

Shootin1b の上皮組織における局在解析  
および樹状細胞における機能解析

東口 泰奈

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 神経システム生物学研究室

(稲垣 直之 教授)

平成 30 年 09 月 10 日提出

# 目次

序論.....	3
クラッチ分子 <b>Shootin1a</b> .....	3
細胞移動におけるクラッチ分子.....	6
上皮組織.....	6
樹状細胞.....	7
本研究の目的.....	9
材料と方法.....	10
<b>Shootin1</b> 欠損マウス.....	10
マウス遺伝子型の判定.....	10
タンパク質の精製.....	11
各臓器からのタンパク質の回収.....	11
ウェスタンブロッティング.....	12
組織免疫染色.....	12
細胞培養.....	13
・ マウス乳腺上皮細胞株 (EpH4, MTD-1A).....	13
・ マウス骨髄由来樹状細胞.....	13
細胞免疫染色.....	13
・ 乳腺上皮細胞株 (EpH4, MTD-1A).....	13
・ 樹状細胞.....	14
細胞内一分子計測.....	14
・ 樹状細胞への遺伝子導入.....	14
・ 一分子計測用のアガロースゲルの作製.....	15
・ 細胞内一分子計測.....	15
フローサイトメトリー.....	15
3次元環境下における <b>migration assay</b> .....	16
有意差検定.....	16
結果.....	17
1. 抗 <b>Shootin1b</b> 抗体は <b>Shootin1b</b> を特異的に認識する.....	17
2. <b>Shootin1b</b> は様々な組織に発現する.....	17
3. <b>Shootin1b</b> は上皮組織に発現が認められる.....	19
4. <b>Shootin1b</b> は上皮細胞の細胞膜近傍で E-cadherin、Cortactin と共局在する.....	19
5. <b>Shootin1b</b> は樹状細胞に発現し、先端端に濃縮する.....	27
6. <b>Shootin1b</b> は樹状細胞の先端端で F-actin、Cortactin、L1-CAM と共局在する.....	27
7. <b>Shootin1b</b> は樹状細胞の先端端で逆行性に移動する.....	31

8. 樹状細胞の成熟化に Shootin1b は関与しない.....	31
9. Shootin1b は樹状細胞においてクラッチ分子として機能する.....	34
10. Shootin1b は細胞移動のための細胞極性の形成に関与する.....	34
11. Shootin1b は樹状細胞の移動に関与する.....	34
考察.....	38
Shootin1b は上皮細胞に発現し、細胞膜近傍に局在する.....	38
Shootin1b は樹状細胞に発現し、接着性の移動に関与する.....	38
謝辞.....	40
参考文献.....	41

## 序論

生物が恒常性を維持するためには、発生過程の組織形成や免疫応答、創傷治癒など様々な生命現象を正常に機能させることが必要不可欠である。そしてこれらの生命活動に重要な細胞の働きとして、細胞移動が挙げられる。この細胞移動を正常に機能させるための中心的な役割を担う分子が、アクチン細胞骨格と細胞接着分子である。

細胞が移動するためには、様々な段階を踏む必要がある。まず移動性細胞は、細胞外シグナルに応答してアクチン重合を活発化させ、糸状仮足や葉状仮足を形成して細胞膜を突出させる必要がある。そして、突出させた細胞膜内のアクチン線維 (F-actin) を細胞外基質に連結させ、細胞体を牽引するための力とする。最後に、後方側でアクチンミオシンの収縮により細胞膜を退縮させ、細胞外基質との接着を切り離すことで細胞は前進する (Clainche & Carlier, 2008)。

### クラッチ分子 Shootin1a

当研究室では、神経細胞の軸索形成分子である Shootin1a を同定している。Shootin1a は軸索先端の成長円錐に濃縮し、神経細胞の極成形成を引き起こす重要なタンパク質であることが示された (Toriyama et al., 2006)。神経細胞の成長円錐は、ダイナミックにその構造を変化させながら移動することで軸索を形成することが知られており (Dent & Gertler, 2003)、この軸索成長円錐を前方に移動させる分子メカニズムとしてクラッチモデルが提唱されている (Mitchison & Kirschner, 1988)。成長円錐において F-actin は、成長円錐の先端での重合と F-actin 後方での脱重合を繰り返しており、Myosin II の働きによって後方へ移動する (アクチン逆行性移動)。軸索伸長の牽引力を生み出すには、この逆行性移動する F-actin を細胞外基質へ接着させる“クラッチ分子”の存在が重要と考えられている (Mitchison and Kirschner, 1988)。近年、当研究室において、Shootin1a が F-actin と細胞接着分子 L1-CAM の結合を仲介するクラッチ分子として機能し、軸索伸長を促進することが明らかとなった (Shimada et al., 2008)。Shootin1a は、F-actin 結合タンパク質である Cortactin と直接結合し、また細胞接着分子 L1-CAM とも直接結合することが示されている (Kubo et al., 2015; Baba et al., 2018)。

Shootin1a にはスプライスバリエントである Shootin1b が存在する (勝田 未発表データ) (図 1)。Shootin1b は、Shootin1a と共通のアミノ酸配列を N 末端側に持ち、Shootin1a の C 末端側 3 アミノ酸が 178 アミノ酸に置換された配列を有するが、機能は不明であった。しかし本研究によって、Shootin1b が上皮組織並びに代表的な末梢リンパ組織である脾臓に発現することが分かり、免疫細胞の一種である樹状細胞に発

現することが明らかとなった（後述）。

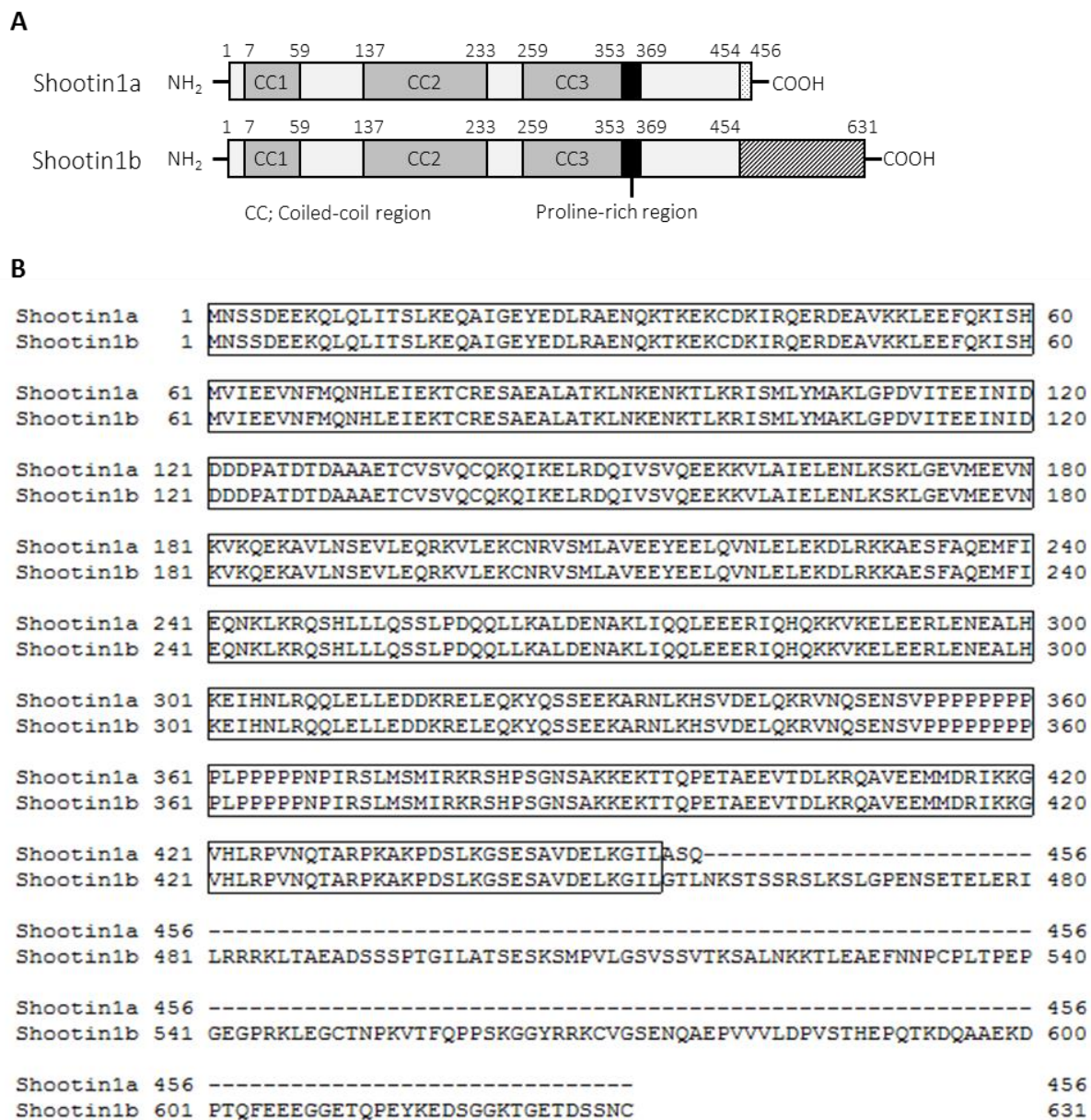


図 1. Shootin1a 及び Shootin1b のアミノ酸配列

A) マウス Shootin1a 及び Shootin1b アミノ酸配列の模式図。

B) マウス Shootin1a 及び Shootin1b のアミノ酸配列。453 – 631 アミノ酸が Shootin1b 特異的な領域として存在 (抗 Shootin1b 抗体作製領域)。

## 細胞移動におけるクラッチ分子

神経細胞の成長円錐と同様、細胞移動においてもクラッチモデルが提唱されている。クラッチ分子の候補として、これまでに Vinculin、Talin、Catenin などが報告されており (Case and Waterman, 2015)、これらの分子との連結が切れると、スリップが生じてアクチン逆行性移動の速度が上昇し、細胞膜の突出率が低下することが報告されている (Carlos et al., 2005)。また Vinculin や Talin は、Integrin と結合して Focal adhesion (FA) を形成することが知られている (Giannone et al., 2009)。FA に局在するタンパク質は約 90 種類にもものぼり、さらにそれらのタンパク質と相互作用し得るタンパク質は 60 種類以上存在する (Zaidel-bar et al., 2007)。FA は、葉状仮足の先端部で形成され、逆行性移動する F-actin と連結し、細胞を牽引するための力を生み出していると考えられているが、アクチン逆行性移動に伴って細胞体側に近づいた FA は、構成するタンパク質の数が増加し、細胞外基質との接着が強固となるため細胞を牽引するための力は小さくなると考えられている (Beningo et al., 2001)。このように、FA を構成するクラッチ候補分子は、アクチン逆行性移動との関連性が示された報告はあるものの、構成タンパク質の種類の多さや成熟度による機能的な違いから解析が難しく、クラッチ分子としての実態は未だ明らかになっていない。

