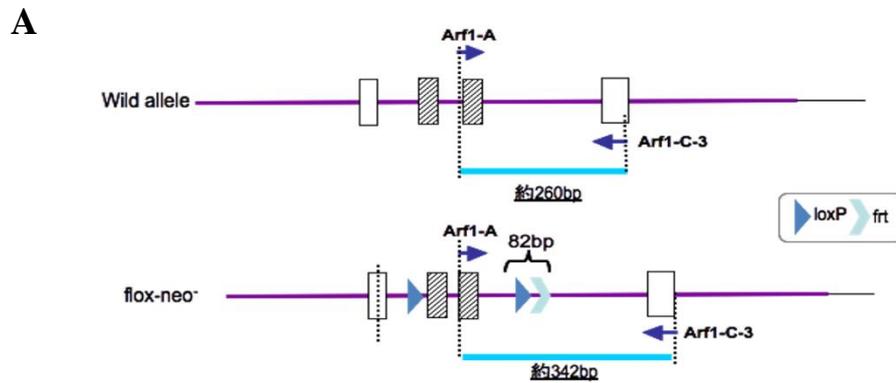


図 24 **flox-neo**型のタイピングのプライマー設定位置と予想バンドとその結果。

(A) Arf1-A と Arf1-C-3 のプライマーはそれぞれ exon 3、exon 4 上に設定した。flox 型の場合、loxP 配列 (34 bp) と neo カセットを欠損させた後に残る frt 配列 (48 bp) 分長い配列になっているために野性型より長いバンドを示す。また neo カセットが外れていない場合は増幅長が 2.2kb となり、この PCR 条件では長すぎるためにバンドが検出されない。(B) 実際のタイピング結果。左側は予想されるバンドパターンの模式図で、右側が実際の実験結果。図中の左端のレーンが neo を持たないホモ floxed 型。真ん中のレーンが野性型、右端側のレーンが neo を持たない floxed と野性型をもつヘテロである。離乳期のマウスにおいて neo を持たないホモ floxed 型の生存を確認することができた。

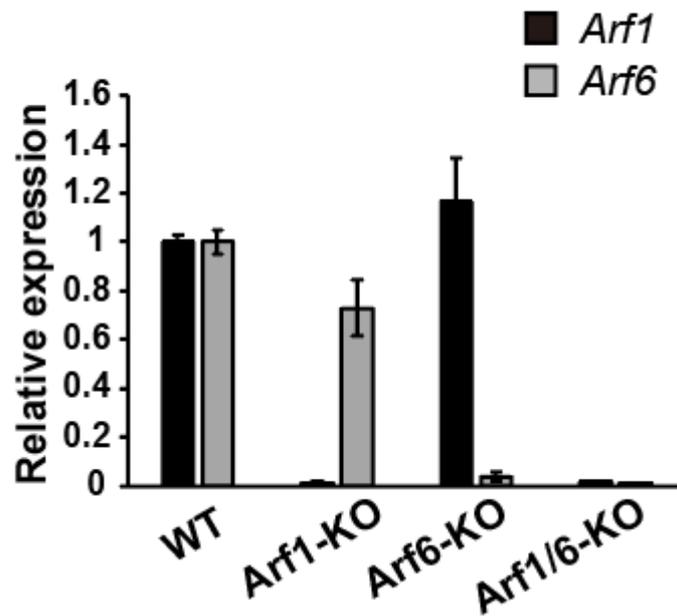


図 25 末梢 T 細胞における *Arf1* と *Arf6* の発現

(A) 野生型マウス (WT)、*Arf1*-KO マウス、*Arf6*-KO マウス、ならびに *Arf1/6*-KO マウス脾臓由来の CD4⁺ T 細胞を対象に、*Arf1* と *Arf6* の発現レベルを qPCR によって定量した。WT マウス由来の細胞における *Cyclophilin A* に対する *Arf1* または *Ar6* の発現レベルを 1 とした時の、各マウス由来細胞における相対的な発現レベルを示す。Mean ± S.D.

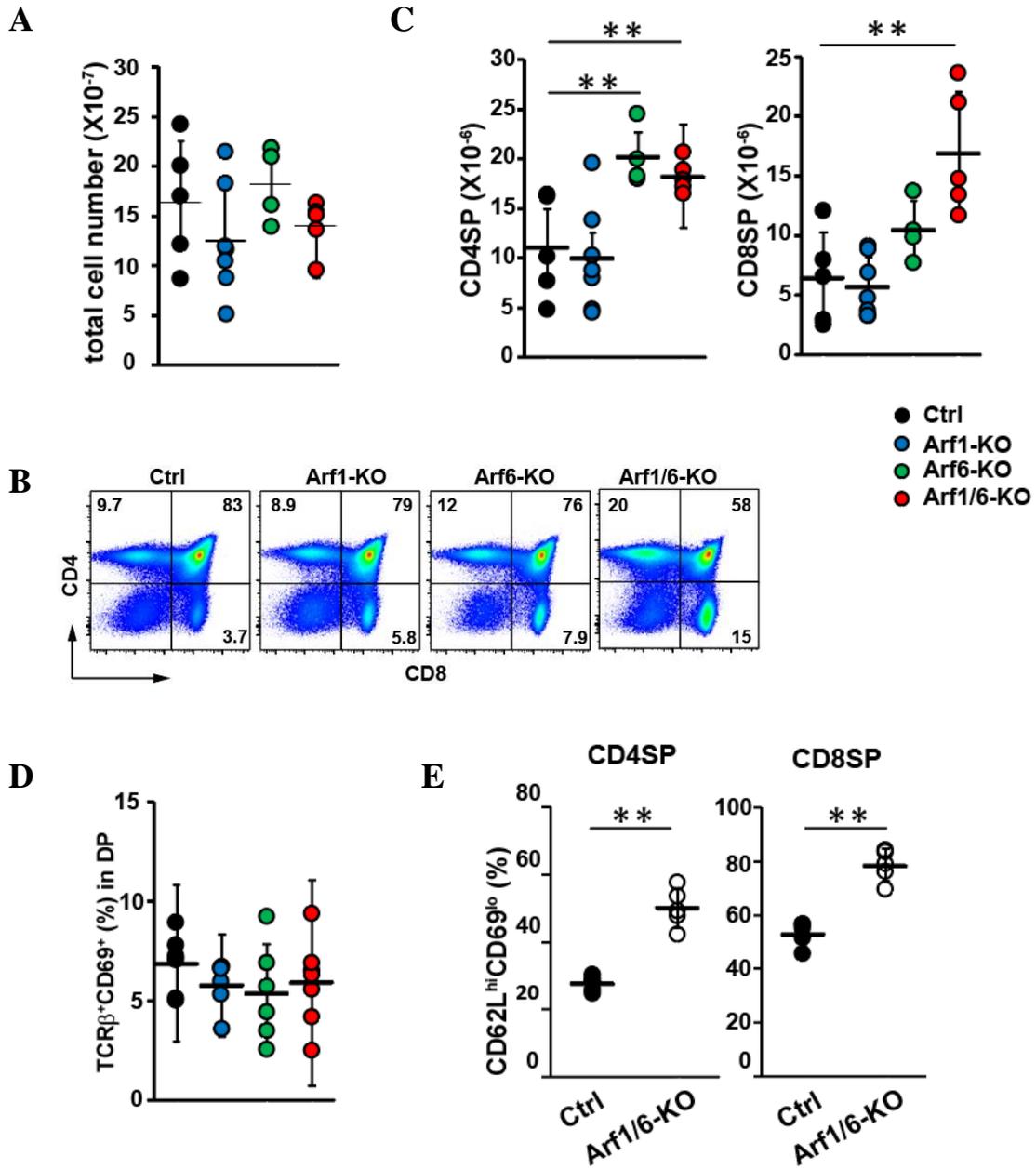


図 26 Arf 欠損マウス由来胸腺の解析結果

(A) 5-7 週齢のコントロールマウス (n=5、黒)、Arf1-KO マウス (n=7、青)、Arf6-KO マウス (n=4、緑)、ならびに Arf1/6-KO マウス (n=5、赤) の胸腺細胞数。(B) (A) で用いた各マウスの胸腺における CD4 と CD8 の発現パターンをフローサイトメトリーによって評価した。代表的なプロットを示した。(C) (A) で用いた各マウスの CD4SP (左) と

CD8SP (右) 胸腺細胞数。Mean \pm S.D. **p<0.01. (D) (A) で用いた各マウスの DP 細胞における TCR β ⁺CD69⁺細胞の割合。Mean \pm S.D. (E) 5-7 週齢のコントロール (Ctrl; n=5) ならびに Arf1/6-KO マウス (n=5) の CD4SP と CD8SP 胸腺細胞における最も成熟した細胞 (CD62L^{hi} CD69^{lo}) の割合。

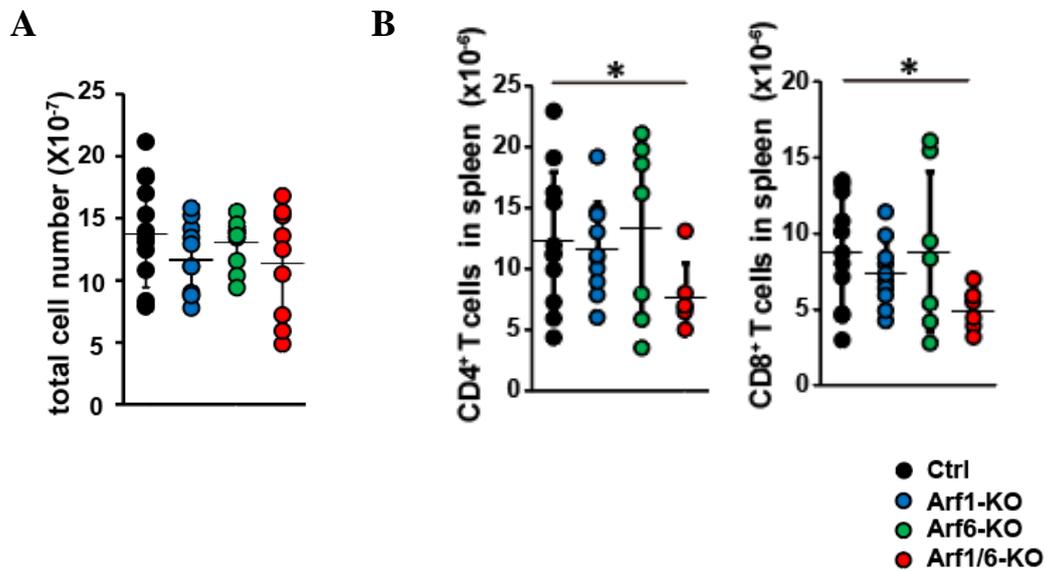


図 27 Arf 欠損マウス由来脾臓の解析結果

(A) 5-7 週齢のコントロールマウス (n=10、黒)、Arf1-KO マウス (n=10、青)、Arf6-KO マウス (n=7、緑)、Arf1/6-KO マウス (n=7、赤) の脾臓細胞数。

(B) (A) で用いた各マウスの脾臓における CD4⁺ T 細胞数 (左) と CD8⁺ T 細胞数 (右) を示す。Mean \pm S.D. *p<0.05.

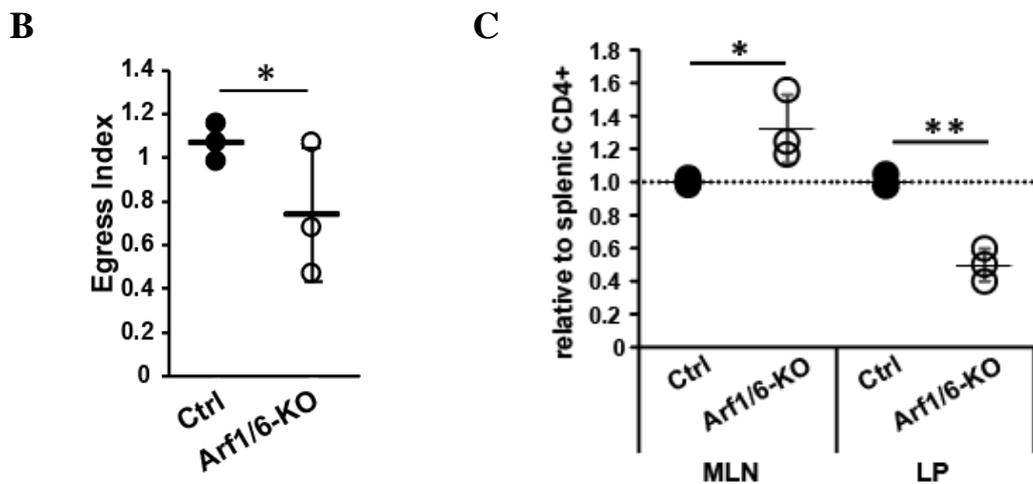
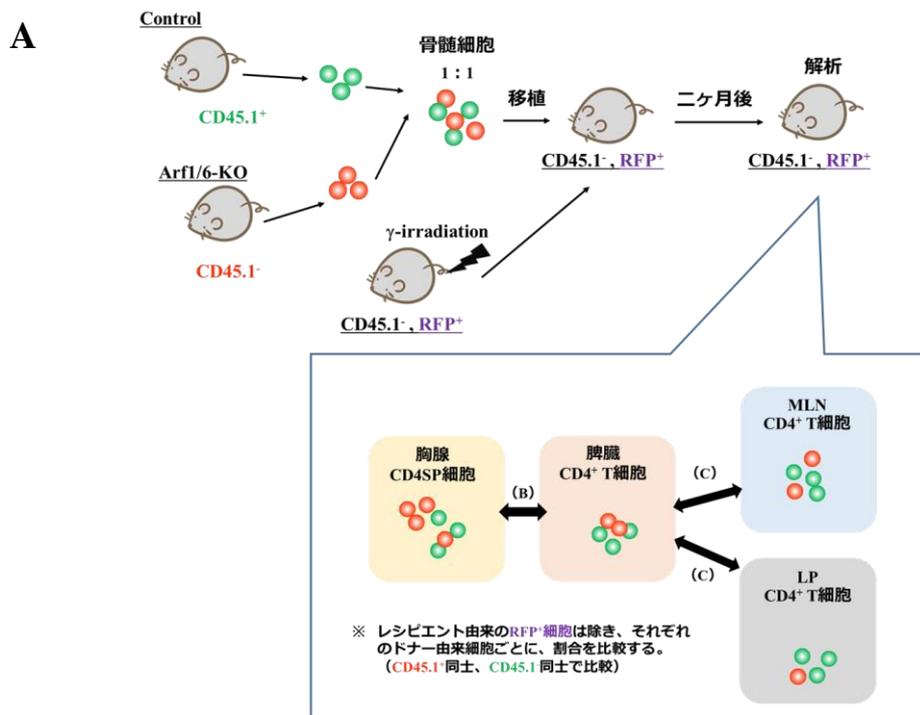


図 28 骨髄キメラマウスの解析

コントロール (CD45.1⁺) と Arf1/6-KO マウス (CD45.1⁻) の骨髄細胞を 1:1 で混合し、致死量未満の γ 線を照射した RFP⁺レシピエントマウスへ移植し、二ヶ月後にレシピエントマウスの解析を行った。(A) 実験概要図 (B) レシピエントマウスの胸腺 CD4SP 細胞に対する脾臓 CD4⁺ T 細胞の割合を「egress index」としてコントロール (CD45.1⁺) 細胞と Arf1/6-KO

(CD45.1⁻) 細胞それぞれで評価した。Mean ± S.D. *p < 0.05 (Mann-Whitney の U 検定) . (C)
レシピエントマウスの脾臓 CD4⁺ T 細胞に対する腸間膜リンパ節 (MLN) CD4⁺ T 細胞なら
びに大腸粘膜固有層 (LP) CD4⁺ T 細胞の割合を、コントロール (CD45.1⁺) 細胞と Arf1/6-KO
(CD45.1⁻) 細胞それぞれで求めた。コントロール (CD45.1⁺) 細胞における脾臓に対する
MLN または LP の値を 1 とした時の値を示す。Mean ± S.D. *p < 0.05, **p < 0.01.

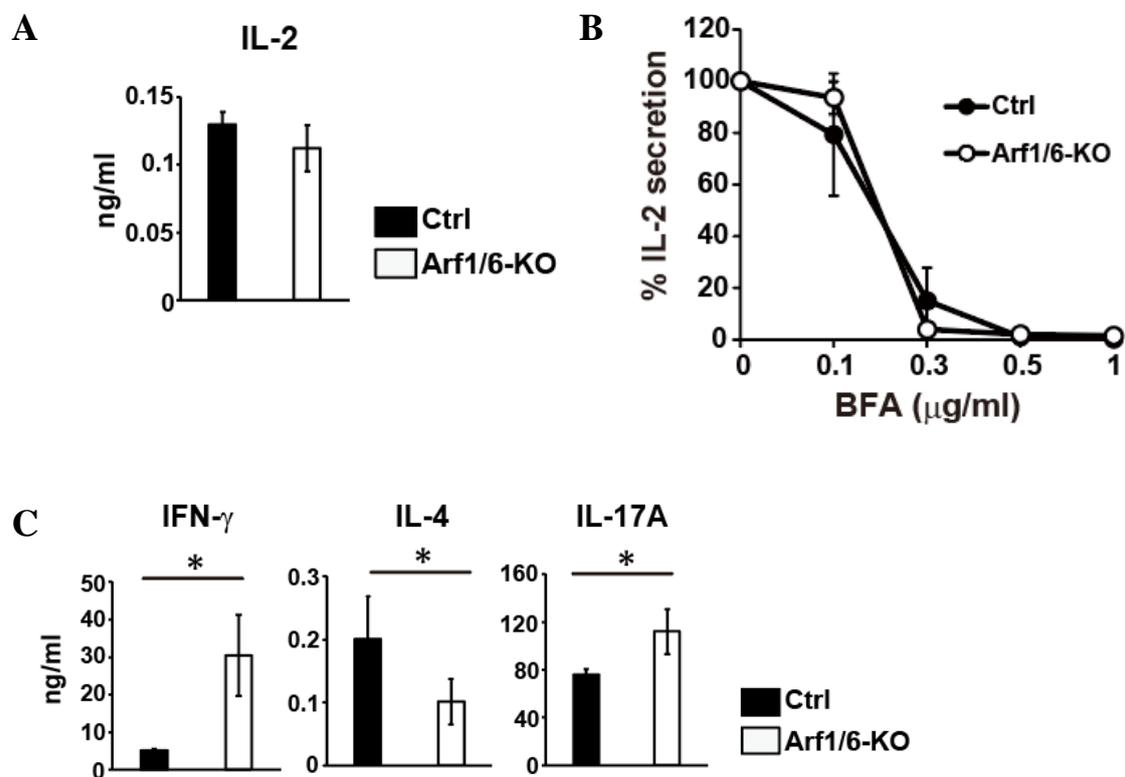


図 29 Arf1/6-KO マウス由来 CD4⁺ T 細胞のサイトカインの分泌能

(A) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体で刺激した後、24 時間後に培養上清を回収し IL-2 分泌量を ELISA 法によって評価した。Mean \pm S.D. (B) コントロール (Ctrl; n=4) ならびに Arf1/6-KO マウス (n=4) 由来の CD4⁺ T 細胞を、0-1 μ g/ml BFA 存在下に抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体によって 24 時間刺激した。培養上清中の IL-2 の濃度を ELISA 法によって評価し、BFA 非存在下に分泌された IL-2 量を 100% として示した。(C) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を Th1、Th2、Th17 それぞれに分化誘導後、細胞数を揃えた上で刺激し、ELISA 法によって Th1 における IFN- γ 、Th2 における IL-4、Th17 における IL-17A の分泌量を測定した。Mean \pm S.D. *p<0.05.

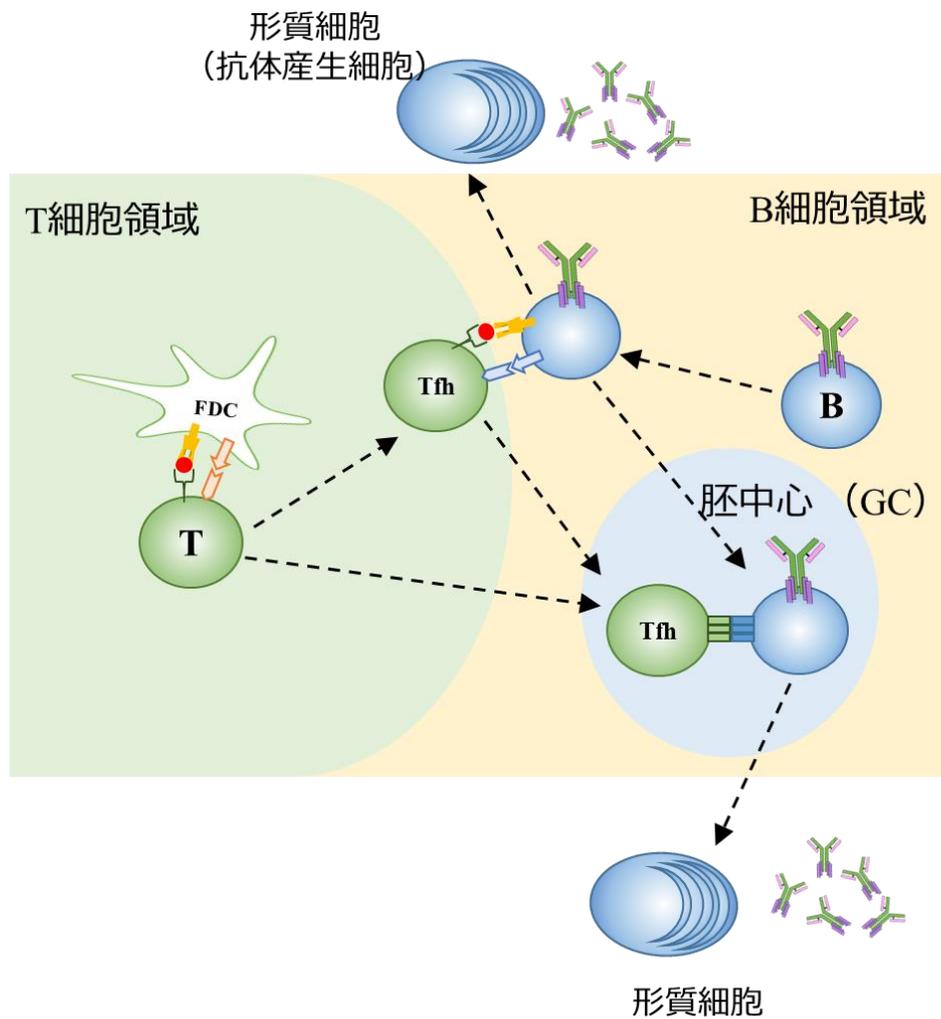


図 30 二次リンパ組織における形質細胞の分化過程

脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織には、T細胞の多い領域（T細胞領域：緑）とB細胞が多い領域（B細胞領域：黄色）があり、T細胞領域でナイーブT細胞が抗原提示をした樹状細胞により活性化されると、ヘルパーT細胞へと分化が誘導される。それと同時に活性化T細胞はT細胞領域とB細胞領域の境界（T-B境界）へと遊走し、同一の抗原によって活性化されたB細胞と出会い相互作用を起こす。この相互作用によりT細胞、B細胞は共にさらに活性化され、活性化された一部のB細胞は胚中心（GC:青）へ移動し濾胞T細胞（Tfh）の助けを受けて高親和性の抗体を大量に産生することができる形質細胞へと分化する。