## 上皮組織

アクチン細胞骨格と細胞接着分子の結合は、上皮組織における細胞間接着にも重要な役割を果たしている。上皮は、体表面を覆う表皮や消化管などの内腔を覆う細胞シートである。細胞同士が互いに密着して結合することにより、生体の内と外を明確に分ける隔壁として機能する。上皮細胞の細胞 - 細胞間の接着は、タイトジャンクション (TJ)、アドヘレンスジャンクション (AJ)、デスモソーム、ギャップジャンクションの 4 種類からなる。Claudin や Occludin によって形成される TJ は、細胞同士をぴったりと接着させることで頂端側と基底層側を物理的に隔離させ、物質の透過を制限する。デスモソームは、カドヘリンファミリーの Desmoglein、Desmocollin によって細胞内の中間径フィラメントと連結し、細胞間接着に機械的な強度を生む。ギャップジャンクションは、隣り合う 2 つの細胞間でチャンネルを形成し、イオンや小分子を通過させて情報伝達を行っている。細胞間接着の中でも AJ は、上皮組織全体の力の調節を担う接着装置として重要である (Guillot & Lecuit, 2013)。AJ は、E-cadherin のホモフィリック結合によって接着しており、細胞内では  $\alpha$ 、 $\beta$ -catenin を介して F-actin に連結される。上皮細胞は、この連結された F-actin によって、隣り合う細胞同士でミオシンの収縮力を共有し、細胞形態や組織構造を変化させることが可能となる。アクトミオシンによって張力が生じた際、細胞内では、 $\alpha$ -catenin の構造変化が起きる。次いでアクチン結合タンパク質である vinculin がリクルートされることにより AJ は強

化される (Yonemura et al., 2010)。また、同じアクチン結合タンパク質である Cortactin は、E-cadherin と相互作用しており、新規 AJ の伸展や上皮細胞の形態維持、E-cadherin の細胞間接着部位への局在化を制御している (Helwani et al., 2004; Ren et al., 2009)。これら細胞間接着の機能破綻は、細胞形態や組織形成に異常を生じさせ、細胞の癌化など様々な疾患に関与することが知られている。

## 樹状細胞

樹状細胞は、脾臓やリンパ節など末梢リンパ組織に存在する樹状様の突起を持った細胞として、Ralph M. Steinman らにより同定された (Steinman & Cohn, 1973)。樹状細胞は、生体内に侵入した病原体を取り込み、感染部位近傍のリンパ節 (所属リンパ節) へ移動し、ナイーブ T 細胞の活性化を行う抗原提示細胞である。活性化されたナイーブ T 細胞はエフェクター T 細胞へと分化し、感染部位へ移動して抗原の除去を開始するため、樹状細胞は適応免疫応答を開始させる重要な役割を担っている。一方で、感染・炎症が生じていない状態の組織では、樹状細胞は T 細胞の活性化能力を持たない未成熟樹状細胞として存在する。病原体が体内に侵入した際、未成熟樹状細胞は、細胞膜に存在する Toll 様レセプター (TLR) を介して病原体分子を認識し、成熟を開始させる (Reis E Sousa, 2004)。この成熟過程で樹状細胞は、病原体タンパク質由来のペプチドと複合体を形成した MHC クラス II の発現を上昇させ、ナイーブ T 細胞の補助刺激因子 CD80、CD86 を強発現させる。また、ケモカイン受容体である CCR7 の発現を上昇させ、リンパ節の細胞から分泌されている CCL19、CCL21 に従って所属リンパ節へと遊走を行う。これらのケモカインは、Cdc42、Rac、RhoA といった Rho ファミリー GTPase の活性を制御し、細胞内のアクチン再構築を引き起こす (Ward, 2006; Yanagawa & Onoé, 2002)。Cdc42 欠損樹状細胞は、3D 環境下における移動能が低下することから (Lammermann et al., 2009)、これら Rho ファミリー GTPase の活性が樹状細胞の移動に重要であると考えられる。

また、樹状細胞は細胞外基質の性質に合わせ、“非接着性”と“接着性”の 2 種類の移動メカニズムを持つと考えられている (Renkawitz and Sixt, 2010) (図 2)。非接着性の移動では、樹状細胞は、細胞の先端端で F-actin の重合と脱重合の頻度を上げ、細胞膜を突出させることで移動する。接着性の移動では、細胞の先端端で F-actin の重合と脱重合を行い、アクチン逆行性移動の駆動力を細胞外基質へ伝え、細胞を牽引する力とし、移動する。つまりクラッチモデルが提唱されている。過去の報告では、細胞接着分子である Integrin を介したクラッチシステムが存在する可能性が示唆されているが、Integrin 欠損樹状細胞は野生型樹状細胞と同等の遊走能を有しており、クラッチ分子の実態及び移動メカニズムの詳細は分かっていない (Renkawitz et al., 2009)。



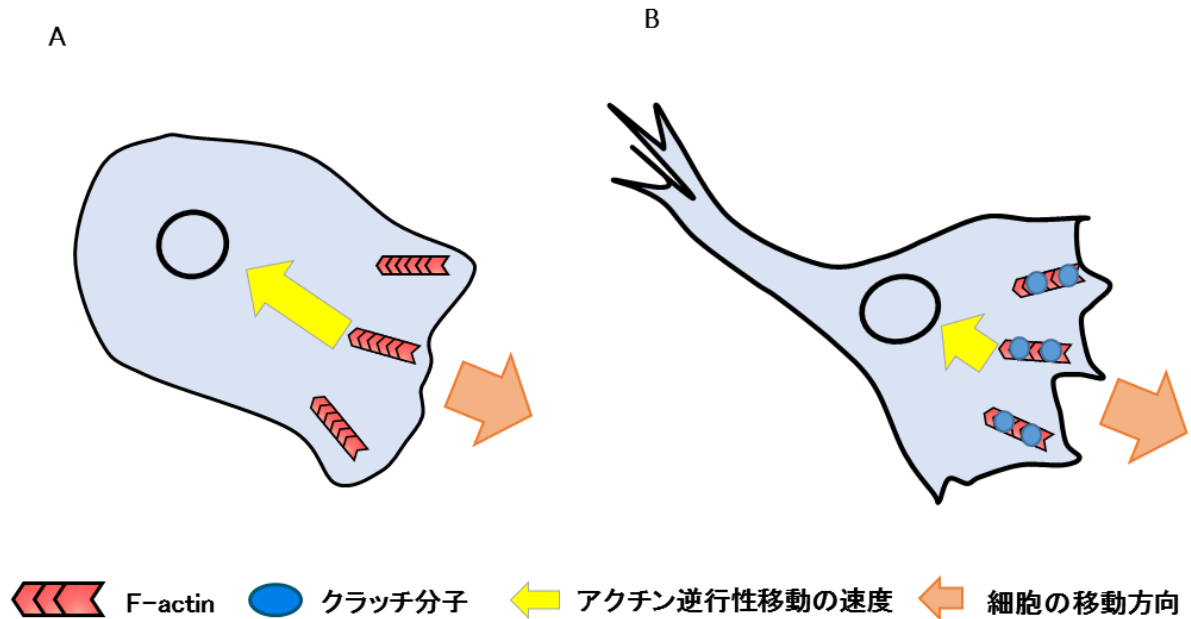


図 2. 樹状細胞の移動メカニズムの模式図

樹状細胞は、アクチン線維の逆行性移動を駆動力とし、細胞移動を行う。樹状細胞には、非接着性と接着性の移動メカニズムが存在する。

- A) 基質非接着性の移動メカニズム。細胞先端部でアクチンの重合・脱重合を活発に行い、アクチン逆行性移動の速度を速めることで細胞膜を突出させ前進する。
- B) 基質接着性の移動メカニズム。細胞先端部でアクチンの重合・脱重合を行い、細胞接着分子を介してアクチン逆行性移動の駆動力を細胞基質へ伝達し、牽引力をもって移動する。クラッチ分子が関与すると考えられているが詳細は分かっていない。

## 本研究の目的

上皮細胞や樹状細胞は、Shootin1a と相互作用するタンパク質 Cortactin を発現しており (Bañón-Rodríguez et al., 2011; Helwani et al., 2004) 、樹状細胞では更に L1-CAM の発現が確認されている (Maddaluno et al., 2009) 。Shootin1b はこれらの分子との結合領域を有しており (Kubo et al. 2015; Baba et al., 2018) 、Shootin1a と類似した機能を持つ可能性が考えられる。そこで本研究では、上皮細胞や樹状細胞といった神経細胞以外の末梢組織における Shootin1b の機能解明を目指した。

## 材料と方法

### Shootin1 欠損マウス

本研究において使用した野生型マウス及び Shootin1 欠損マウスの系統維持には、日本エスエルシー株式会社及び日本クレア株式会社から購入した C57BL/6 マウスを使用した。Shootin1 欠損マウスは以下の方法で当研究室により作製された。

LacZ-neomycin resistance (LacZ-neor) 遺伝子の上流と下流をマウス Shootin1 遺伝子の Exon1 上流 4.8 kbp 及び下流 2.7 kbp の相同配列で挟んだベクターが作製された。相同配列と LacZ-neor 遺伝子を含む DNA 鎖が制限酵素処理によって切り出され、切り出された DNA 鎖は、エレクトロポレーション法にて 129 マウス由来の ES 細胞に遺伝子導入された。相同組換えにより Shootin1 遺伝子の Exon1 が LacZ-neor 遺伝子に置換された ES 細胞は、ネオマイシンによる薬剤スクリーニングにより選別された。この ES 細胞を C57BL/6 マウスの胚胞へインジェクションし、得られたキメラマウスを C57BL/6 マウスと掛け合わせ、Shootin1 欠損マウスの系統が作製された。本 Shootin1 欠損マウスは、サザンブロット法により Shootin1 遺伝子が組み替えられていることが確認され、さらにウェスタンブロット法により Shootin1a および Shootin1b の発現が検出されないことが確認された。

本研究では、7 回以上バッククロスが行われた Heterozygous マウス同士を交配し、得られた Homozygous マウスを Shootin1 欠損マウスとして使用した。また、コントロールとして野生型マウス (C57BL/6 マウス) を使用した。

### マウス遺伝子型の判定

マウス尾部の先端を 5 mm 程度切り取り、50 mM NaOH (Nacalai) 水溶液 180  $\mu$ L に加えて 45 秒間ボルテックスした。その後 95°C で 10 分間インキュベートし、再度 45 秒間ボルテックスした。そこに 1 M Tris-HCl (pH 8.0, Nacalai) 20  $\mu$ L を加えて 10 秒間ボルテックスし、10 分間遠心 (4°C、15,000 rpm) した。得られた遠心上清を PCR 反応のための DNA テンプレートとして用いた。PCR 反応には KOD FX (TOYOBO) を使用し、94°C 2 分を 1 サイクル、98°C 10 秒、60°C 30 秒、68°C 30 秒を 30 サイクル、72°C 2 分を 1 サイクルの条件で行った。PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動を行い、アガロースゲルを Etidium bromide (Nacalai) 水溶液に浸してから GelDoc-It<sup>TM</sup> Imaging System (UVP) によりバンドサイズを確認した。Shootin1 欠損マウスの場合では 420bp、野生型マウスでは 200bp の位置にバンドが確認される。