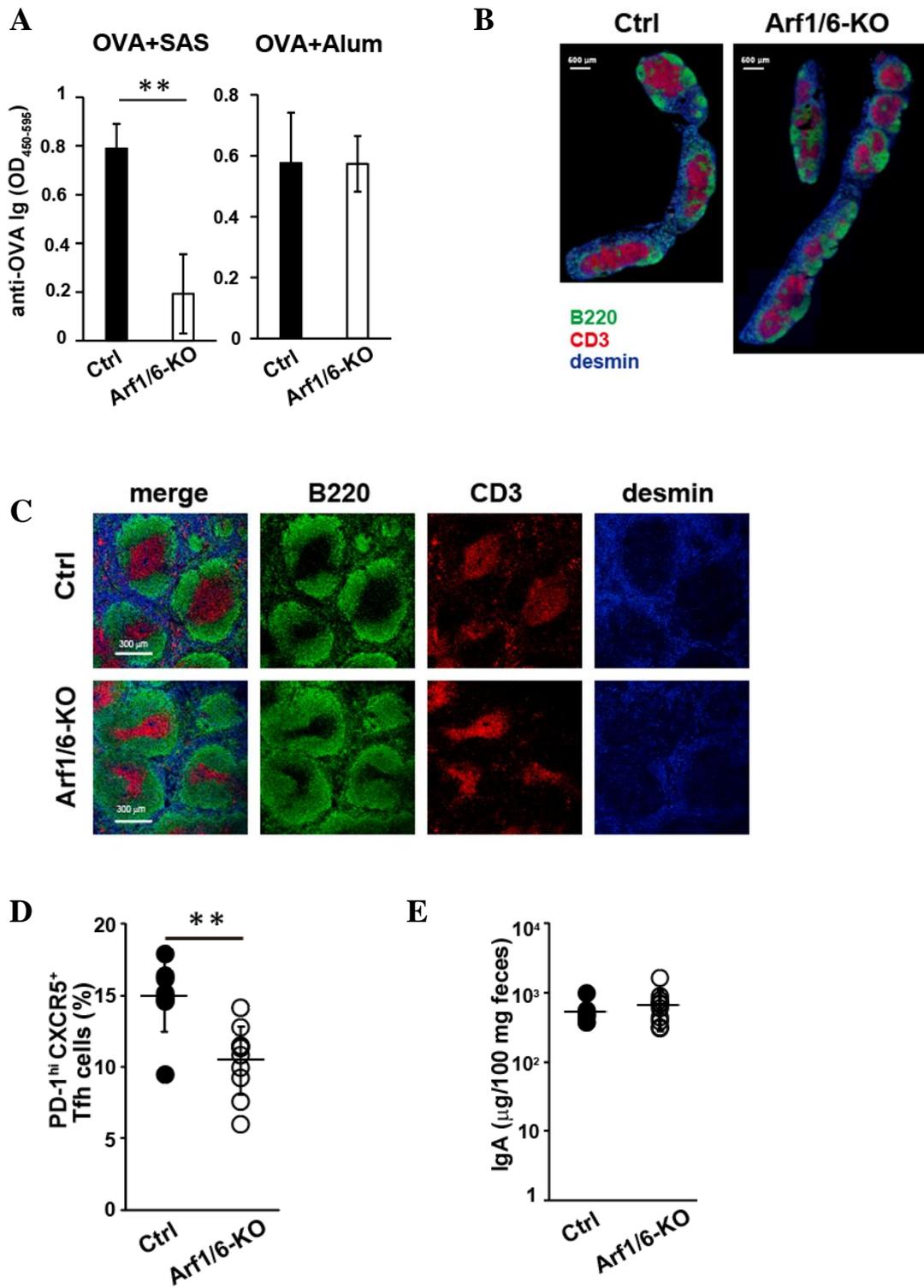


図 31 Arf1/6-KO マウスにおける抗体応答

(A) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウスの腹腔に卵白アルブミン (OVA) と

シグマアジュバントシステム(SAS)もしくは Alum アジュバントを混合したものを投与し、免疫反応を誘導した。ELISA 法によって、マウス血清中の OVA 特異的抗体価を評価した。Mean \pm S.D. ** $p < 0.01$. (B) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス脾臓切片の免疫組織染色像。緑の蛍光は B 細胞マーカーである B220 を、赤の蛍光は T 細胞マーカーである CD3 を、また青の蛍光は desmin の発現を示す。スケールバーは 300 μm 。(C) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス腸間膜リンパ節切片の免疫組織染色像。(B) と同様の抗体によって染色を行った。スケールバーは 500 μm 。(D) 9-10 週齢のコントロール (Ctrl; $n=9$) ならびに Arf1/6-KO マウスのパイエル板における Tfh (PD-1^{hi}CXCR5⁺) 細胞の割合。Mean \pm S.D. ** $p < 0.01$. (E) 9-10 週齢のコントロール (Ctrl; $n=9$) ならびに Arf1/6-KO マウス ($n=10$) 由来の糞便中 IgA 抗体価を ELISA 法によって測定した。

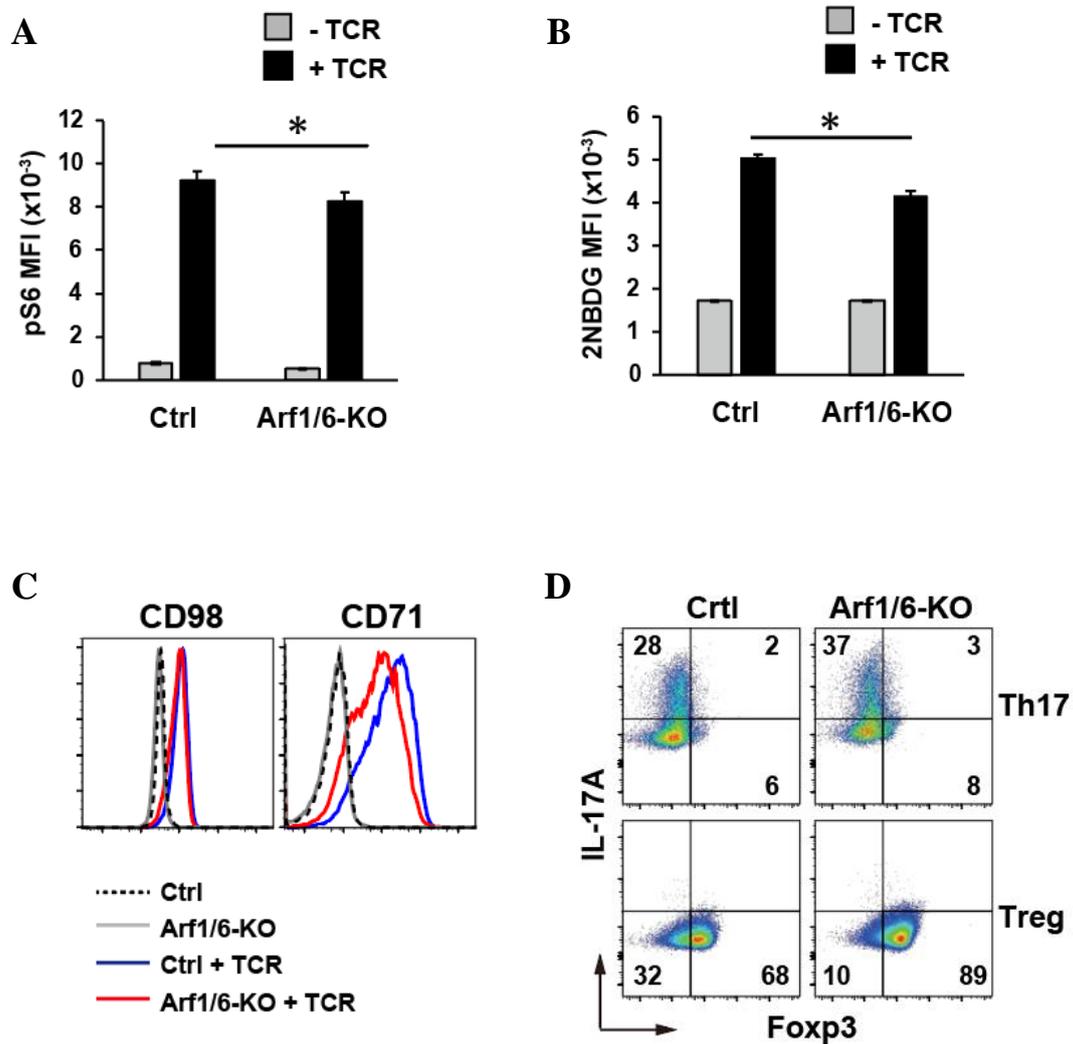
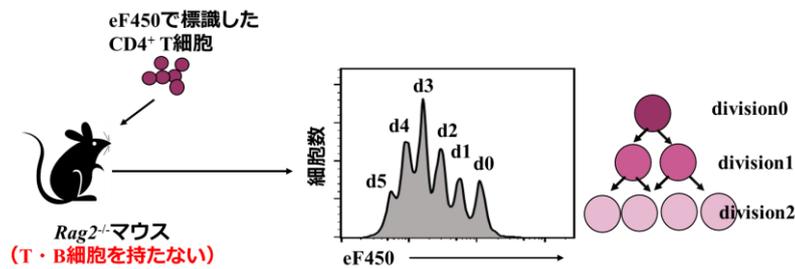
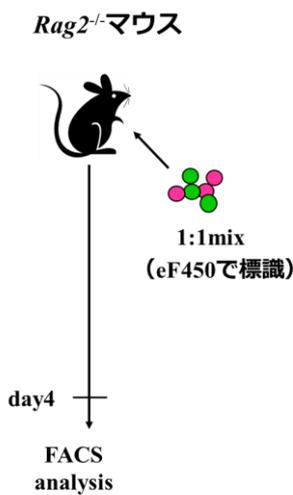
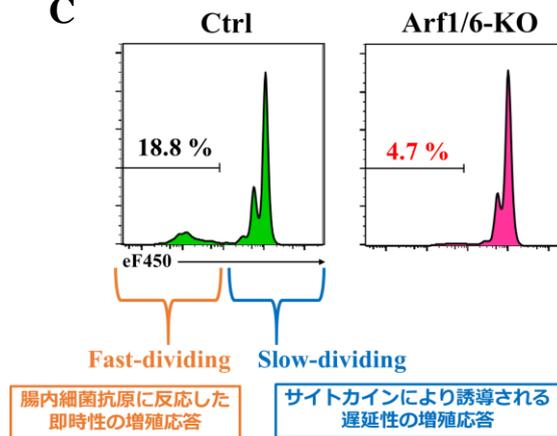


図 32 Arf1/6 欠損細胞における mTORC1 シグナル

(A) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス脾臓 CD4⁺ T 細胞を、抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 による TCR 刺激有無の条件下で 24 時間培養後、細胞内染色法により pS6 を染色し、フローサイトメトリーによって発現を評価した。縦軸は平均蛍光強度 (MFI) を示す。Mean \pm S.D. * $p < 0.05$. (B) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス脾臓 CD4⁺ T 細胞を、抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体による TCR 刺激有無の条件下で 2-NBDG (蛍光性グルコースアナログ) と 24 時間共培養し、2-NBDG の細胞内取り込み量をフローサイトメトリーによって評価した。Mean \pm S.D. * $p < 0.05$. (C) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス脾

臓 CD4⁺ T 細胞を、抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体による TCR 刺激有無の条件下で 24 時間培養後、細胞表面の CD98 と CD71 の発現レベルをフローサイトメトリーによって評価した。

(D) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス脾臓 CD4⁺ T 細胞を Th17 または Treg の誘導条件下で細胞を培養した後、細胞内染色法により IL-17A と Foxp3 を染色しフローサイトメトリーによって発現を評価した。同様の実験を独立して 3 回行い、うち代表的なデータを示した。

A**B****C****図 33 Homeostatic proliferation**

(A) Homeostatic proliferation の反応はリンパ球を持たない *Rag2*^{-/-}マウスに、 1×10^6 程度の CD4⁺ T 細胞を移入することで誘導される。また、移入する細胞を蛍光色素 eF450 で染色しておく、1回の細胞分裂で娘細胞は親細胞のおよそ半分の蛍光色素を受け取ることから、フローサイトメーターによる eF450 の蛍光レベルを検出することで、細胞の分裂回数、すなわち増殖能を調べることが可能となる。(B, C) eF450 で蛍光標識したコントロール (Ctrl; CD45.1⁺) と *Arf1/6*-KO (CD45.1⁻) マウス由来の CD4⁺ T 細胞を混合し、*Rag2*^{-/-}マウス (n=3)

へ移入した。4日後にフローサイトメトリーにより eF450 の蛍光強度を測定し、細胞分裂を評価した。 (B) 実験概要図 (C) 実験結果

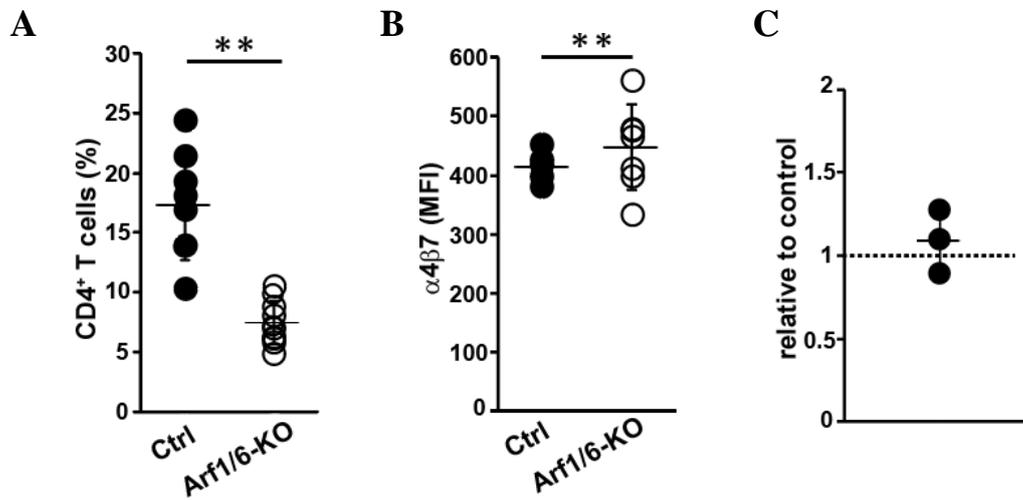


図 34 大腸 LP において Arf1/6 欠損 CD4⁺ T 細胞が減少している

(A) コントロール (Ctrl; n=8) ならびに Arf1/6-KO マウス (n=10) 由来の大腸粘膜固有層における CD4⁺ T 細胞の割合。(B) コントロール (Ctrl; n=5) ならびに Arf1/6-KO マウス (n=7) 由来大腸粘膜固有層 CD4⁺ T 細胞における $\alpha 4\beta 7$ の発現レベルを示す。各シンボルは、それぞれの個体を表す。Mean \pm S.D. **p < 0.01. (C) コントロール (CD45.1⁺) と Arf1/6-KO マウス (CD45.1⁻) 由来 CD4⁺ T 細胞を 1:1 で混合し、Rag2^{-/-}マウス (n=3) に移入した。24 時間後に、Rag2^{-/-}マウスの大腸粘膜固有層におけるコントロール細胞と Arf1/6-KO 細胞の割合をフローサイトメトリーによって評価した。

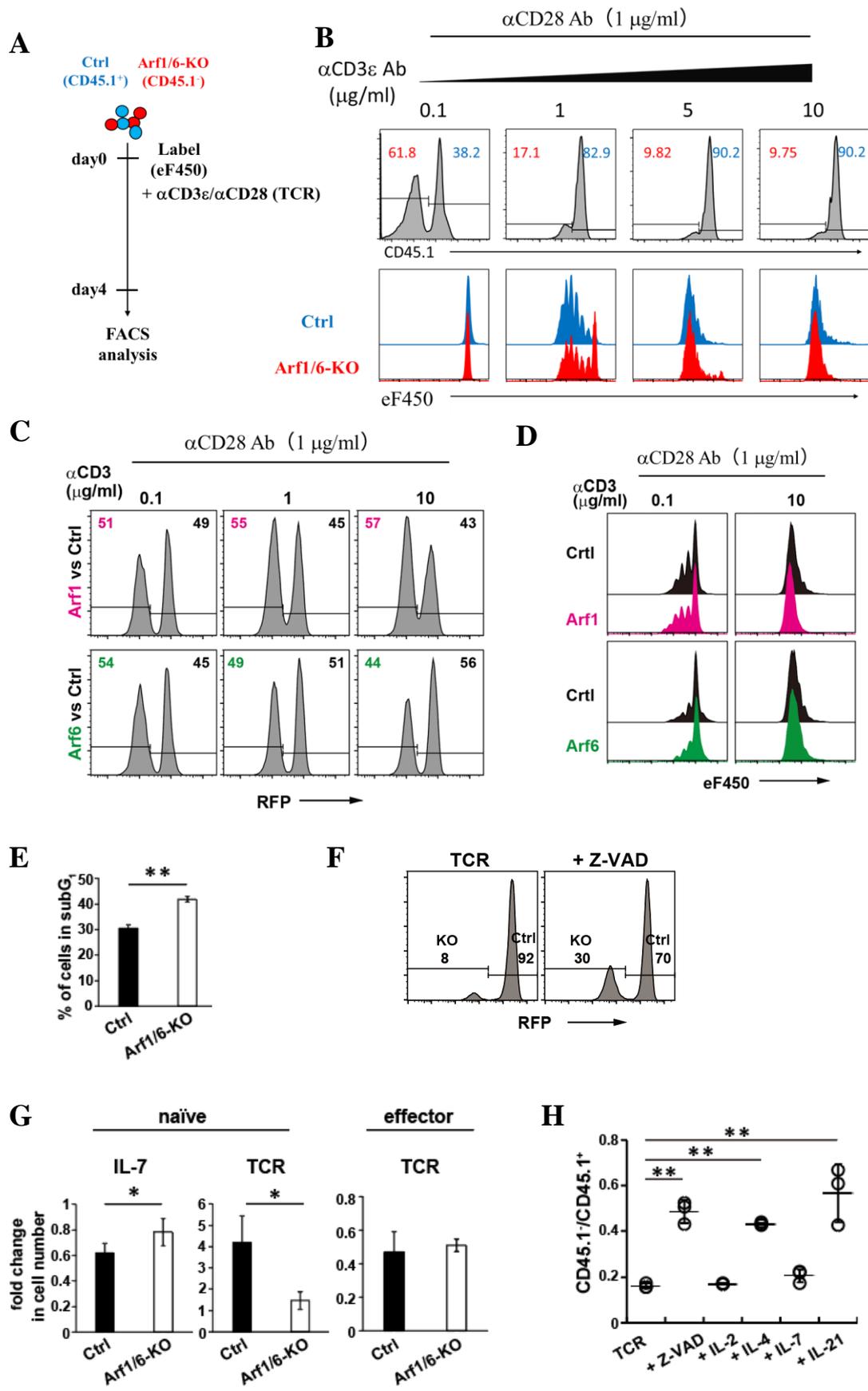


図 35 Arf1/6 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞は TCR 刺激依存的にアポトーシスが誘導される

(A, B) コントロール (Ctrl; CD45.1⁺) と Arf1/6-KO (CD45.1⁻) マウス由来の CD4⁺ T 細胞を 1:1 で混合し、0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の抗 CD3 ϵ 抗体と 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 CD28 抗体で 4 日間刺激した。その後、フローサイトメトリーによって CD45.1⁺細胞と CD45.1⁻細胞の割合を評価した。実験概要図 (A)。また、各細胞における eF450 の蛍光強度を測定し、細胞分裂を評価した (上: CD45.1⁺細胞、下: CD45.1⁻細胞) (B)。同様の実験を独立して 3 回行い、うち代表的なデータを示した。(C, D) コントロール (Ctrl; CD45.1⁺) と Arf1-KO (CD45.1⁻) もしくは Arf6-KO (CD45.1⁻) マウス由来の CD4⁺ T 細胞を 1:1 で混合し、0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の抗 CD3 ϵ 抗体と 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 CD28 抗体で 3 日間刺激した。その後、フローサイトメトリーによって、CD45.1⁺細胞と CD45.1⁻細胞の割合を評価した (上: Ctrl vs Arf1-KO、下: Ctrl vs Arf6-KO) (C)。また、各細胞における eF450 の蛍光強度を測定し、細胞分裂を評価した (上: Ctrl vs Arf1-KO、下: Ctrl vs Arf6-KO) (D)。同様の実験を独立して 3 回行い、うち代表的なデータを示した。(E) コントロール (Ctrl; n=3) ならびに Arf1/6-KO (n=3) マウス由来の CD4⁺ T 細胞を抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体によって 4 日間刺激 (TCR) し、各細胞における subG1 細胞の割合をフローサイトメトリーによって評価した。Mean \pm S.D. **p< 0.01. (F) コントロール (RFP⁺) と Arf1/6-KO (RFP⁻) マウス由来ナイーブ CD4⁺ T 細胞を 1:1 で混合し、50 μM の Z-VAD-FMK 存在下・非存在下に抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体によって 4 日間刺激 (TCR) した。その後、フローサイトメトリーによって CD45.1⁺細胞と CD45.1⁻細胞の割合をフローサイトメトリーによって評価した。(G) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス脾臓からそれぞれナイーブまたはエフェクター CD4⁺ T 細胞を単離し、IL-7 もしくは抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体による刺激 (TCR) 存在下に 72 時間培養した。グラフは、培養前の細胞数に対する 72 時間後の細胞数の倍率変化を示す。Mean \pm S.D. *p< 0.05. (H) コントロール (Ctrl; CD45.1⁺) と Arf1/6-KO (CD45.1⁻) マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を 1:1 で混合した上で、抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体によって単独刺激 (TCR)、もしくはグラフ

横軸に示す各試薬共存下で刺激し、4日間培養した。その後、フローサイトメトリーによって CD45.1⁺細胞と CD45.1⁻細胞の割合を評価した。Mean ± S.D. **p<0.01.

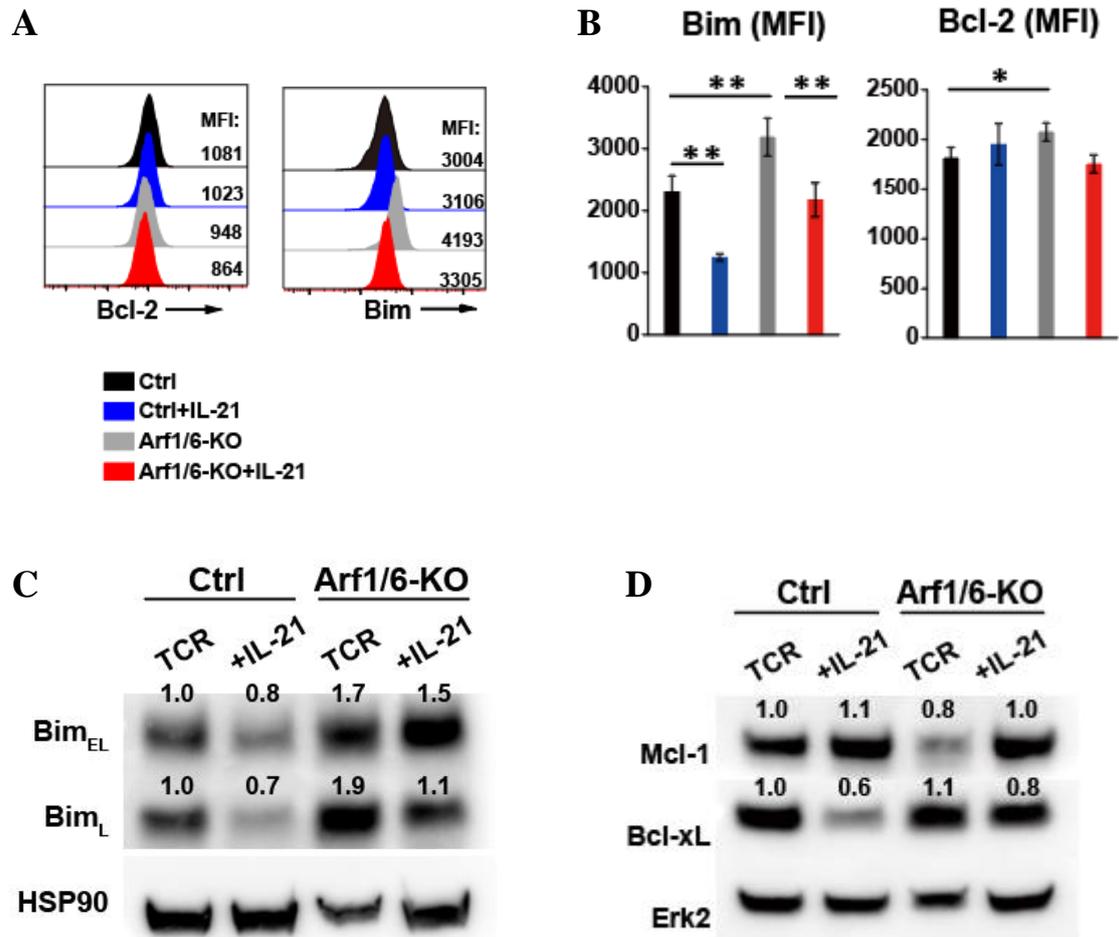


図 36 Arf1/6 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞における Bcl-2 ファミリーの発現

(A, B) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を、IL-21 存在下・非存在下に抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体によって刺激 (TCR) し、48 時間後にフローサイトメトリーによって Bim と Bcl-2 の発現レベルを評価した。(A) 代表的なプロット。(B) 平均蛍光強度 (MFI)。(C) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を、IL-21 存在下・非存在下に抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体によって 96 時間刺激 (TCR) した後、細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングによって Bim の発現を評価した。各バンド上部に示す数値は、TCR 刺激したコントロール細胞におけるローディングコントロール (HSP90) の発現量に対する各 Bim アイソフォーム

の発現量を 1 とした時の相対的な発現量を表す。(D) (C) と同様の方法で細胞を 96 時間刺激し、ウエスタンブロッティングによって Mcl-1 と Bcl-xL の発現レベルを評価した。各バンド上部に示す数値は、TCR 刺激したコントロール細胞におけるローディングコントロール (Erk2) の発現量に対する Mcl-1 または Bcl-xL の発現量を 1 とした時の相対的な発現量を表す。

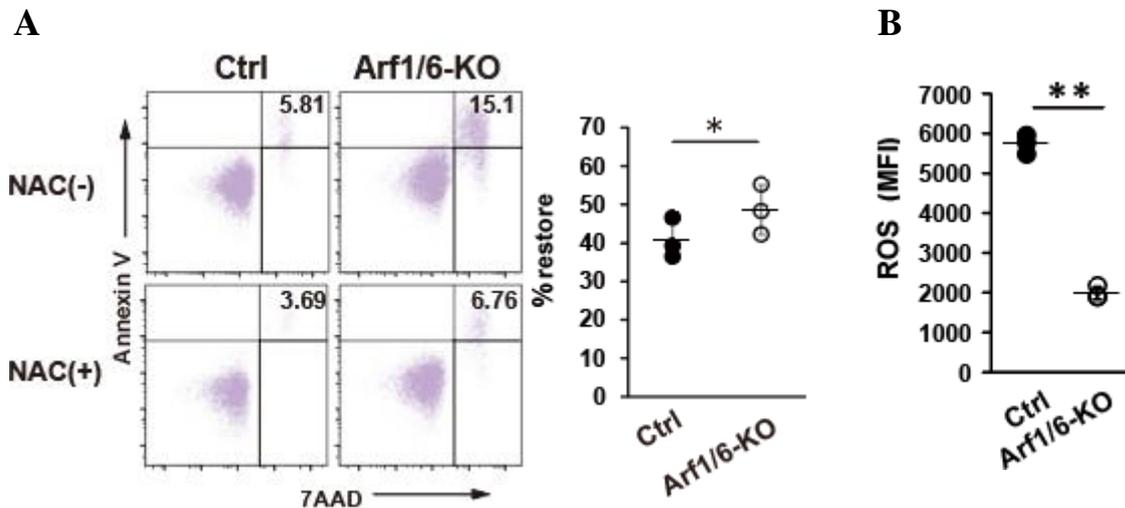


図 37 アポトーシスにおける ROS の影響

(A) コントロール (Ctrl; n=3) ならびに Arf1/6-KO マウス (n=3) 由来の CD4⁺ T 細胞を NAC 存在下・非存在下で抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、72 時間後にフローサイトメトリーによって Annexin V と 7AAD の発現を評価した。(左) 代表的なフローサイトメトリーのプロットパターン。(右) 死細胞 (Annexin V⁺7AAD⁺) の割合を求めた。NAC 非存在下の死細胞の割合に対する NAC 存在下の死細胞の減少率を「% restore」として定義した。Mean \pm S.D. *p<0.05. (B) コントロール (Ctrl; n=3) ならびに Arf1/6-KO マウス (n=3) 由来の CD4⁺ T 細胞を抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体によって 3 日間刺激 (TCR) し、ROS のレベルをフローサイトメトリーによって評価した。各シンボルは、それぞれの個体を表す。Mean \pm S.D. **p<0.01.