使用したプライマーを以下に示す。

## 使用プライマー一覧

プライマーの種類	配列
Forward 1	5' -CAGACTGCTACCCACTACCCCCTAC- 3'
Reverse 1	5' -CCTAGAGCTGGACAGCGGATCTGAG- 3'
Forward 2	5' -CCCAGAAAGCGAAGGAACAAAGCTG- 3'
Reverse 2	5' -ACCTTGCTCCTTCAAGCTGGTGATG- 3'

## タンパク質の精製

Shootin1a (Human) と Shootin1b (Rat) の全長をpGEX-6P-1ベクターに組み込み、構築したベクターを大腸菌BL21 (codon plus) に形質転換した。50 µg/mL Ampicilinを含むLBプレート上で一晩培養し、シングルコロニーを採取して50 µg/mL Ampicilinを含むLB培地で一晩振盪培養した。その後、培養液を新たなLB培地 (50 µg/mL Ampicilinを含む) に移し、37°C、200 rpmでOD値が0.4~0.6になるまで培養した。培養後、培地を冷やすために16°Cで30分培養し、終濃度0.1 mMになるように

Isoproryl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, ナカライ) を添加、その後16°Cで一晩培養した。遠心 (4,000 rpm, 4°C, 15分) によって上清を除き、氷冷した1×PBSで再懸濁した。再度遠心 (4,000 rpm, 4°C, 15分) によって上清を除き、菌体重量を測定した。菌体重量の3倍量のTED buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) を加えて再懸濁し、超音波処理を行った。破碎後、超遠心 (36,000 rpm, 4°C, 60分) によって可溶性画分を回収し、0.45 mmのフィルターを用いて濾過した。溶液のpHを8.0に調整した後、予めTED bufferで平衡化したGlutathione sepharose 4B (GE healthcare) を加え、4°Cで2時間回転混和した。遠心 (3,000 rpm, 4°C, 30秒) 後、500 mM NaClを含むTED bufferでGlutathione sepharose 4Bを洗浄し、15 mMの還元型グルタチオンを含むTED bufferでGST融合タンパク質の溶出を行った。その後、1×PreScission Protease (GE healthcare) と反応させ、GSTを切断した。GSTは再びGlutathione sepharose 4Bと反応させることで除去し、精製タンパク質を得た。回収したタンパク質はMini Dialysis kit (GE healthcare) を用いて透析を行った。

## 各臓器からのタンパク質の回収

成体及び胎生18.5日目 (E18.5) のC57BL/6マウスから脳、心臓、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、脾臓、膵臓、腎臓、骨格筋、皮膚を回収し、各臓器の重量の3倍量のRIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 µg/mL leupeptin, 10 mM NaF and 1mM DTT) を加え、タンパク質抽出を行った。抽出したタンパク質溶液は、氷上で15分静置した後、17,500 rpm、4°Cで15分遠心した。遠心後、上清を新しいチューブに移し、5× SDS sample bufferを加えてSDS-PAGEに用いるサンプルとした。

## ウェスタンブロッティング

サンプルをポリアクリルアミドゲル (濃度8%) にアプライし、SDS-PAGEを行った後、Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell (Bio-Rad) を使用してアクリルアミドゲルからPVDF 膜 (Millipore) へタンパク質の転写を行った (2 mA/cm<sup>2</sup>、室温、90 分)。転写後のPVDF 膜は、3%スキムミルクを含むTBST (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) 溶液で室温にて1時間ブロッキングした。その後3%スキムミルク/TBSTで一次抗体を希釈し、4°Cで一晩反応させた。一次抗体反応後、PVDF膜をTBSTで3回洗浄し、1%スキムミルク/TBSTで希釈した二次抗体を用いて室温で1時間反応させた。その後、TBSTで3回洗浄し、ECL試薬 (GE healthcare) を用いて、タンパク質のシグナルをX線フィルム (Fuji film) に感光させて検出した。使用した抗体を以下に示す。

## 抗体一覧

抗体名	動物種	メーカー	希釈倍率
Anti-shootin1	Rabbit	当研究室にて作製	x500
Anti-shootin1b	Rabbit	当研究室にて作製	x20,000
Anti-actin	Mouse	Millipore	x10,000
Anti-rabbit IgG HRP	Goat	Amersham	x2,000
Anti-mouse IgG HRP	Goat	Molecular Probe	x5,000

## 組織免疫染色

成体及びE18.5のマウスから肺、肝臓、胃、小腸、大腸、脾臓、膵臓、皮膚を回収し、固定液が浸透しやすいように余分な組織を切り落とした。1×PBSで洗浄後、4% PFAで1時間固定した。1×PBSで30分洗浄し、これをさらに2回繰り返した。1×PBSを15%スクロース/PBSに置換し、組織片がチューブの底に沈むまで4°Cで浸透させ、30%スクロース/PBSに置換して一晩浸透させた。続いて30%スクロースとO.C.T.コンパウンド (Sakura) を1:2の割合で混合した溶液に置換し、6時間浸透させた。その後、O.C.T.コンパウンドに包埋し、液体窒素で冷やしたイソペンタンを用いて凍結させた。凍結させた組織ブロックはクライオスタットで8 μmの切片にし、スライドグラスに貼り付けた。スライドグラスはドライヤーで15分間乾燥させ、1×PBで3回洗浄した。その後、blocking buffer (10% NGS, 0.3% Triton X-100/ PB) をスライドグラス上にのせ、室温で2時間静置してブロッキングした。ブロッキング後、blocking bufferで希釈した一次抗体溶液をのせ、4°Cで一晩反応させた。一次抗体反応後、0.3% Triton X-100を含む1×PB (1×PBT) で3回洗浄した。その後、blocking bufferに希釈した二次抗体溶液をスライドグラスにのせ、4°Cで一晩反応させた。1×PBTで3回洗浄した後、1 mg/mLの4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Roche) で5分反応させ、核染色を行った。その後、50% Glycerol/ PBSで封入し、カバーガラスをのせてトップコートで密閉した。組織切片の観察には共焦点顕微鏡 (LSM 700またはLSM 710、ZEN2009、Plan-Apochromat 20x

0.8 M27, Plan-Apochromat 40x 1.3 oil DIC M27, Plan-Apochromat 63x 1.40 oil M27; Carl Zeiss) を使用した。使用した抗体を以下に示す。

#### 抗体一覧

抗体名	動物種	メーカー	希釈倍率
Anti-shootin1b	Rabbit	当研究室にて作製	x20,000
Anti-E-cadherin	Mouse	BD Biosciences	x1,000
Anti-cortactin	Mouse	Millipore	x100
Anti-CD11c	Hamster	BD Biosciences	x100
Anti-rabbit IgG alexa 488	Goat	Invitrogen	x1,000
Anti-mouse IgG alexa 594	Goat	Invitrogen	x1,000
Anti- Armenian hamster IgG alexa 594	Goat	Jackson Immuno Reseach	x500

#### 細胞培養

##### ・マウス乳腺上皮細胞株 (EpH4, MTD-1A)

EpH4ならびにMTD-1Aは徳島大学医学部病態予防医学講座細胞生物学分野の米村重信教授の御厚意により頂いた。これらの細胞は、10% FBSを含むDulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Sigma) 中、CO<sub>2</sub>濃度5%、37°Cのインキュベータ内で培養した。

##### ・マウス骨髄由来樹状細胞

成体マウスの脛骨と大腿骨を8% FBS、0.1% 2-mercaptoethanol (GIBCO) 、100 U Penicillin/ 100 µg/mL Streptomycin (Nacalai) を含むRPMI-1640 (Sigma) に取り出し、25G針を用いて骨髄を回収した。その後、細胞を懸濁し、70 µmのセルストレイナーで濾過して細胞溶液を回収した。チュルク染色液 (Nacalai) で細胞数を数え、 $1 \times 10^7$  cellをチューブに分注し、1,300 rpm、室温で5分間遠心した。上清を除いたのち、10 ng/mL recombinant murin Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) (Peprotech) を含む上記のRPMI-1640培地に再懸濁し、CO<sub>2</sub>濃度5%、37°Cのインキュベータ内で培養した。培養2日目に培地を7割除去し、GM-CSFを含む新しい培地に交換した。培養4日目に半量の細胞培養培地を新しいディッシュに移し、GM-CSFを含む培地を新たに添加、培養6日目にさらに培地を追加した。以降の実験には培養7日目から10日目の細胞を用いた。

#### 細胞免疫染色

##### ・乳腺上皮細胞株 (EpH4, MTD-1A)

細胞を予め、50 µg/mL Fibronectin (Sigma) でコーティングしたカバースリップに播種した。1%ホルムアルデヒド/PBSを加え、室温で15分間静置して細胞を固定した。

氷冷したPBSで固定液を3回洗浄したのち、0.2% Triton X-100を含むPBSに置換し、4°Cに10分静置して透過処理を行った。その後、blocking buffer (10 % FBS/ PBS) に置換し、室温で1時間静置してブロッキングを行った。カバースリッスを24穴マイクロプレート(IWAKI) の上蓋に取り出し、blocking bufferで希釈した一次抗体を加えて4°Cで一晩反応させた。一次抗体反応後、カバースリッスを1×PBSにつけて洗浄し、4°Cで1時間静置した。その後、カバースリッスを24穴マイクロプレートの上蓋に取り出し、1% FBS/ PBSで希釈した二次抗体をのせ、遮光して1時間、室温で静置した。二次抗体反応後、カバースリッスを1×PBSにつけて洗浄し、室温で30分静置した。その後、Phalloidin染色を行う際には、1×PBSで希釈したPhalloidinをカバースリッスにのせ、室温で30分反応させた。また、DAPI染色を行う際には、1×PBSで希釈したDAPIをカバースリッスにのせ、室温で5分反応させた。その後、1×PBSで洗浄し、カバースリッスをスライドガラスにのせて、50 % Glycerolを含むPBSで封入し、トップコートで密閉した。細胞の観察には共焦点顕微鏡 (LSM 700またはLSM 710、ZEN2009、Plan-Apochromat 20x 0.8 M27, Plan-Apochromat 40x 1.3 oil DIC M27, Plan-Apochromat 63x 1.40 oil M27; Carl Zeiss) を使用した。使用した抗体を下記に示す。

#### ・樹状細胞

細胞を予め、10 µg/mL Laminin (Wako) でコーティングしたカバースリッスに播種した。3.7%ホルムアルデヒド/PBSを加え、室温で10分間静置して細胞を固定した。氷冷したPBSで固定液を3回洗浄したのち、0.05% Triton X-100を含むPBSに置換し、4°Cに15分静置して透過処理を行った。その後、blocking buffer (10 % FBS/ PBS) に置換し、室温で1時間静置してブロッキングを行った。以降は乳腺上皮細胞を使用した際と同じ手法で行った。細胞の観察には蛍光顕微鏡 (Axioplane 2、Axiovision 3、Plan-Apochromat×63 oil 1.40 NA; Carl Zeiss) を使用した。使用した抗体を以下に示す。

#### 抗体一覧

抗体名	動物種	メーカー	希釈倍率
Anti-shootin1b	Rabbit	当研究室にて作製	x10,000
Anti-E-cadherin	Mouse	BD Biosciences	x200
Anti-cortactin	Mouse	Millipore	x100
Anti-rabbit IgG alexa 488	Goat	Invitrogen	x1,000
Anti-mouse IgG alexa 594	Goat	Invitrogen	x1,000