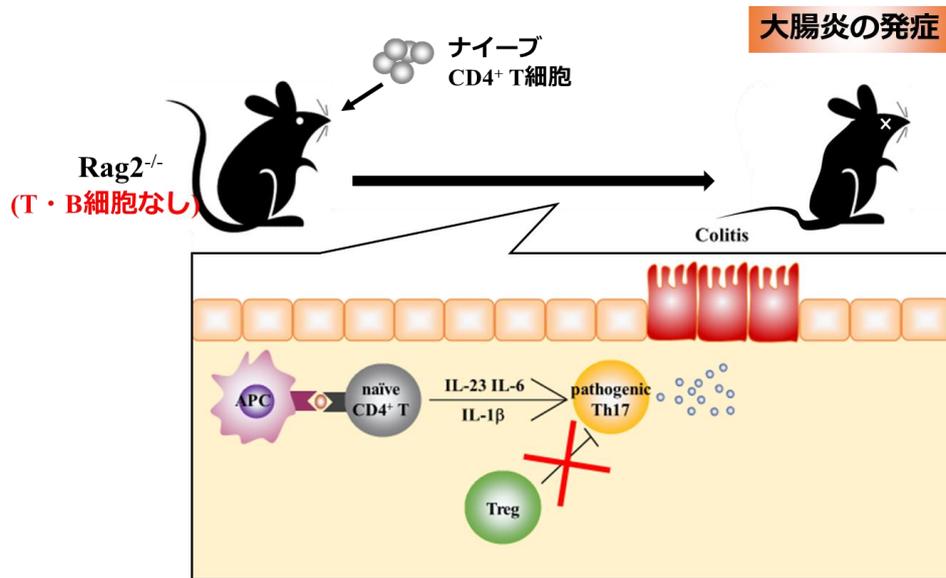
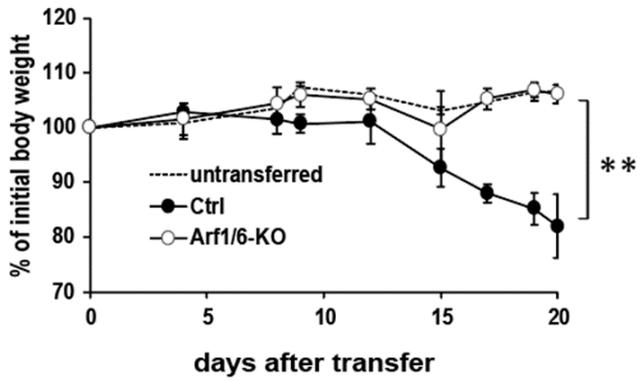


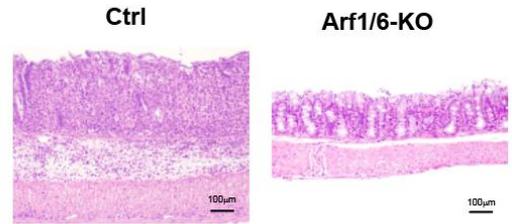
図 38 ナイーブ CD4⁺ T 細胞移入大腸炎モデルにおける大腸炎発症機構

健康なマウスでは、免疫抑制性の T 細胞である Treg が存在することにより、腸内の恒常性が維持されている。ナイーブ CD4⁺ T 細胞移入大腸炎モデルでは、Treg を始めとする全てのリンパ球を持たない Rag2^{-/-} 欠損マウスに、ナイーブ CD4⁺ T 細胞のみを移入することにより、腸内の恒常性が破綻し大腸炎が発症する。その際、移入したナイーブ CD4⁺ T 細胞が活性化過程において IL-23、IL-6、ならびに IL-1β といったサイトカイン環境によって pathogenic Th17 細胞へと分化・機能することが大腸炎発症の起点となる。

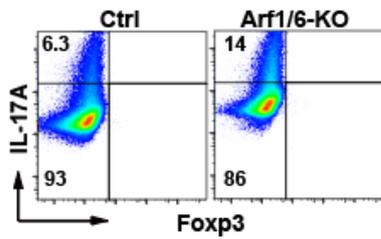
A



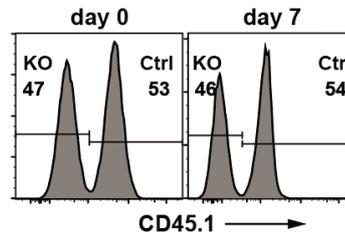
B



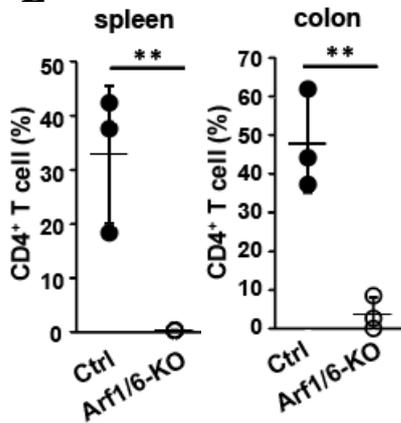
C



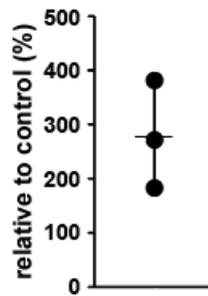
D



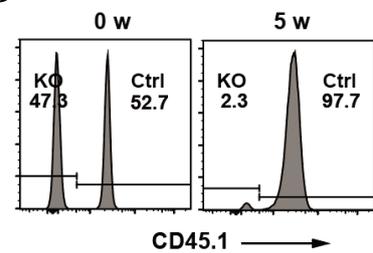
E



F



G



H

スコア	臨床症状
0	正常
0.5	尾の先端が下垂
1	尾の麻痺
2	協調的な運動の欠如；後肢の運動不全
2.5	片後肢の麻痺
3	両後肢の麻痺
3.5	両後肢の麻痺；前肢の脱力
4	両前肢の麻痺
5	瀕死状態

I

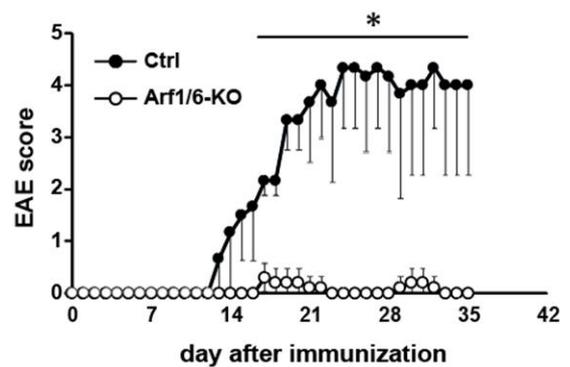


図 39 T 細胞において Arf1/6 を欠損すると自己免疫疾患の発症が抑制される

(A, B) コントロール (Ctrl; n=4) ならびに Arf1/6-KO マウス (n=4) 由来ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Rag2^{-/-}マウスに移入し、大腸炎を誘導した。(A) コントロール細胞を移入した Rag2^{-/-}マウス (Ctrl)、Arf1/6-KO 細胞を移入した Rag2^{-/-}マウス (Arf1/6-KO)、ならびに細胞の移入を行わなかった Rag2^{-/-}マウス (untransferred) の経時的な体重変化をそれぞれ計測し、実験開始時の体重を 100 % として示した。Mean ± S.D. **p<0.01. (B) 実験終了時の各マウスの代表的な大腸組織切片の HE 染色像。スケールバーは 100 μ m. (C) コントロール (Ctrl) ならびに Arf1/6-KO マウス由来ナイーブ CD4⁺ T 細胞を病原性 Th17 細胞の誘導条件下で 4 日間培養した後、IL-17A と Foxp3 の発現を細胞内サイトカイン染色法によって調べた。(D) *In vitro* で病原性 Th17 へ分化誘導したコントロール (Ctrl; CD45.1⁺) と Arf1/6-KO (CD45.1⁻) CD4⁺ T 細胞を 1:1 で混合し (day 0)、あらかじめ大腸炎を誘導したマウスに移植した。7 日後にレシピエントマウスの LP におけるコントロール細胞と Arf1/6-KO 細胞の割合をフローサイトメトリーによって評価した。同様の実験を独立して 4 回行い、うち代表的なデータを示した。(E) (D) で用いた各レシピエントマウスについて、実験終了時に脾臓ならびに大腸粘膜固有層における CD4⁺ T 細胞の割合をフローサイトメトリーによって評価した。Mean ± S.D. **p<0.01. (F) (D) で用いた Rag2^{-/-}レシピエントマウス脾臓由来 CD4⁺ T 細胞を対象に、IL-17A 産生細胞の割合をフローサイトメトリーによって評価した。グラフ縦軸はコントロール細胞を移植した Rag2^{-/-}マウスの脾臓由来 CD4⁺ T 細胞に占める IL-17A⁺細胞の割合を 100 % とした場合の Arf1/6-KO 細胞移植マウス脾臓由来 CD4⁺ T 細胞に占める IL-17A⁺細胞の割合を表す。Mean ± S.D. (G) コントロール (Ctrl; CD45.1⁺) と Arf1/6-KO (CD45.1⁻) マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を 1:1 で混合し (0 w)、Rag2^{-/-}マウスへ移入した。5 週間後に、レシピエントマウスの大腸粘膜固有層におけるコントロール細胞と Arf1/6-KO 細胞の割合をフローサイトメトリーによって評価した (5 w)。同様の実験を独立して 3 回行い、うち代表的なデータを示した。(H) EAE スコアと臨床症状 (I) コント

ロールマウス (Ctrl; n=3) または Arf1/6-KO マウス (n=3) の EAE 病態スコア。Mean \pm S.D.

*p < 0.05.

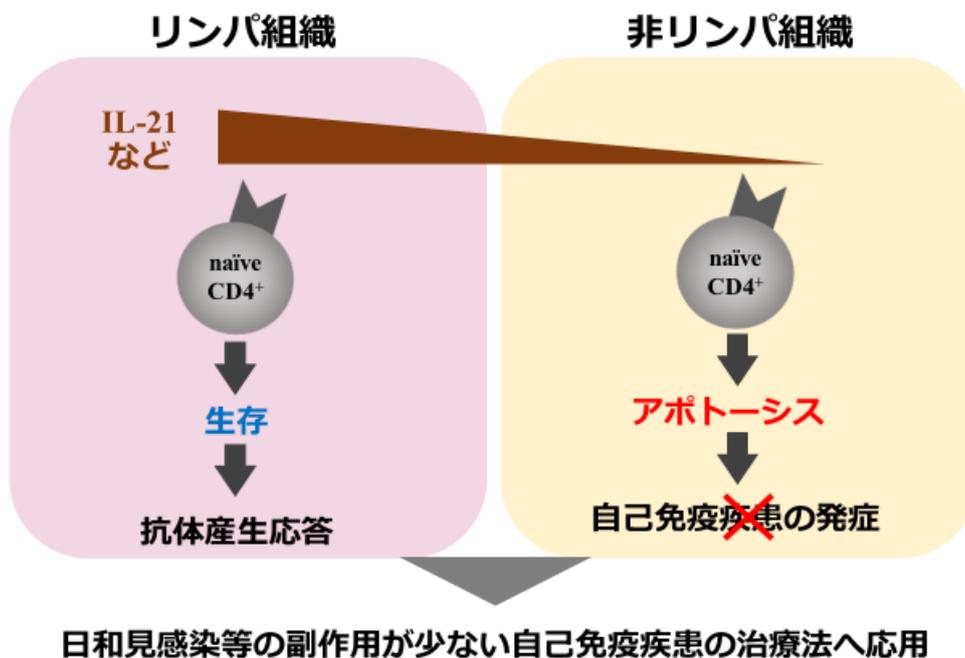


図 40 サイトカイン環境による Arf1/6-KO T 細胞の生存と免疫応答

リンパ組織のGCではB細胞の活性化過程においてTfhがIL-21を大量に産生しているため、非リンパ組織よりもIL-21に富んだ環境になっていると予想される。IL-21存在下では活性化過程におけるArf1/6-KO T細胞のアポトーシスが抑制されるので、抗体産生応答が誘導される。一方、大腸粘膜固有層といった非リンパ組織ではIL-21の濃度が低いため、刺激によってArf1/6-KO T細胞のアポトーシスが亢進し、大腸炎などの自己免疫疾患の発症が抑制されると考えられる。

総合討論

『細胞内小胞輸送制御因子 Arf1 に対する GAP である SMAP2 と Arf6 に対する GAP である SMAP1 が細胞内で共局在する』という先行研究で明らかになったことをヒントに、本論文では、SMAP1, 2 の相互作用の解析に始まり、高次生命現象の一つである免疫系における Arf1 と Arf6 の働きに着目した研究を行った。まず、先行研究で示唆されていた SMAP1 と SMAP2 の相互作用が個体レベルでも見られるのかを確認した。さらに SMAP1・SMAP2 それぞれの標的である Arf1 と Arf6 の間にも同様の作用があるか否かを解析するためのツールとして、Arf1 欠損マウスの作製・解析を経て、誘導欠損型 Arf1 遺伝子改変マウス (Arf1-cKO) を樹立した。樹立したマウスを用い、小胞輸送の重要性が以前から示唆されていた免疫系における Arf1 と Arf6 の生理機能解析に取り組み、T 細胞の生存維持機構において Arf1 と Arf6 が協調的に働くことを明らかにした。

SMAP1 欠損マウスと SMAP2 欠損マウスとの交配によって作製した二重欠損マウスの解析によって、二重欠損マウスが受精後 7.5 日目で胚遠位領域のアポトーシスを伴い、結果的に致死となることが明らかとなった (39)。SMAP1 欠損マウスは老齢期に骨髄異形成症候群を発症し、SMAP2 欠損マウスは精子先体形成異常による不妊であることが報告されているが、共に成体まで正常に成長することから、初期胚発生において SMAP1 と SMAP2 が協調的に働くことが示唆される (16, 27)。一方、SMAP1/2 二重欠損 MEF 細胞を用いた解析からは、個体で確認されたような二重欠損特異的な異常を確認することが出来なかった。このように、個体で認められた異常が細胞レベルでは確認できないということは、Arf1 の解析からも言える。これまでの培養細胞レベルの研究報告から、Arf1 の機能は他の Arf アイソフォームである Arf2-5 によって補完されることが明らかとなっており (19, 33, 34)、Arf1 単独での重要性は不明であった。しかし、マウスの全身で Arf1 を欠損させたマウスを作製したところ、受精後 3.5 日目以降に胎性致死となることが明らかとなった (49)。これらを踏まえる

と、小胞輸送は全身の細胞で行われている機構であるが、小胞輸送に関わる Arf ファミリーや GEF・GAP などの制御因子は組織や時期によってかなり複雑な使い分けがされていると考えられる。そのため、今後の小胞輸送因子研究は培養細胞レベルだけではなく、個体レベルの研究が必然となると予想され、今回作製した *Arf1-cKO* マウスの有用性は非常に高いと考えられる。本論文では、高次生命現象の中でも特に免疫系における Arf ファミリーの機能に着目しているが、小胞輸送の活性化が活発であることが知られている、神経系やがんの研究にも今後は応用していきたい。

Arf アイソフォームのうち *Arf1-Arf5* の協調作用は培養細胞を用いた研究からこれまでも報告されているが、免疫細胞についても、限定した機能に関しては同じことが起こっていることが今回の解析から示唆される。*Arf1* 経路の阻害剤である brefeldin A は、活性化 T 細胞からのサイトカイン分泌を阻害する一方で、*Arf1* 欠損 T 細胞や *Arf1*・*Arf6* 二重欠損 T 細胞におけるサイトカイン分泌能は正常であった。Brefeldin A は 170-200 kD の large ARF-GEFs と呼ばれるいくつかの GEF (*GBF1* や *BIG1/2* など) と標的である Arf との結合阻害を行っている(7)。Large ARF-GEFs は *Arf1* 以外にも *Arf3* や *Arf5* に対しても GEF 活性を持つことが明らかとなっているため、brefeldin A によるサイトカイン分泌阻害効果は、*Arf1* に加え、*Arf3* と *Arf5* の活性化も阻害されたことが原因であると強く示唆され、T 細胞のサイトカイン分泌機構では *Arf1-5* がある程度補完的に働いていると予想される。一方、*Arf6* は他の Arf アイソフォームとアミノ酸配列の相同性や局在の違いを示し、さらには small Arf GEFs と呼ばれる brefeldin A に耐性があるいくつかの GEF によって制御されているため、*Arf1* とは異なる小胞輸送経路に働くと考えられてきた (7, 31)。しかし本研究で、*SMAP1/2* 二重欠損マウスの解析から、個体レベルにおける *SMAP1* と *SMAP2* の協働が明らかとなったことから、その標的である *Arf1* と *Arf6* との間にも同じような協調的な働きがある可能性が強く示唆された (39)。実際、T 細胞特異的に *Arf1* を欠損するマウス、*Arf6* を欠損するマウス、*Arf1/6* を欠損するマウスを樹立し、解析を行った結果、*Arf1* と *Arf6* の両方を欠損し

た時にのみ、T細胞受容体を介した刺激に依存してナイーブ CD4⁺ T細胞で高頻度にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。同様の刺激を加えても、Arf1 欠損や Arf6 欠損ナイーブ CD4⁺ T細胞では、アポトーシスの亢進が認められないことから、T細胞の生存維持機構において Arf1 と Arf6 が協調的に働くことが示された。評価している実験系は異なるものの、SMAP1-SMAP2 間と Arf1-Arf6 間の作用は、どちらも『細胞の生存維持機構』という共通な働きに重要である。免疫系における SMAP1・SMAP2 の機能は明らかになっておらず、T細胞特異的 SMAP1・SMAP2 二重欠損マウスの作製を通じて、T細胞生存維持機構における Arf1・Arf6 の協調作用が SMAP1・SMAP2 の相互作用によって制御されているのか否かを今後確かめたい。

2017年時点で、世界で約250万人もの多発性硬化症患者が、さらに、クローン病を含む炎症性腸疾患（IBD）については約680万人の患者が存在していると報告されており、自己免疫疾患の発症メカニズムについての研究は世界中で盛んにおこなわれている(82)。一方で、現在一般的に使用されている自己免疫疾患の治療法は、免疫細胞の機能抑制による日和見感染等の副作用が課題として残されている。今回の研究で、T細胞特異的 Arf1・Arf6 二重欠損マウスでは、抗体産生能は正常である一方で自己免疫疾患の発症が抑制されることが明らかとなった。Arf 経路を標的することで、今まで課題であった副作用の影響が少ない自己免疫疾患の治療法開発に繋がるものと期待される。全身で Arf1 を欠損したマウス、Arf6 を欠損したマウスはともに胎生致死であるため(13, 49)、Arf1・Arf6 経路を治療標的として考えた場合、身体に有害作用が生じるのではないかという問題点が指摘される。興味深いことに、タモキシフェンの投与で遺伝子欠損が誘導可能である遺伝子改変マウスを作製し解析したところ、成体マウスで Arf1 と Arf6 の欠損を同時に誘導しても、生存には問題なく、一見して野生型マウスと同様に健康であるという予備的なデータを得ている。また、Arf1 は Arf2-5 と高い相同性を有するため、直接治療標的とすることは困難が予想されるが、SMAP1・SMAP2 など Arf の制御因子を標的とすることで、この問題は解決すると予想され

る。

本論文で私は、小胞輸送活性制御因子 Arf1・Arf6 とその GAP である SMAP1 と SMAP2 に注目して、マウス個体レベルでその生理機能の解析を行った。当初目標としていた個体における SMAP1・SMAP2 の相互作用を明らかにし、免疫系における Arf1・Arf6 の協働と病態発症における重要性を明らかにしたという点で十分な成果を挙げたものと自負している。一方で、その詳しい分子機構に関しては不明の点が多くあることは率直に認めざるを得ない。今後は、各章の討論で述べたようなさらなる生理機能の解析と、Arf アイソフォーム間の協働制御機構の解析を通じ、小胞輸送経路の生理機能解明に多少なりとも貢献したいと考えている。

引用文献

1. 『Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.』 Alberts, B. (2002). *Garl. Sci.* .
2. 『メンブレントラフィックの奔流-分子から細胞,そして個体へ-』 大野博司・吉森保 (2009) 東京共立出版
3. Vigil, D., J. Cherfils, K. L. Rossman, and C. J. Der. 2010. Ras superfamily GEFs and GAPs: Validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* 10: 842–857.
4. D’Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. ARF proteins: Roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 347–358.
5. Donaldson, J. G., and C. L. Jackson. 2011. ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 362–375.
6. Casanova, J. E. 2007. Regulation of Arf activation: The Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* 8: 1476–1485.
7. Bourgoin, S. G. 2012. Small inhibitors of ADP-ribosylation factor activation and function in mammalian cells. *World J. Pharmacol.* 1: 55.
8. Honda, A., M. Nogami, T. Yokozeiki, M. Yamazaki, H. Nakamura, H. Watanabe, K. Kawamoto, K. Nakayama, A. J. Morris, M. A. Frohman, and Y. Kanaho. 1999. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99: 521–532.
9. Donaldson, J. G. 2003. Multiple Roles for Arf6: Sorting, Structuring, and Signaling at the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 278: 41573–41576.
10. Kanatsu, K., Y. Morohashi, M. Suzuki, H. Kuroda, T. Watanabe, T. Tomita, and T. Iwatsubo. 2014. Decreased CALM expression reduces A β 42 to total A β ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase. *Nat. Commun.* 5: 3386.

11. Ménasché, G., E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulffraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, and G. De Saint Basile. 2000. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25: 173–176.
12. Stinchcombe, J. C., D. C. Barral, E. H. Mules, S. Booth, A. N. Hume, L. M. Machesky, M. C. Seabra, and G. M. Griffiths. 2001. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 152: 825–833.
13. Suzuki, T., Y. Kanai, T. Hara, J. Sasaki, T. Sasaki, M. Kohara, T. Maehama, C. Taya, H. Shitara, H. Yonekawa, M. A. Frohman, T. Yokozeki, and Y. Kanaho. 2006. Crucial Role of the Small GTPase ARF6 in Hepatic Cord Formation during Liver Development. *Mol. Cell. Biol.* 26: 6149–6156.
14. Akiyama, M., H. Hasegawa, T. Hongu, M. A. Frohman, A. Harada, H. Sakagami, and Y. Kanaho. 2014. Trans-regulation of oligodendrocyte myelination by neurons through small GTPase Arf6-regulated secretion of fibroblast growth factor-2. *Nat. Commun.* 5: 4744.
15. Hongu, T., Y. Funakoshi, S. Fukuhara, T. Suzuki, S. Sakimoto, N. Takakura, M. Ema, S. Takahashi, S. Itoh, M. Kato, H. Hasegawa, N. Mochizuki, and Y. Kanaho. 2015. Arf6 regulates tumour angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial β 1 integrin recycling. *Nat. Commun.* 6: 7925.
16. Kon, S., N. Minegishi, K. Tanabe, T. Watanabe, T. Funaki, W. F. Wong, D. Sakamoto, Y. Higuchi, H. Kiyonari, K. Asano, Y. Iwakura, M. Fukumoto, M. Osato, M. Sanada, S. Ogawa, T. Nakamura, and M. Satake. 2013. Smap1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *J. Clin. Invest.* 123: 1123–1137.
17. Aoyama, M., G. H. Sun-Wada, A. Yamamoto, M. Yamamoto, H. Hamada, and Y. Wada. 2012. Spatial Restriction of Bone Morphogenetic Protein Signaling in Mouse Gastrula through the mVam2-Dependent Endocytic Pathway. *Dev. Cell* 22: 1163–1175.