#### 細胞内一分子計測

##### ・樹状細胞への遺伝子導入

上記のように培養した細胞培養培地から、非接着性もしくは弱接着性の細胞を回収し、Mouse Dendritic Cell Nucleofector Kit (Lonza) を使用してエレクトロポレーション法により目的プラスミドDNAを細胞内に導入した。まずは $5 \times 10^5$  cellを遠心 (1,300 rpm,

室温, 5分) し、Mouse DC Nucleofector Solution 82  $\mu\text{L}$ とNucleofector Solution plus 18  $\mu\text{L}$ の混合液に懸濁した。0.5-1.0  $\mu\text{g}$ のプラスミドDNA を加え、専用キュベットに入れてNucleofector TypeI (Lonza)のプログラム“Y-01”により電圧ポレーションを行った。キュベットにGM-CSFおよび500 ng/mL Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) を含む培地を添加したのち、細胞を回収、24穴マイクロプレートに播いて一晩培養した。LPSを添加することで樹状細胞の成熟を促した。

#### ・一分子計測用のアガロースゲルの作製

20% FBSを含むRPMI-1640 mediumと2 $\times$ HBSS buffer (Sigma) を2 : 1の割合で混合し、56 $^{\circ}\text{C}$ に温めた。また、2.5% UltraPure Agarose (Thermo Fisher Scientific) 溶液を電子レンジで加熱、ボルテックスにかけて溶解させた。その後、2.5% UltraPure Agarose溶液とRPMI-1640 medium、2 $\times$ HBSS bufferを1 : 2 : 1の割合で混合 (アガロースゲル終濃度 : 0.625%) し、予めLamininコーティングを行った35 mmガラスボトムディッシュ (Matsunami) に2 mL添加した。室温で固まるまで静置し、固まった後に、間隔が1 mm幅になるように直径3.5 mmの穴を2ヶ所空けた。使用するまでは4 $^{\circ}\text{C}$ に保存し、使用直前にCO<sub>2</sub>濃度5 %、37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベータに30分間置いて平衡化した。

#### ・細胞内一分子計測

遺伝子導入し、LPS刺激を行った樹状細胞を回収し、8% FBSを含むL-15 medium (8% FBS/ L-15 medium) (Thermo Fisher Scientific) 15  $\mu\text{L}$ に懸濁した。その後、上記のように作製したアガロースゲルの一方の穴に細胞溶液を添加した。もう一方にはケモカインであるCCL19を終濃度0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように8% FBS/ L-15 mediumで希釈し、添加した。その後、細胞がケモカインに反応してアガロースゲルの下を移動し始めるまでCO<sub>2</sub>濃度5 %、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。細胞が移動し始めたら、全反射照明蛍光顕微鏡; Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) (IX81; Olympus, MetaMorph; MDS, UApo N 150 $\times$ /1.45 oil; Olympus) を用いて、撮影を行った。撮影は3秒間隔で行い、取得した蛍光イメージはImageJを用いてキモグラフの作成を行った。

#### フローサイトメトリー

LPS を含む培地で一晩培養した成熟樹状細胞を回収し、上清を除去した細胞にFACS buffer (1% BSA, 2 mM EDTA pH7.2, D-PBS) を加えて懸濁した。トリパンブルー (Nacalai)で細胞数を測定し、1 サンプル当たり  $1 \times 10^7$  cell/mL となるように分注した。続いて、Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (BD Bioscience) を 100 希釈となるように加えて氷上で 15 分静置し、ブロッキングした。その後、各一次抗体を添加し、遮光化、氷上で 15 分静置した。一次抗体反応後、遠心 (1,300 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5 分) し、上清を除いた。FACS buffer を加えて、遠心 (1,300 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5 分) し、この遠心洗浄操作を 2 回ずつ行った。遠心洗浄後、FACS buffer 400  $\mu\text{L}$  を加えて細胞を再懸濁し、BD AccuriTM C6 フローサイトメーター (BD) を用いて細胞膜表面に存在するタンパク



質の発現を調べた。使用した抗体を以下に示す。

#### 抗体一覧

抗体名	動物種	メーカー	添加量
Anti-CD11c, APC	Armenian Hamster	eBioscience	0.25 µg/test
Anti-MHC ClassII, PE	Mouse	eBioscience	0.25 µg/test
Anti-CD80, PE	Rat	eBioscience	0.5 µg/test

### 3次元環境下における migration assay

LPSを含む培地で一晚培養した成熟樹状細胞を回収した。 $9 \times 10^5$  cellを遠心 (1,300 rpm, 4°C, 5分) し、ゲル溶液 (1.5 mg/mL collagen type I (CORNING), 10% matrigel (CORNING)) 300 µLに細胞を懸濁した。その後、ゲル懸濁液6 µLをケモタキシス解析用チャンバーµ-Slide Chemotaxis 3D (Ibidi) にアプライし、CO<sub>2</sub>濃度5%、37°Cで30分間インキュベートしてゲルを固めた。その後、両側のウェルに8% FBS/ L-15 medium 65 µLを添加、さらに片側のみに2.71 µg/mL CCL19を含む8% FBS/ L-15 medium 30 µLを添加し (終濃度; 1.25 µg/mL)、CO<sub>2</sub>濃度5%、37°Cで2時間インキュベートした。インキュベート後、倒立顕微鏡 (IX81; Olympus、MetaMorph; MDS、UPlanFL N 10×/0.30 ph1; Olympus) を用いて撮影を行った。定量解析にはImageJを用いた。

### 有意差検定

有意差検定を行う際は、f-testにより解析するデータの分散が等しいかどうかを調べ、等分散の場合はStudent's *t*-testを実施し、不等分散の場合はWelch's *t*-testを行った。

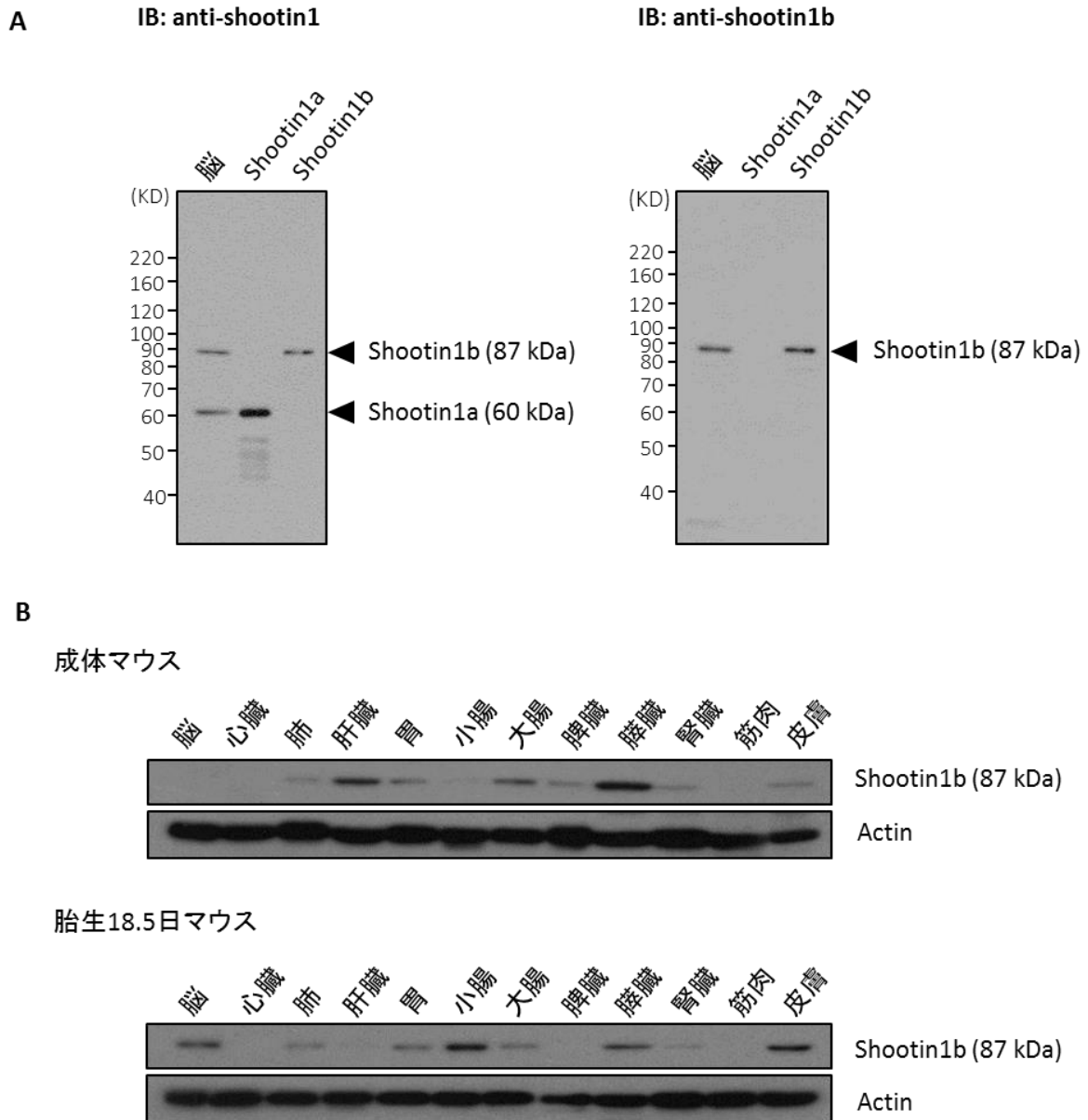
# 結果

## 1. 抗 Shootin1b 抗体は Shootin1b を特異的に認識する

Shootin1a と Shootin1b は、共通したアミノ酸配列 (1 – 453 アミノ酸) を有する (図 1A)。そのため、既に作製されている抗 Shootin1b 抗体が Shootin1b を特異的に認識するかを調べるため、胎生 18.5 日目 (E18.5) のマウスの脳と精製 Shootin1a、精製 Shootin1b タンパク質を使用し、ウェスタンブロットによって抗体の検証を行った。Shootin1a、Shootin1b の両タンパク質を検出する抗 Shootin1 抗体では、87kDa 付近と 60kDa 付近にバンドが検出された。これは、精製 Shootin1a、精製 Shootin1b タンパク質を用いた際に見られるバンドサイズと同じであった (図 3A 左)。一方、抗 Shootin1b 抗体を用いた解析では、Shootin1a のバンドは検出されず、87kDa の Shootin1b のバンドのみが検出された (図 3A 右)。よって、抗 Shootin1b 抗体は、Shootin1b を特異的に認識する抗体であることが示された。

## 2. Shootin1b は様々な組織に発現する

Shootin1b の各臓器におけるタンパク質の発現を調べるため、成体マウスならびに E18.5 マウスの脳、心臓、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、脾臓、膵臓、腎臓、骨格筋、皮膚からタンパク質を回収し、抗 Shootin1b 抗体を用いたウェスタンブロットによって解析した。その結果、成体マウスでは、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、脾臓、膵臓、皮膚に Shootin1b のバンドが検出され、E18.5 マウスでは、脳、肺、胃、小腸、大腸、膵臓、皮膚にバンドが検出された (図 3B)。



**図 3. Shootin1b の発現解析**

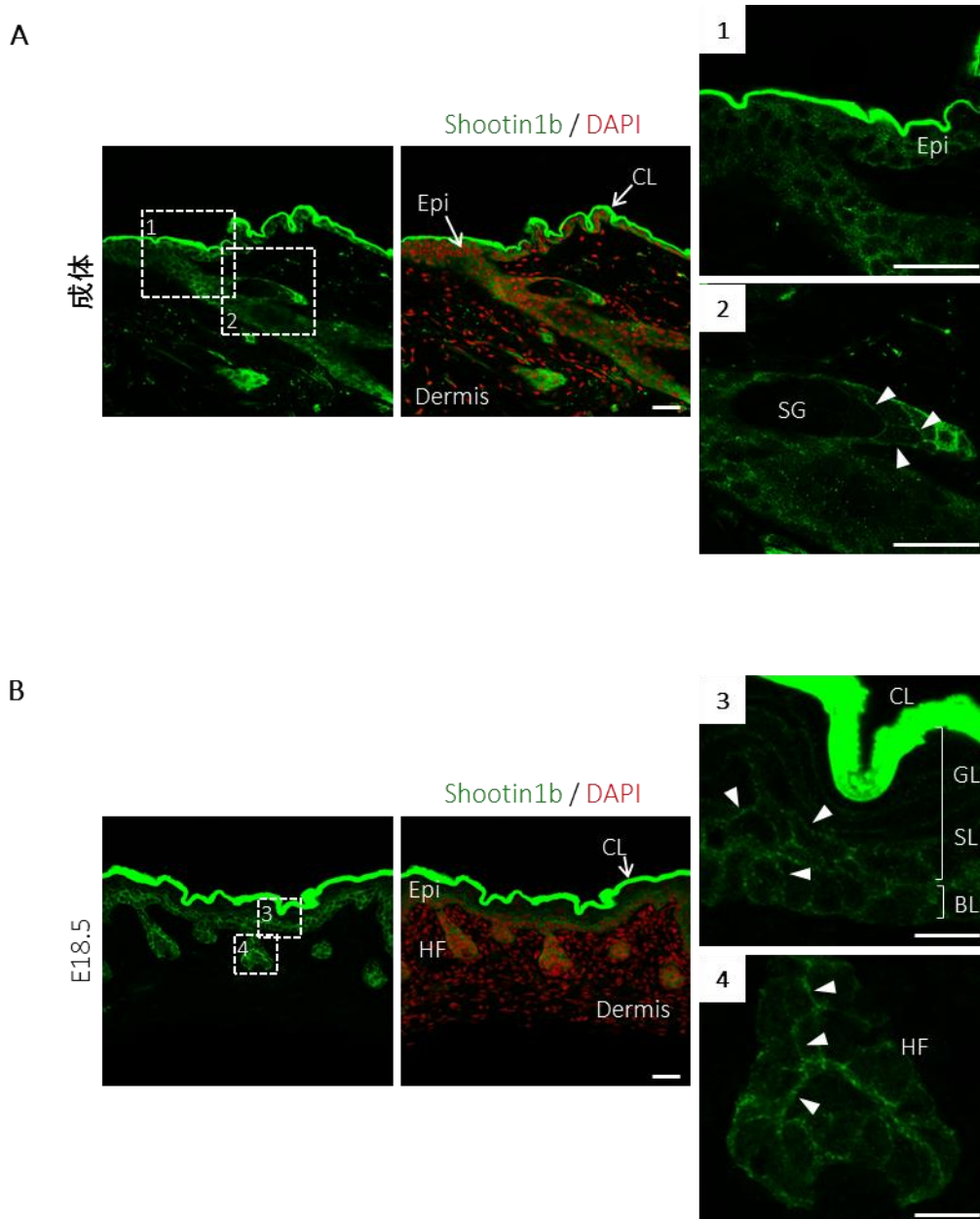
- A) 抗 Shootin1b 特異抗体の検証。E18.5 マウス脳 (10  $\mu$ g) と精製タンパク質 Shootin1a (5 ng) 及び精製タンパク質 Shootin1b (5 ng) のウェスタンブロット解析。左; 抗 Shootin1 抗体で検出。右; 抗 Shootin1b 抗体で検出。
- B) 成体マウス及びマウス胎仔の各臓器における Shootin1b の発現解析。各臓器から抽出したタンパク質 (Adult; 各 20  $\mu$ g, E18.5; 各 10  $\mu$ g) における Shootin1b の発現を抗 Shootin1b 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出。

### 3. Shootin1b は上皮組織に発現が認められる

次に、Shootin1b の発現が見られた各臓器における Shootin1b の局在解析を行った。成体マウス及び E18.5 マウスにおける各臓器の凍結切片を作成し、抗 Shootin1b 抗体を用いて組織免疫染色を行った。皮膚では、主に表皮に Shootin1b の局在が観察され、さらに毛包、皮脂腺にも局在が見られた (図 4)。マウスの胃は前胃部と腺胃部に分かれており、前胃部は皮膚と似た構造を有している。Shootin1b は、前胃部の重層上皮に局在しており (図 5A, B)、腺胃部では粘液を分泌する頸部粘液細胞や、ペプシノーゲンを分泌する主細胞に Shootin1b が局在していた (図 5C, D)。小腸及び大腸では、粘膜上皮細胞に Shootin1b の局在が見られた (図 6)。肺では、気管支や細気管支などの呼吸上皮に局在が見られ、また非上皮系の細胞にも発現していることが分かった (図 7A, B)。肝臓では胆管と肝細胞に局在しており (図 7C)、膵臓では、腺房細胞や膵管に局在が見られた (図 8)。さらに高倍率で観察した結果、Shootin1b は上皮細胞の膜近傍に局在することが分かった (図 4A, B、図 5A, C, D、図 6A、図 7C、図 8A の矢頭)。

### 4. Shootin1b は上皮細胞の細胞膜近傍で E-cadherin、Cortactin と共局在する

Shootin1b が細胞膜近傍に局在していたことから、細胞間接着への関与が予想される。接着装置の中でもアドヘレンスジャンクション (AJ) は、細胞接着分子 E-cadherin と細胞内の F-actin を連結し、上皮組織全体に掛かる力の調節を行っている (Guillot and Lecuit 2013)。スプライスバリエントである Shootin1a は細胞接着分子 L1-CAM と結合し、さらに Cortactin との結合を介して F-actin と連結する (Shimada et al., 2008; Kubo et al., 2015; Baba et al., 2018)。よって、Shootin1b も細胞接着分子と F-actin を連結させる分子ではないかと考え、E-cadherin と Cortactin との共染色を行った。その結果、Shootin1b は E18.5 マウスの皮膚と胃の腺胃部において E-cadherin、Cortactin と共局在していた (図 9 矢頭)。また、マウス乳腺上皮細胞株 EpH4 を用いて同様の局在解析を行った結果、組織切片で観察されたように、Shootin1b と E-cadherin、Cortactin の共局在が観察された (図 10)。



#### 図 4. 皮膚における Shootin1b の局在解析

皮膚における Shootin1b の局在解析。8  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、抗 Shootin1b 抗体 (緑) および DAPI (赤) で染色 (A; 成体マウス、B; E18.5 マウス)。Epi; 表皮、SG; 皮脂腺、HF; 毛包、CL; 角質層、GL; 顆粒層、SL; 有棘層、BL; 基底層。矢頭は細胞境界面を示す。図 1, 2, 3, 4 はそれぞれ破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$  (図 B の 3, 4 のみ 10  $\mu\text{m}$ )。

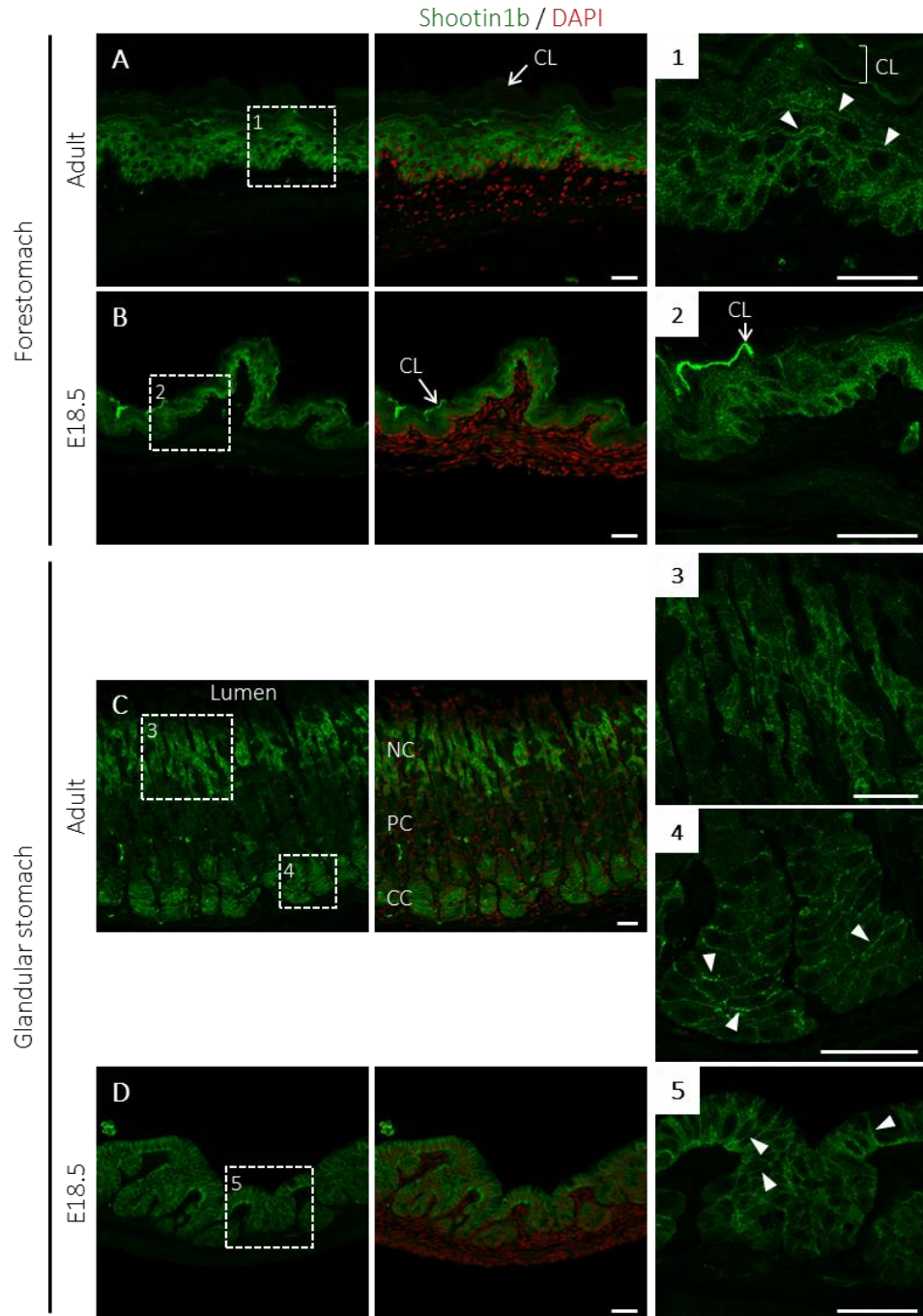


図 5. 胃における Shootin1b の局在解析

- A, B) 前胃における Shootin1b の局在解析。8  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、抗 Shootin1b 抗体 (緑) および DAPI (赤) で染色 (A; 成体マウス、B; E18.5 マウス)。CL; 角質層。矢頭は細胞境界面を示す。図 1, 2 はそれぞれ破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$ 。
- C, D) 胃腺における Shootin1b の局在解析。8  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、抗 Shootin1b 抗体 (緑) および DAPI (赤) で染色 (C; 成体マウス、D; E18.5 マウス)。NC; 頸部粘液細胞、PC; 壁細胞、CC; 主細胞。矢頭は細胞境界面を示す。図 3, 4, 5 はそれぞれ破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$ 。