18. Gillingham, A. K., and S. Munro. 2007. The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 579–611.
19. Volpicelli-Daley, L. A., Y. Li, C.-J. Zhang., and R. A. Kahn. 2005. Isoform-selective Effects of the Depletion of ADP-Ribosylation Factors 1–5 on Membrane Traffic. *Mol Biol Cell* 16: 4495–4508.
20. Spang, A., Y. Shiba, and P. A. Randazzo. 2010. Arf GAPs: Gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Lett.* 584: 2646–2651.
21. Chen, P. W., R. Luo, X. Jian, and P. A. Randazzo. 2014. The Arf6 GTPase-activating proteins ARAP2 and ACAP1 define distinct endosomal compartments that regulate integrin $\alpha 5 \beta 1$ traffic. *J. Biol. Chem.* 289: 30237–30248.
22. Tanabe, K., T. Torii, W. Natsume, S. Braesch-Andersen, T. Watanabe, and M. Satake. 2005. A Novel GTPase-activating Protein for ARF6 Directly Interacts with Clathrin and Regulates Clathrin-dependent Endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 16: 1617–1628.
23. Natsume, W., K. Tanabe, S. Kon, N. Yoshida, T. Watanabe, T. Torii, and M. Satake. 2006. SMAP2, a Novel ARF GTPase-activating Protein, Interacts with Clathrin and Clathrin Assembly Protein and Functions on the AP-1–positive Early Endosome/Trans-Golgi Network. *Mol. Biol. Cell* 17: 2529–2603.
24. Sato, Y., H. N. Hong, N. Yanai, and M. Obinata. 1998. Involvement of Stromal Membrane-Associated Erythropoietic Protein (SMAP-1) in liver in mice . We showed that established stromal cells of these organs selectively support. *J. Biochem.* 124: 209–216.
25. Crottet, P., D. M. Meyer, J. Rohrer, and S. Martin. 2002. ARF1 • GTP, Tyrosine-based Signals, and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Constitute a Minimal Machinery to Recruit the AP-1 Clathrin Adaptor to Membranes. *Mol. Biol. Cell* 13: 3672–3682.
26. Kon, S., K. Tanabe, T. Watanabe, H. Sabe, and M. Satake. 2008. Clathrin dependent

- endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. *Exp. Cell Res.* 314: 1415–1428.
27. Funaki, T., S. Kon, K. Tanabe, W. Natsume, S. Sato, T. Shimizu, N. Yoshida, W. F. Wong, A. Ogura, T. Ogawa, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, K. Mochida, K. Endoh, K. Yomogida, M. Fukumoto, R. Horai, Y. Iwakura, C. Ito, K. Toshimori, T. Watanabe, and M. Satake. 2013. The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the trans-Golgi network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis. *Mol. Biol. Cell* 24: 2633–2644.
28. 『Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual』Behringer, R., M. Gertsenstein, K. V. Nagy, and A. Nagy. (2013)
29. Jahn, T., P. Seipel, S. Coutinho, S. Urschel, K. Schwarz, C. Miething, H. Serve, C. Peschel, and J. Duyster. 2002. Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* 21: 4508–4520.
30. Mueller, A. G., M. Moser, R. Kluge, S. Leder, M. Blum, R. Büttner, H.-G. Joost, and A. Schürmann. 2002. Embryonic Lethality Caused by Apoptosis during Gastrulation in Mice Lacking the Gene of the ADP-Ribosylation Factor-Related Protein 1. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1488–1494.
31. Tsuchiya, M., S. R. Price, S. C. Tsai, J. Moss, and M. Vaughan. 1991. Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 266: 2772–2777.
32. D’Souza-Schorey, C., G. Li, M. I. Colombo, and P. D. Stahl. 1995. A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science.* 267: 1175–1178.
33. Nakai, W., Y. Kondo, A. Saitoh, T. Naito, K. Nakayama, and H. W. Shin. 2013. ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Mol. Biol. Cell* 24: 2570–2581.

34. Kondo, Y., A. Hanai, W. Nakai, Y. Katoh, K. Nakayama, and H. W. Shin. 2012. ARF1 and ARF3 are required for the integrity of recycling endosomes and the recycling pathway. *Cell Struct. Funct.* 37: 141–154.
35. Powelka, A. M., J. Sun, J. Li, M. Gao, L. M. Shaw, A. Sonnenberg, and V. W. Hsu. 2004. Stimulation-dependent recycling of integrin β 1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* 5: 20–36.
36. Krndija, D., C. Münzberg, U. Maass, M. Hafner, G. Adler, H. A. Kestler, T. Seufferlein, F. Oswald, and G. Von Wichert. 2012. The phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) promotes cell migration through Arf-activitydependent stimulation of integrin α 5 recycling. *J. Cell Sci.* 125: 3883–3892.
37. Knizhnik, A. V., O. V. Kovaleva, A. V. Komelkov, L. S. Trukhanova, V. A. Rybko, I. B. Zborovskaya, and E. M. Tchevkina. 2012. Arf6 promotes cell proliferation via the PLD-mTORC1 and p38MAPK pathways. *J. Cell. Biochem.* 113: 360–371.
38. Bernfeld, E., D. Menon, V. Vaghela, I. Zerlin, P. Faruque, M. A. Frias, and D. A. Foster. 2018. Phospholipase D-dependent mTOR complex 1 (mTORC1) activation by glutamine. *J. Biol. Chem.* 293: 16390–16401.
39. Sumiyoshi, M., N. Masuda, N. Tanuma, H. Ogoh, E. Imai, M. Otsuka, N. Hayakawa, K. Ohno, Y. Matsui, K. Hara, R. Gotoh, M. Suzuki, S. Rai, H. Tanaka, I. Matsumura, H. Shima, and T. Watanabe. 2015. Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality. *FEBS Lett.* 589: 2754–2762.
40. Srikanth, S., K. Do Kim, Y. Gao, J. S. Woo, S. Ghosh, G. Calmettes, A. Paz, J. Abramson, M. Jiang, and Y. Gwack. 2016. A large Rab GTPase encoded by CRACR2A is a component of subsynaptic vesicles that transmit T cell activation signals. *Sci. Signal.* 9: 1–14.
41. 『Immunobiology , 5th edition.』 Janeway, C. A., J. P. Travers, M. Walport, and M. J.

- Shlomchik. (2001) *Garl. Sci.* .
42. 『もっとよくわかる！免疫学』河本宏. (2011). 羊土社
 43. 『免疫ペディア 101のイラストで免疫学・臨床免疫学に強くなる！』熊ノ郷淳. (2017) 羊土社
 44. Nylander, S., and I. Kalies. 1999. Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: Efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 224: 69–76.
 45. Donaldson, J. G., D. Finazzi, and R. D. Klausner. 1992. Brefeldin a inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360: 350–352.
 46. Takahama, Y., K. Ohishi, Y. Tokoro, T. Sugawara, Y. Yoshimura, M. Okabe, T. Kinoshita, and J. Takeda. 1998. Functional competence of T cells in the absence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins caused by T cell-specific disruption of the *Pig-a* gene. *Eur. J. Immunol.* 28: 2159–2166.
 47. Luche, H., O. Weber, T. N. Rao, C. Blum, and H. J. Fehling. 2007. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in “knock-in” Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur. J. Immunol.* 37: 43–53.
 48. Stromnes, I. M., and J. M. Goverman. 2006. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat. Protoc.* 1: 1810–1819.
 49. Hayakawa, N., H. Ogoh, M. Sumiyoshi, Y. Matsui, S. Nishikawa, K. Miyamoto, Y. Maede, H. Kiyonari, M. Suzuki, and T. Watanabe. 2014. The ADP-ribosylation factor 1 gene is indispensable for mouse embryonic development after implantation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453: 748–753.
 50. Ogawa, M., T. Okamura, S. Ishikura, K. Doi, H. Matsuzaki, Y. Tanaka, T. Ota, K. Hayakawa, H. Suzuki, T. Tsunoda, T. Sasazuki, and S. Shirasawa. 2013. Zfat-Deficiency Results in a Loss

of CD3 ζ Phosphorylation with Dysregulation of ERK and Egr Activities Leading to Impaired Positive Selection. *PLoS One* 8: 1–9.

51. Weinreich, M. A., and K. A. Hogquist. 2008. Thymic Emigration: When and How T Cells Leave Home. *J. Immunol.* 181: 2265–2270.
52. Brewer, J. M. 2006. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol. Lett.* 102: 10–15.
53. Sastry, M., B. Zhang, M. Chen, M. G. Joyce, W. P. Kong, G. Y. Chuang, K. Ko, A. Kumar, C. Silacci, M. Thom, A. M. Salazar, D. Corti, A. Lanzavecchia, G. Taylor, J. R. Mascola, B. S. Graham, and P. D. Kwong. 2017. Adjuvants and the vaccine response to the DS-Cav1-stabilized fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *PLoS One* 12: 1–21.
54. Saxton, R. A., and D. M. Sabatini. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168: 960–976.
55. Li, L., E. Kim, H. Yuan, K. Inoki, P. Goraksha-Hicks, R. L. Schiesher, T. P. Neufeld, and K. L. Guan. 2010. Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases. *J. Biol. Chem.* 285: 19705–19709.
56. Wang, J., and H. Arase. 2014. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1319: 66–81.
57. Delgoffe, G. M., K. N. Pollizzi, A. T. Waickman, E. Heikamp, D. J. Meyers, M. R. Horton, B. Xiao, P. F. Worley, and J. D. Powell. 2011. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.* 12: 295–304.
58. Kurebayashi, Y., S. Nagai, A. Ikejiri, M. Ohtani, K. Ichiyama, Y. Baba, T. Yamada, S. Egami, T. Hoshii, A. Hirao, S. Matsuda, and S. Koyasu. 2012. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 Axis Controls Th17 Differentiation by Regulating Gfi1 Expression and Nuclear Translocation of ROR γ . *Cell Rep.* 1: 360–373.

59. Kawabe, T., S. Sun, T. Fujita, S. Yamaki, A. Asao, T. Takahashi, T. So, and N. Ishii. 2013. Homeostatic Proliferation of Naive CD4 + T Cells in Mesenteric Lymph Nodes Generates Gut-Tropic Th17 Cells . *J. Immunol.* 190: 5788–5798.
60. Iwata, M., A. Hirakiyama, Y. Eshima, H. Kagechika, C. Kato, and S. Y. Song. 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21: 527–538.
61. Kurmaeva, E., J. D. Lord, S. Zhang, J. R. Bao, C. G. Kevil, M. B. Grisham, and D. V. Ostanin. 2014. T cell-associated $\alpha 4 \beta 7$ but not $\alpha 4 \beta 1$ integrin is required for the induction and perpetuation of chronic colitis. *Mucosal Immunol.* 7: 1354–1365.
62. Britschgi, M. R., A. Link, T. K. A. Lissandrin, and S. A. Luther. 2008. Dynamic Modulation of CCR7 Expression and Function on Naive T Lymphocytes In Vivo. *J. Immunol.* 181: 7681–7688.
63. Lowell, C. L. A. and C. A. 2013. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 185: 974–981.
64. Verma, N. K., and D. Kelleher. 2017. Not Just an Adhesion Molecule: LFA-1 Contact Tunes the T Lymphocyte Program. *J. Immunol.* 199: 1213–1221.
65. Leonard, W. J., J. X. Lin, and J. J. O’Shea. 2019. The γc Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity* 50: 832–850.
66. Hedrick, S. M., I. L. Ch’En, and B. N. Alves. 2010. Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. *Immunol. Rev.* 236: 41–53.
67. Boise, L. H., L. H. Boise, A. J. Minn, A. J. Minn, P. J. Noel, P. J. Noel, C. H. June, M. A. Accavitti, M. A. Accavitti, T. Lindsten, T. Lindsten, and C. B. Thompson. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3: 87–98.
68. Hildeman, D. A., Y. Zhu, T. C. Mitchell, P. Bouillet, A. Strasser, J. Kappler, and P. Marrack.

2002. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic Bcl-2 family member Bim. *Immunity* 16: 759–767.
69. Wensveen, F. M., K. P. J. M. van Gisbergen, I. A. M. Derks, C. Gerlach, T. N. Schumacher, R. A. W. van Lier, and E. Eldering. 2010. Apoptosis threshold set by noxa and Mcl-1 after T cell activation regulates competitive selection of high-affinity clones. *Immunity* 32: 754–765.
70. Zhan, Y., E. M. Carrington, Y. Zhang, S. Heinzel, and A. M. Lew. 2017. Life and death of activated T cells: How are they different from naïve T Cells? *Front. Immunol.* 8: 1–9.
71. Clybouw, C., D. Merino, T. Nebl, F. Masson, M. Robati, L. O'Reilly, A. Hübner, R. J. Davis, A. Strasser, and P. Bouillet. 2012. Alternative splicing of Bim and Erk-mediated Bim EL phosphorylation are dispensable for hematopoietic homeostasis in vivo. *Cell Death Differ.* 19: 1060–1068.
72. Hildeman, D. a, T. Mitchell, T. K. Teague, P. Henson, B. J. Day, J. Kappler, and P. C. Marrack. 1999. Reactive Oxygen Species Regulate Activation-Induced T Cell Apoptosis. *Immunity* 10: 735–744.
73. Yamada, A., R. Arakaki, M. Saito, T. Tsunematsu, Y. Kudo, and N. Ishimaru. 2016. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 22: 2195–2205.
74. Miyamoto, Y., T. Torii, K. Tago, A. Tanoue, S. Takashima, and J. Yamauchi. 2018. BIG1/Arfgef1 and Arf1 regulate the initiation of myelination by schwann cells in mice. *Sci. Adv.* 4: 4.
75. Zhang, N., and Y.-W. He. 2005. The Antiapoptotic Protein Bcl-x L Is Dispensable for the Development of Effector and Memory T Lymphocytes . *J. Immunol.* 174: 6967–6973.
76. Sade, H., and A. Sarin. 2004. Reactive oxygen species regulate quiescent T-cell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. *Cell Death Differ.* 11: 416–423.