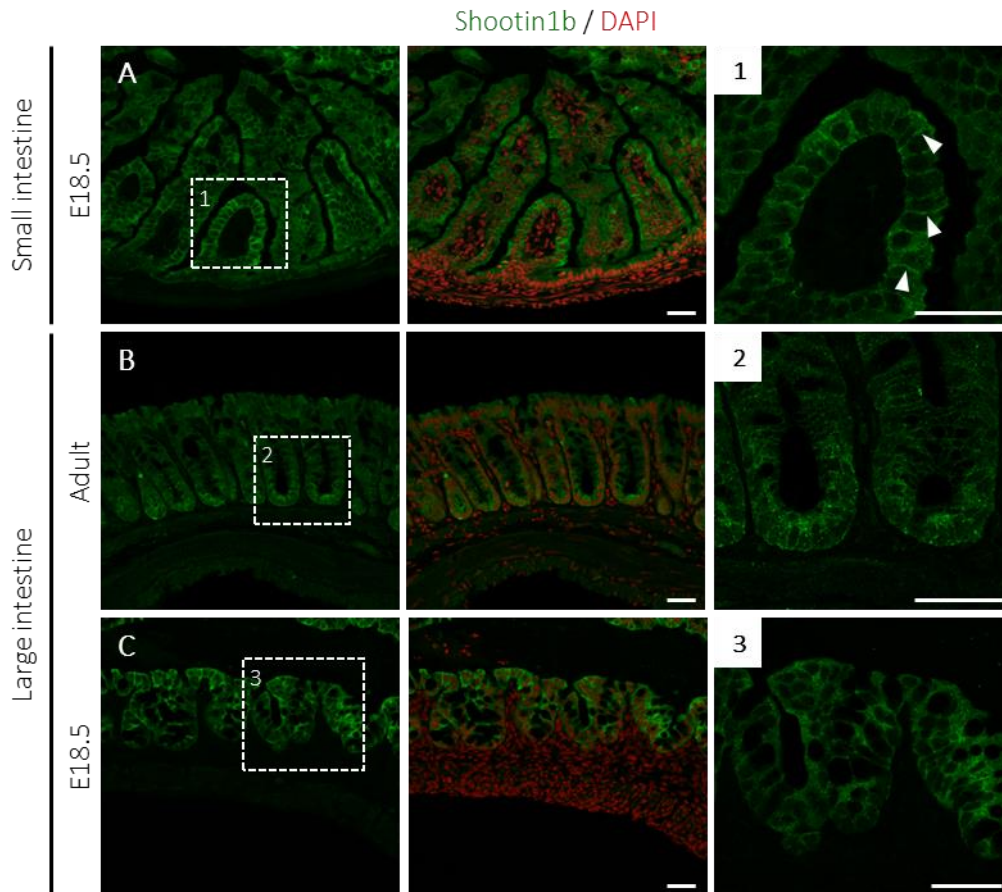


図 6. 腸における Shootin1b の局在解析

- A) E18.5 マウスの小腸における Shootin1b の局在解析。8  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、抗 Shootin1b 抗体 (緑) および DAPI (赤) で染色。矢頭は 細胞境界面を示す。図 1 は破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$ 。
- B, C) 大腸における Shootin1b の局在解析。8  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、抗 Shootin1b 抗体 (緑) および DAPI (赤) で染色 (B; 成体マウス、C; E18.5 マウス)。図 2, 3, 4 はそれぞれ破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$ 。



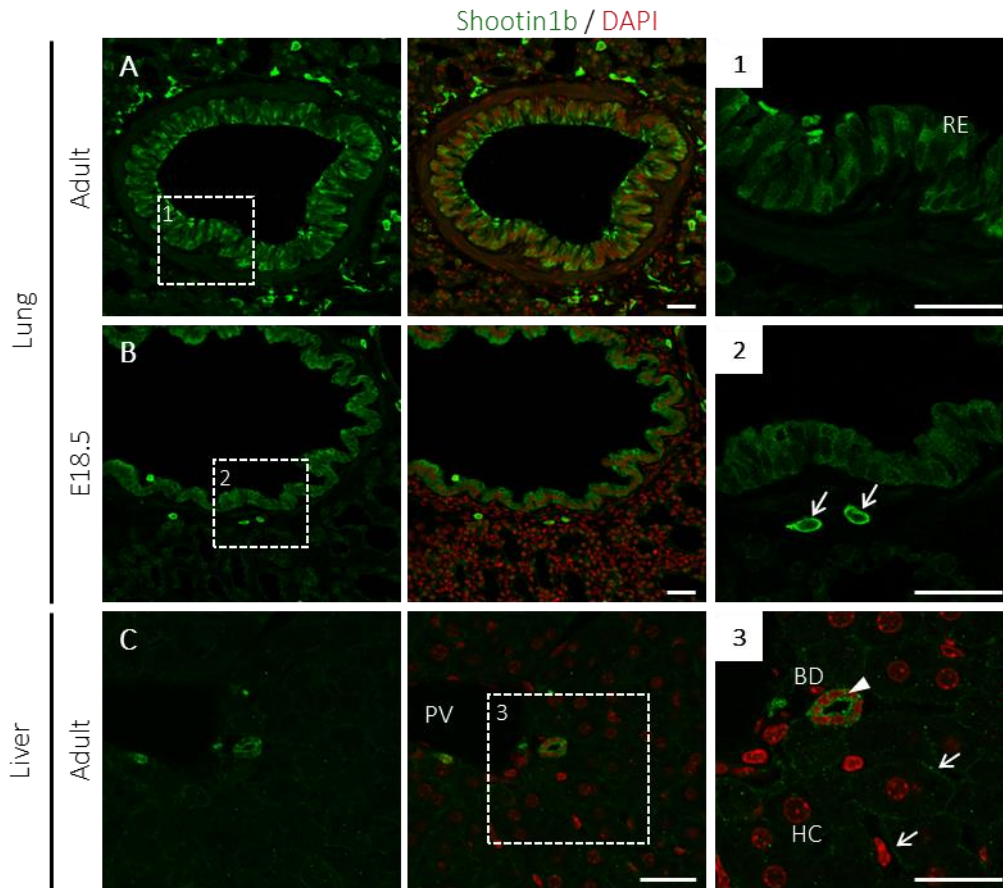


図 7. 肺、肝臓における Shootin1b の局在解析

- A, B) 肺における Shootin1b の局在解析。8  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、抗 Shootin1b 抗体 (緑) および DAPI (赤) で染色 (A; 成体マウス、B; E18.5 マウス)。RE; 呼吸上皮。矢印は非上皮系細胞を示す。図 1, 2 はそれぞれ破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$ 。
- C) 肝臓における Shootin1b の局在解析。8  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、抗 Shootin1b 抗体 (緑) および DAPI (赤) で染色。PV; 門脈、BD; 胆管、HC; 肝細胞。矢頭は胆管を構成する上皮細胞の細胞境界面を示し、矢印は肝細胞の細胞境界面を示す。図 3 は破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$ 。



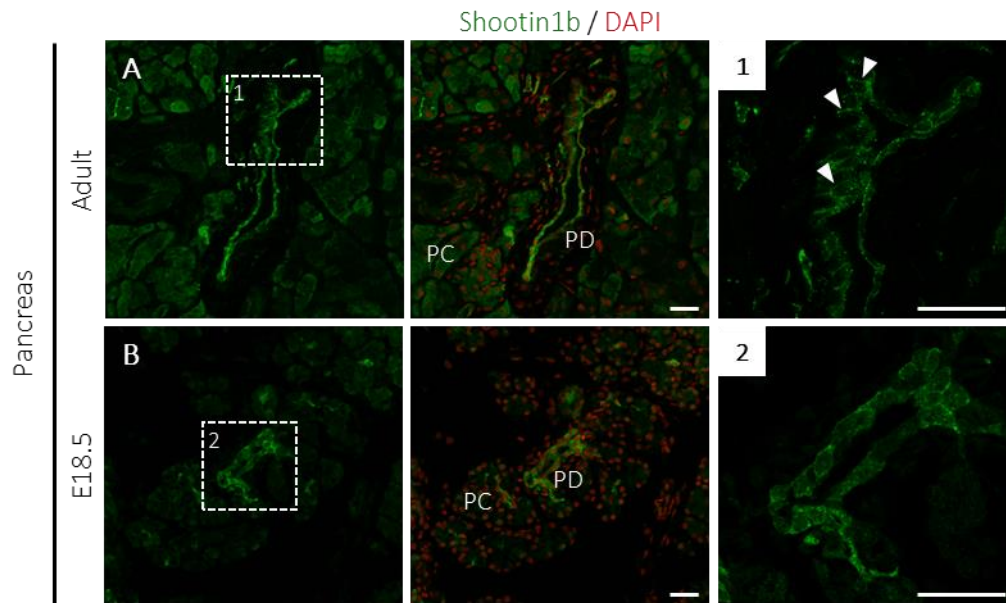


図 8. 膵臓における Shootin1b の局在解析

膵臓における Shootin1b の局在解析。8  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、抗 Shootin1b 抗体 (緑) および DAPI (赤) で染色 (A; 成体マウス、B; E18.5 マウス)。PC; 膵臓実質細胞、PD; 膵管。矢頭は細胞境界面を示す。図 1, 2 はそれぞれ破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$ 。