77. Zhu, S., S. Evans, B. Yan, T. J. Povsic, V. Tapson, P. J. Goldschmidt-Clermont, and C. Dong. 2008. Transcriptional regulation of Bim by FOXO3a and Akt mediates scleroderma serum-induced apoptosis in endothelial progenitor cells. *Circulation* 118: 2156–2165.
78. Kovacs, J. R., C. Li, Q. Yang, G. Li, I. G. Garcia, S. Ju, D. G. Roodman, J. J. Windle, X. Zhang, and B. Lu. 2012. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ.* 19: 144–152.
79. Aniek, V., G. Janice, and R. Fulvio. 2010. Exit From the Golgi Is Required for the Expansion of the Autophagosomal Phagophore in Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 21: 2270–2284.
80. Moreau, K., B. Ravikumar, C. Puri, and D. C. Rubinsztein. 2012. Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *J. Cell Biol.* 196: 483–496.
81. Wang, G., J. Xu, J. Zhao, W. Yin, D. Liu, W. J. Chen, and S. X. Hou. 2020. Arf1-mediated lipid metabolism sustains cancer cells and its ablation induces anti-tumor immune responses in mice. *Nat. Commun.* 11:220.
82. Alatab, S., S. G. Sepanlou, K. Ikuta, H. Vahedi, C. Bisignano, S. Safiri, A. Sadeghi, M. R. Nixon, A. Abdoli, H. Abolhassani, V. Alipour, M. A. H. Almadi, A. Almasi-Hashiani, A. Anushiravani, J. Arabloo, S. Atique, A. Awasthi, A. Badawi, A. A. A. Baig, N. Bhala, A. Bijani, A. Biondi, A. M. Borzi, K. E. Burke, F. Carvalho, A. Daryani, M. Dubey, A. Eftekhari, E. Fernandes, J. C. Fernandes, F. Fischer, A. Haj-Mirzaian, A. Haj-Mirzaian, A. Hasanzadeh, M. Hashemian, S. I. Hay, C. L. Hoang, M. Househ, O. S. Ilesanmi, N. J. Balalami, S. L. James, A. P. Kengne, M. M. Malekzadeh, S. Merat, T. J. Meretoja, T. Mestrovic, E. M. Mirrakhimov, H. Mirzaei, K. A. Mohammad, A. H. Mokdad, L. Monasta, I. Negoï, T. H. Nguyen, C. T. Nguyen, A. Pourshams, H. Poustchi, M. Rabiee, N. Rabiee, K. Ramezanzadeh, D. L. Rawaf, S. Rawaf,

- N. Rezaei, S. R. Robinson, L. Ronfani, S. Saxena, M. Sepehrimanesh, M. A. Shaikh, Z. Sharafi, M. Sharif, S. Siabani, A. R. Sima, J. A. Singh, A. Soheili, R. Sotoudehmanesh, H. A. R. Suleria, B. E. Tesfay, B. Tran, D. Tsoi, M. Vacante, A. B. Wondmieneh, A. Zarghi, Z. J. Zhang, M. Dirac, R. Malekzadeh, and M. Naghavi. 2020. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 5: 17–30.
83. Donaldson, J. G., and C. L. Jackson. 2011. ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 362–375.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々に御助力を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

奈良女子大学学部 4 年から博士前期課程においての 3 年間、渡邊利雄教授には主指導教員として研究に携わる姿勢や科学的基礎概念をご指導していただきました。また、博士前期課程修了後に関西医科大学附属生命医学研究所生体情報部門の松田達志准教授を紹介して下さいったご高配、奈良女子大学卒業後も変わらないご指導・ご支援に心より感謝申し上げます。

関西医科大学の松田准教授には、免疫学のいろは教えて頂き、奈良女子大学卒業から現在に至るまで終始熱心にご指導していただきましたことを心より感謝申し上げます。

学生時代に行った研究につきましては、副指導教員の鍵和田聡教授、安田恵子教授に多大なるご助言をいただきましたこと感謝申し上げます。

本研究で、共同研究を行い、Arf6 コンディショナル KO マウスを譲与くださった筑波大学大学院医学医療系の金保安則教授に心より感謝申し上げます。

本研究の MEF への Cre 発現ウイルス感染、共免疫沈降法においてご協力を賜りました、宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）の島礼教授、田沼延公准教授に心より感謝申し上げます。

本研究の MEF への c-Kit 発現レトロウイルス感染、細胞の単離においてご協力を賜りました、近畿大学医学部血液内科の田中宏和准教授、頼晋也講師に心より感謝申し上げます。

本研究の胚盤胞解析においてご協力を賜りました、早川夏姫氏（奈良女子大学渡邊研卒業）に心より感謝申し上げます。

本研究の胚組織切片作製においてご協力を賜りました、東北大学加齢医学研究所の松居靖久教授に心より感謝申し上げます。

本研究の Arf1-cKO マウス作製に際しては、生田優希氏（奈良女子大学渡邊研卒業）と理

化学研究所発生・再生科学総合研究センター（CDB）生体モデル開発チームの阿部高也研究員、並びに同チームに所属の坂東可菜技術員に多大なるご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

本研究の脾臓と腸間膜リンパ節の組織学的解析をご指導して下さった新潟大学の片貝智也教授、同研究室の小澤まどか特任助教に心より感謝申し上げます。

本研究の大腸織切片作製においてご協力を賜りました、埼玉医科大学の山田健人教授に心より感謝申し上げます。

本研究のEAEモデルにおいてご協力を賜りました、群馬大学生体防御学講座の鈴江一友講師に心より感謝申し上げます。

本研究の腸管IgAの抗体価測定でご協力を賜りました小谷唯氏（奈良女子大学渡邊研兼関西医科大学松田研）に心より感謝申し上げます。

本研究において研究のサポートをしていただきました江口稚佳子技師（関西医科大学附属生命医学研究所生体情報部門）に心より感謝申し上げます。

関西医科大学共同実験機器の管理と解析補助でお世話になりました関西医科大学附属生命医学研究所総合研究施設のスタッフの皆様、並びに、マウスの飼育でお世話になりました実験動物飼育共同施設のスタッフ皆様に心より感謝申し上げます。

最後に日々の研究生生活を過ごす中で、ここにお名前と詳細を載せることが出来なかった関西医科大学の先生方・スタッフの皆様、奈良女子大学卒業の先生・先輩方、同期の友人、後輩方々に深く感謝申し上げます。また、学生生活を支えて下さった家族、友人の皆様に心から感謝申し上げます。

尚、本研究の一部は平成30年度科学研究費助成事業と平成28・30年度関西医科大学学内助成D1により支援していただきました。ここにお礼申し上げます。

研究業績

主論文

- 1 著者名 Sumiyoshi, M., Y. Kotani, Y. Ikuta, K. Suzue, M. Ozawa, T. Katakai, T. Yamada, T. Abe, K. Bando, S. Koyasu, Y. Kanaho, T. Watanabe, and S. Matsuda.
題目 Arf1 and Arf6 synergistically maintain survival of T cells during activation
発表雑誌名 *The Journal of Immunology* (2020年11月14日 受理済み)

- 2 著者名 Sumiyoshi, M., N. Masuda, N. Tanuma, H. Ogoh, E. Imai, M. Otsuka, N. Hayakawa, K. Ohno, Y. Matsui, K. Hara, R. Gotoh, M. Suzuki, S. Rai, H. Tanaka, I. Matsumura, H. Shima, and T. Watanabe.
題目 Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality.
発表雑誌名 *FEBS Lett.* (2015) 589: 2754–2762.

- 3 著者名 Hayakawa, N., H. Ogoh, M. Sumiyoshi, Y. Matsui, S. Nishikawa, K. Miyamoto, Y. Maede, H. Kiyonari, M. Suzuki, and T. Watanabe.
題目 The ADP-ribosylation factor 1 gene is indispensable for mouse embryonic development after implantation.
発表雑誌名 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014)453: 748–753.

参考論文

- 1 著者名 Ogoh, H., N. Tanuma, Y. Matsui, N. Hayakawa, A. Inagaki, M. Sumiyoshi, Y. Momoi, A. Kishimoto, M. Suzuki, N. Sasaki, T. Ouchi, M. Nomura, Y. Teruya, K. Yasuda, T. Watanabe, and H. Shima.
題目 The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis.
発表雑誌名 *Mechanisms of Development* (2016) 139, 1-9.

- 2 著者名 Watanabe, T., and M. Sumiyoshi.
題目 ADP-ribosylation factor 1.
発表雑誌名 *Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition* 412-414.
Springer International Publishing AG (2018)

学会での研究発表

- 1 著者名 Sumiyoshi, M., Kotani, Y., and Matsuda, S.
発表題目 The role of Arf pathway in development of Th17-mediated autoimmune disease.
発表学会 第 48 回日本免疫学会学術集会
発表年月 2019 年 12 月
- 2 著者名 住吉麻実、小谷唯、金保安則、渡邊利雄、松田達志
発表題目 Th17 分化過程における低分子量 G タンパク質 Arf の機能
発表学会 第 42 回日本分子生物学会年会
発表年月 2019 年 12 月
- 3 著者名 住吉麻実、金保保則、渡邊利雄、松田達志
発表題目 T 細胞における低分子量 G タンパク質 Arf の機能解明（口頭発表）
発表学会 第 56 回日本消化器免疫学会総会
発表年月 2019 年 8 月
- 4 著者名 住吉麻実、小谷唯、金保安則、渡邊利雄、松田達志
発表題目 Th17 関連疾患発症における Arf 経路の機能解明（口頭発表）
発表学会 第 29 回 Kyoto T cell Conference
発表年月 2019 年 6 月
- 5 著者名 Mami Sumiyoshi, Yui Kotani, Yasunori Kanaho, and Satoshi Matsuda.
発表題目 Arf pathway regulates the pathogenicity of Th17 dependent autoimmune disease.
発表学会 第 47 回日本免疫学会
発表年月 2018 年 12 月

- 6 著者名 住吉麻実、渡邊利雄、松田達志
 発表題目 T細胞特異的 Arf 欠損マウスの解析
 発表学会 第28回 Kyoto T cell Conference
 発表年月 2018年6月
- 7 著者名 住吉麻実、江口 稚佳子、小河 穂波、小谷 唯、伊藤 量基、神田 晃、
 金保 安則、渡邊 利雄、松田 達志
 発表題目 Functional analysis of small G protein Arf family in T cells
 発表学会 H29年度文部科学省新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」成果発表会
 発表年月 2018年1月24日～1月25日、(大津)
- 8 著者名 住吉麻実、江口 稚佳子、小河 穂波、小谷 唯、伊藤 量基、神田 晃、
 金保 安則、渡邊 利雄、松田 達志
 発表題目 T細胞における低分子量 Gタンパク質 Arfファミリーの機能解析
 発表学会 第40回日本分子生物学会年会
 発表年月 2017年12月
- 9 著者名 松田達志、江口稚佳子、住吉麻実、生田優希、小河穂波、丹賀直美、早川夏姫、渡邊利雄
 発表題目 マスト細胞脱顆粒過程における PI3K 経路の役割解明
 発表学会 第39回日本分子生物学会年会
 発表年月 2016年11月
- 10 著者名 松田達志、澤田和孝、合田昌史、村田昌行、吉澤敏男、住吉麻実
 発表題目 新規 Itk 阻害剤を用いた T細胞機能制御
 発表学会 第26回 Kyoto T cell Conference
 発表年月 2016年5月
- 11 著者名 大野絹代、増田成美、小河穂波、住吉麻実、早川夏姫、稲垣綾華、大塚

- 瑞希、中尾知美、鈴木麻衣、田中宏和、森田詠子、酒井良明、渡邊利雄
- 発表題目 クラスリン集合タンパク質 CALM 欠損が及ぼすメラニン産生への影響
- 発表学会 第 62 回日本生化学会近畿支部例会
- 発表年月 2015 年 5 月
- 12 著者名 住吉麻実、小河穂波、早川夏姫、鈴木麻衣、松居靖久、渡邊利雄
- 発表題目 SMAP (Small Arf GAP) 1,2 両遺伝子欠損胚は致死でアポトーシスを起こしている (口頭発表)
- 発表学会 第 37 回日本分子生物学会年会
- 発表年月 2014 年 11 月
- 13 著者名 住吉麻実、早川夏姫、小河穂波、西川紗織、鈴木麻衣、昆俊介、佐竹正延、田邊賢司、田沼延公、島礼、渡邊利雄
- 発表題目 GTP 脱リン酸化酵素の ARF とその活性化因子 SMAP の欠損マウス解析
- 発表学会 第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
- 発表年月 2014 年 2 月
- 14 著者名 小河穂波、住吉麻実、早川夏姫、田沼延公、島礼、渡邊利雄
- 発表題目 癌への関与が注目される Ppp6 遺伝子を欠損するマウスの作製と解析
- 発表学会 個体レベルのがん研究ワークショップ
- 発表年月 2014 年 2 月

研究資金獲得実績

- 1 2019 年～2020 年度 文部科学省科学研究費・若手研究 (研究代表者)
小胞輸送制御因子 Arf を介した pathogenic Th17 細胞制御機構の解明
- 2 2018 年度 関西医科大学・H30 学内助成 D1 (研究代表者)
Arf ファミリーは自己免疫疾患の新規治療ターゲットとなり得るか?
- 3 2016 年度 関西医科大学・H28 学内助成 D1 (研究代表者)
新規樹立 Arf1-fl/fl マウスを活用した T 細胞における Arf ファミリーの生理機能解明