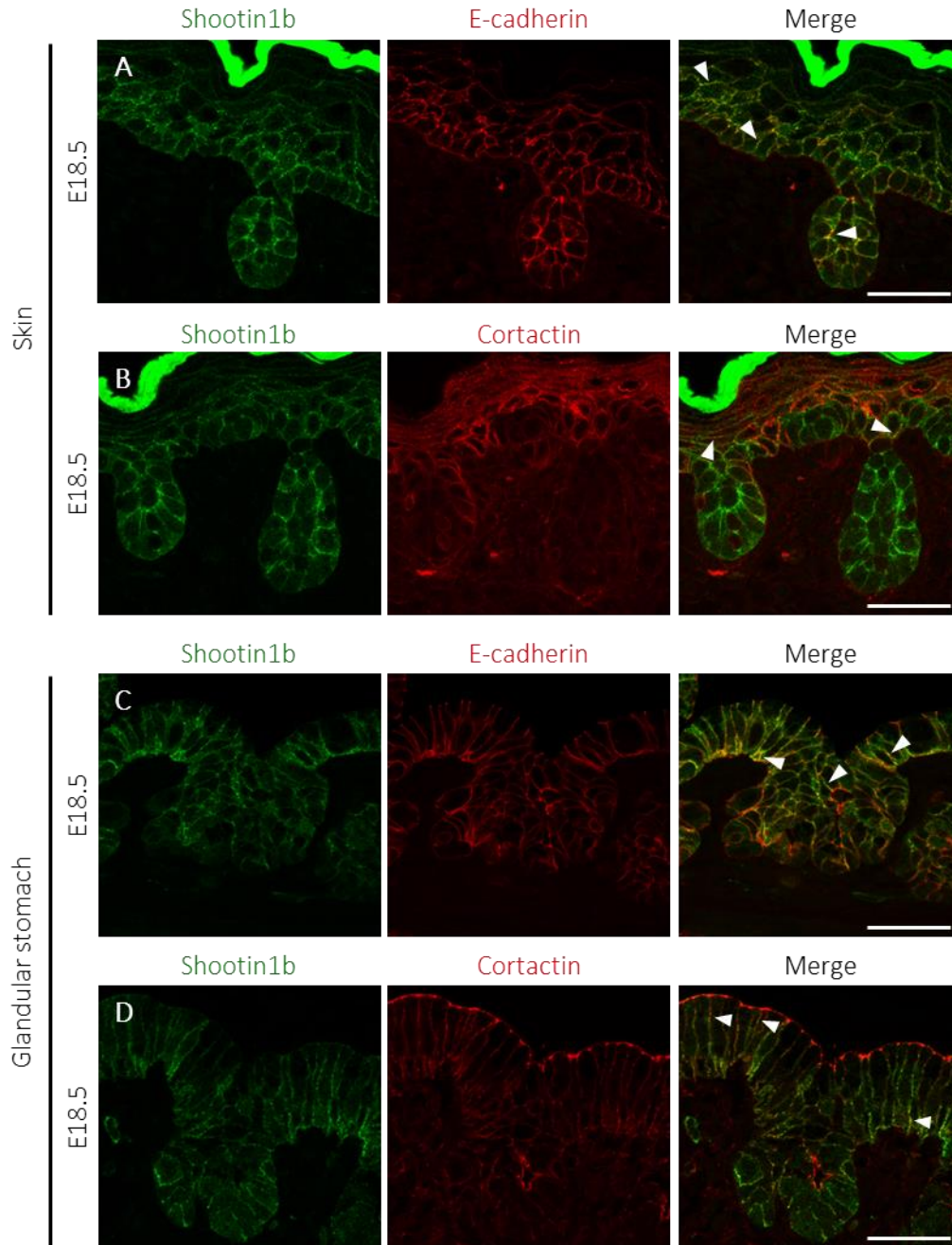


図 9. 皮膚、胃の腺胃部における Shootin1b と E-cadherin、Cortactin の局在解析  
 E18.5 マウスの皮膚 (A, B) と胃の腺胃部 (C, D) における Shootin1b (緑) と E-cadherin、Cortactin (赤) の局在解析。矢頭は Shootin1b と Cortactin の共局在を示す。Bar; 30  $\mu\text{m}$ 。

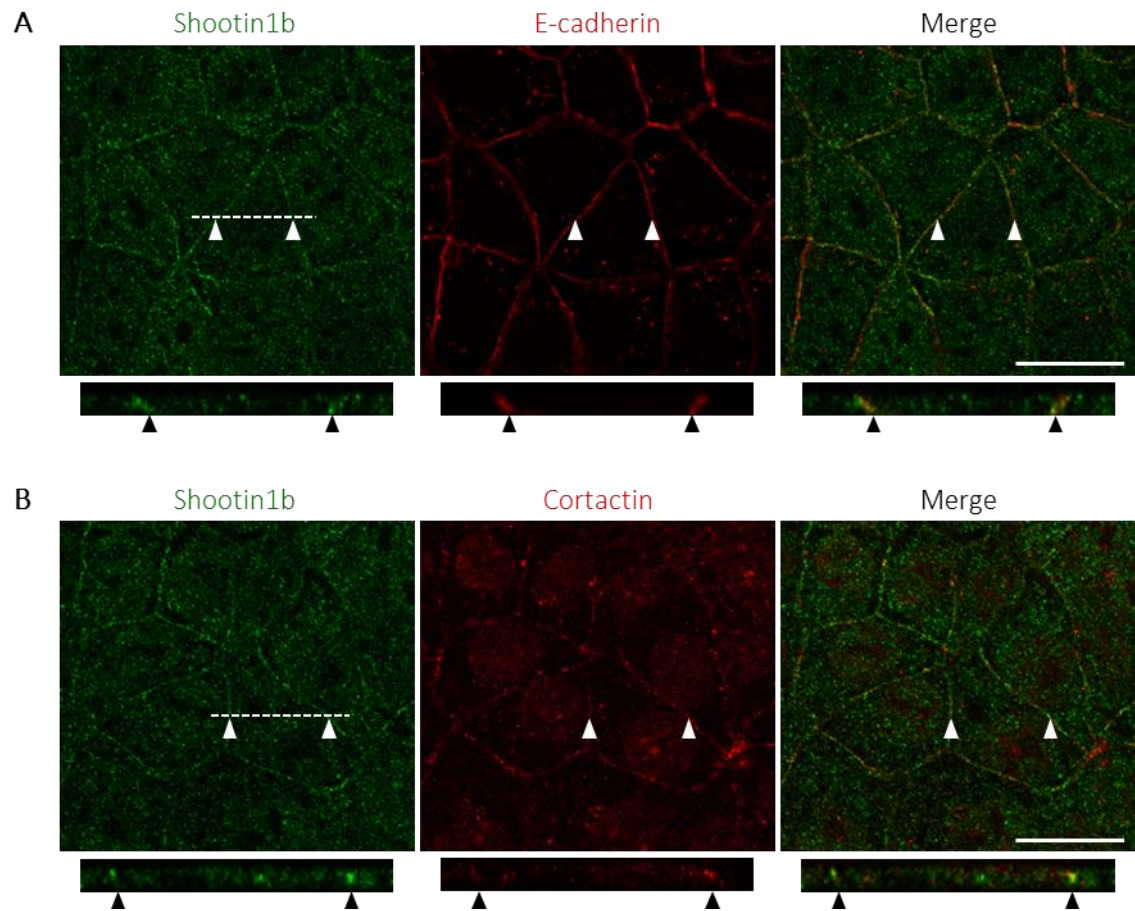


図 10. マウス乳腺上皮細胞株 EpH4 における Shootin1b と E-cadhrin、Cortactin の局在解析

EpH4 における Shootin1b (緑) と E-cadhrin (A) 、 Cortactin (B) (赤) の染色像。破線部位を Z 軸方向に観察した図をそれぞれの図の下に示す。矢頭は、細胞境界面を示す。Bar; 20  $\mu$ m。

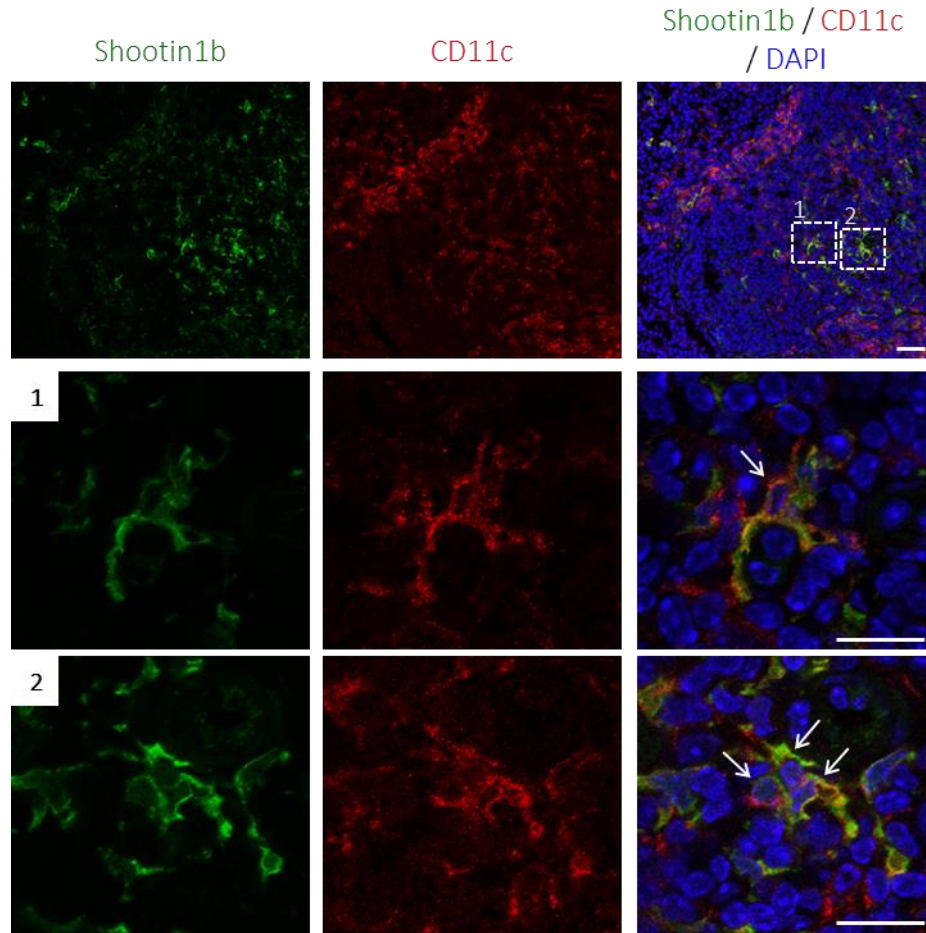
## 5. Shootin1b は樹状細胞に発現し、先導端に濃縮する

ウェスタンブロットによる Shootin1b の発現解析から、Shootin1b が非上皮組織である脾臓にも発現することが分かった (図 3)。そこで脾臓における Shootin1b の局在を組織免疫染色によって調べた。その結果、Shootin1b は樹状細胞のマーカーである CD11c と共局在することが分かった (図 11)。よって、Shootin1b は免疫細胞の一種である樹状細胞に発現することが明らかとなった。

樹状細胞における内在性 Shootin1b の局在を調べるため、成体マウスの骨髄から分化させた樹状細胞を用いて免疫染色を行った。ボリュームマーカーである CMAC で染色した後、抗 Shootin1b 抗体を用いて免疫染色を行い、CMAC の蛍光強度との比率を算出した。その結果、Shootin1b は移動方向と考えられる先導端に濃縮することが分かった (図 12)。

## 6. Shootin1b は樹状細胞の先導端で F-actin、Cortactin、L1-CAM と共局在する

先導端の膜突出には F-actin の重合・脱重合が重要である。Shootin1b が先導端に濃縮することから、F-actin との関連性を調べるために、Shootin1b と F-actin の培養樹状細胞における局在解析を行った。F-actin に結合する phalloidin を用いて染色した結果、Shootin1b との共局在が観察された (図 13A)。スプライスバリエントである Shootin1a は、海馬培養神経細胞の軸索成長円錐内で F-actin、Cortactin、L1-CAM と共局在し、Cortactin と L1-CAM に結合することで、成長円錐を前進させるための力を生み出す (Shimada et al., 2008; Kubo et al., 2015; Baba et al., 2018)。Cortactin は Shootin1a の 261-377 アミノ酸領域に結合し、L1-CAM は 1-125 アミノ酸領域に結合することが明らかとなっており (Kubo et al., 2015; Baba et al., 2018)、Shootin1b も同じアミノ酸配列を有している (図 1B)。よって、これらのタンパク質が樹状細胞内でも Shootin1b と相互作用していると考え、免疫染色によって局在を調べた。その結果、Shootin1b は先導端で Cortactin と共局在しており、L1-CAM は細胞全体に局在しているものの、Shootin1b が局在する先導端にも存在していた (図 13B, C)。

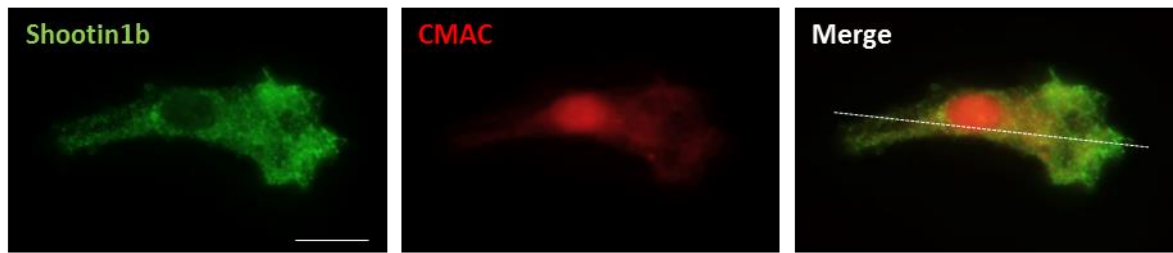


**図 11. 脾臓における Shootin1b の局在解析**

脾臓における Shootin1b (緑) と樹状細胞のマーカーである CD11c (赤)、DAPI (青) の染色像。1, 2 はそれぞれの破線部の拡大図。Bar; 30  $\mu\text{m}$  (1, 2 は 10  $\mu\text{m}$ ) 。



A



B

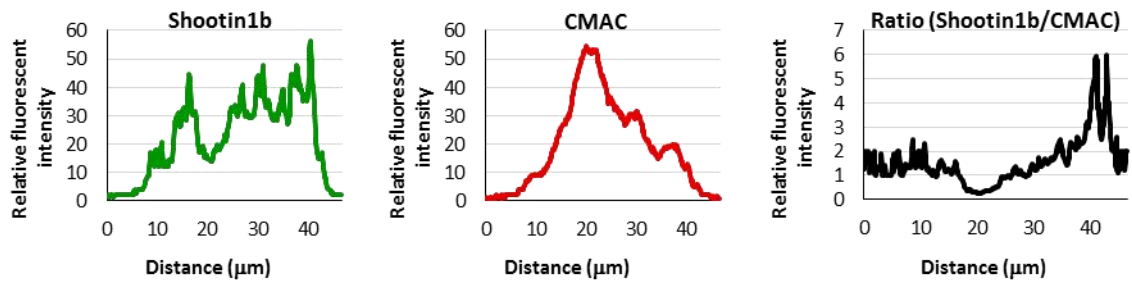


図 12. 樹状細胞における Shootin1b の細胞内局在

- A) 樹状細胞における Shootin1b (緑) とボリュームマーカである CMAC (赤) の染色像。Bar; 10  $\mu\text{m}$ 。
- B) 蛍光強度の定量化グラフ。破線部の Shootin1b と CMAC の蛍光強度を測定し、グラフ右では Shootin1b の蛍光強度を CMAC の蛍光強度で除算した (染色像の左破線部を 0 とした)。

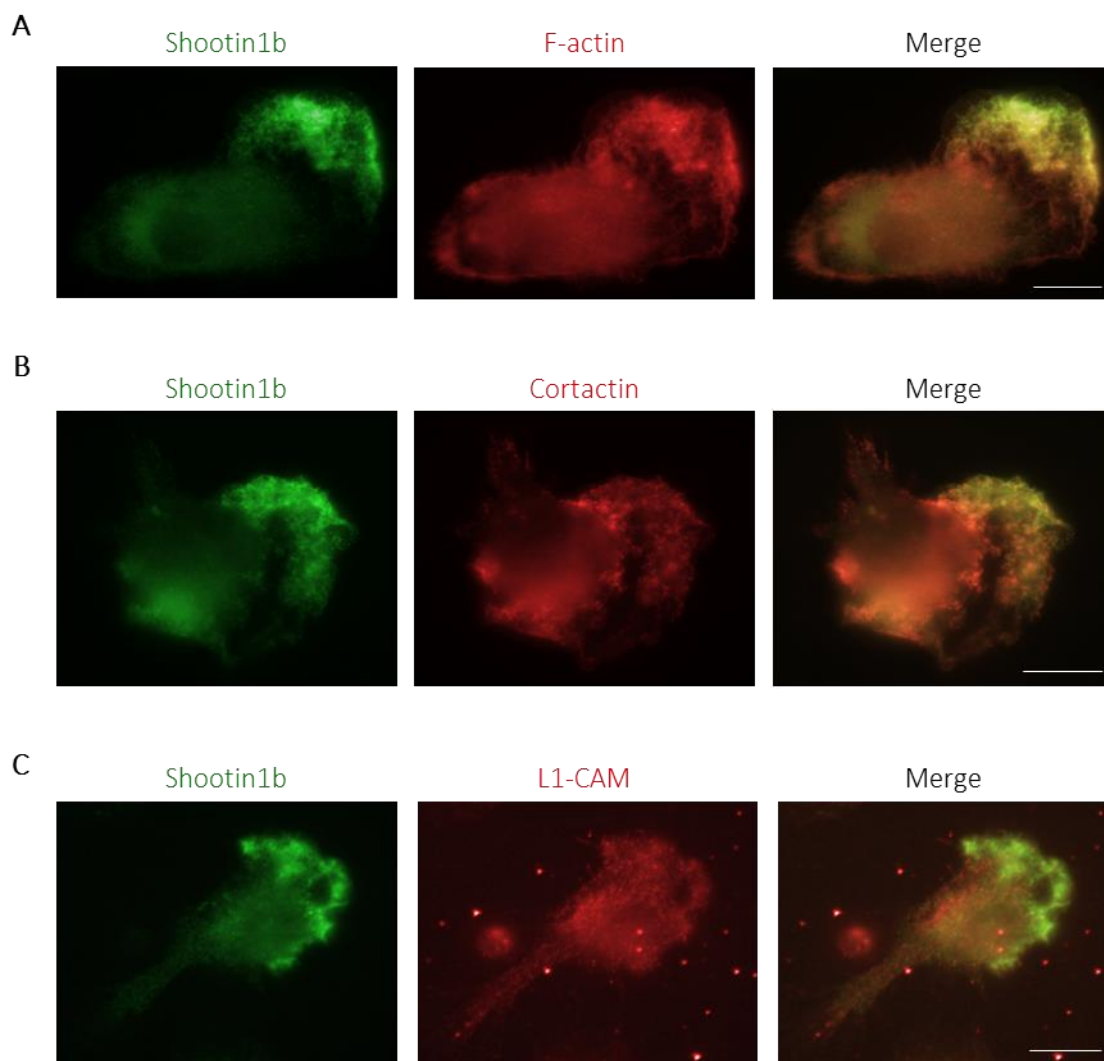


図 13. 樹状細胞における Shootin1b と F-actin、Cortactin、L1-CAM の局在  
 A) 樹状細胞における Shootin1b (緑) と Phalloidin (赤) の染色像。Bar; 20  $\mu\text{m}$ 。  
 B) 樹状細胞における Shootin1b (緑) と Cortactin (赤) の染色像。Bar; 20  $\mu\text{m}$ 。  
 C) 樹状細胞における Shootin1b (緑) と L1-CAM (赤) の染色像。Bar; 10  $\mu\text{m}$ 。

## 7. Shootin1b は樹状細胞の先端端で逆行性に移動する

樹状細胞の移動メカニズムには、非接着性と接着性の2種類が存在することが知られている (Renkawitz and Sixt, 2010) (図2)。その内、接着性の移動にはクラッチ分子の関与が考えられているが、詳細は明らかとなっていない。これまでの結果から、Shootin1b が樹状細胞の先端端で、F-actin、Cortactin、L1-CAM と共局在することが明らかとなった(図13)。また大腸菌由来の精製タンパク質を用いた実験により、Shootin1b が Cortactin、L1-CAM と直接結合することが明らかとなっている (嶺岸 博士論文, 2018)。以上のことから、Shootin1b がクラッチ分子として樹状細胞の移動に関与する可能性が考えられる。そこで、mRFP-actin と AcGFP-Shootin1b を樹状細胞に遺伝子導入し、細胞内一分子計測によって Shootin1b が F-actin と同様に逆行性移動を行っているかを調べた。その結果、F-actin と同様、Shootin1b の逆行性移動が観察された (図14)。よって、Shootin1b が樹状細胞でクラッチ分子として機能する可能性が示唆された。

## 8. 樹状細胞の成熟化に Shootin1b は関与しない

樹状細胞は、病原体の感染時には、抗原を細胞内に取り込むことで成熟化し、抗原情報をリンパ節の T 細胞へ伝えるために組織内を遊走する。樹状細胞の移動に異常が生じると T 細胞の活性化が起こらないため、その後の免疫応答に甚大な影響を及ぼす。従って、樹状細胞のリンパ節への移動は、病原体の感染から免疫応答を開始させるために非常に重要なステップである。これまでの結果から、Shootin1b が樹状細胞の先端端に局在し、クラッチ分子である可能性が示唆されたことから、Shootin1b が樹状細胞の移動に関与することが予想される。そこで、細胞移動における Shootin1b の機能を調べるため、Shootin1 欠損マウスから回収・培養した樹状細胞を用いた細胞移動の解析を行うこととした。培養条件下で LPS などの細菌成分を添加すると、樹状細胞は成熟を開始し、移動が活発になる。細胞移動の解析を行うため、まず Shootin1 欠損樹状細胞が移動するための成熟化が可能かどうかを検証した。成熟マーカーである MHC ClassII 及び CD80 の発現を調べるため、野生型樹状細胞及び Shootin1 欠損樹状細胞を用いてフローサイトメーターによる解析を行った。樹状細胞マーカーである CD11c は野生型樹状細胞及び Shootin1 欠損樹状細胞の両細胞において約 75% が陽性であった (図15)。CD11c 陽性細胞のうち、MHC ClassII 及び CD80 陽性細胞の割合を調べたところ、野生型樹状細胞及び Shootin1 欠損樹状細胞の両細胞において約 96% が陽性であった。よって、Shootin1 欠損樹状細胞は野生型と同等の成熟度を保っていることが分かった。また、この結果から Shootin1b が樹状細胞の成熟化に関与しないことが示唆された。



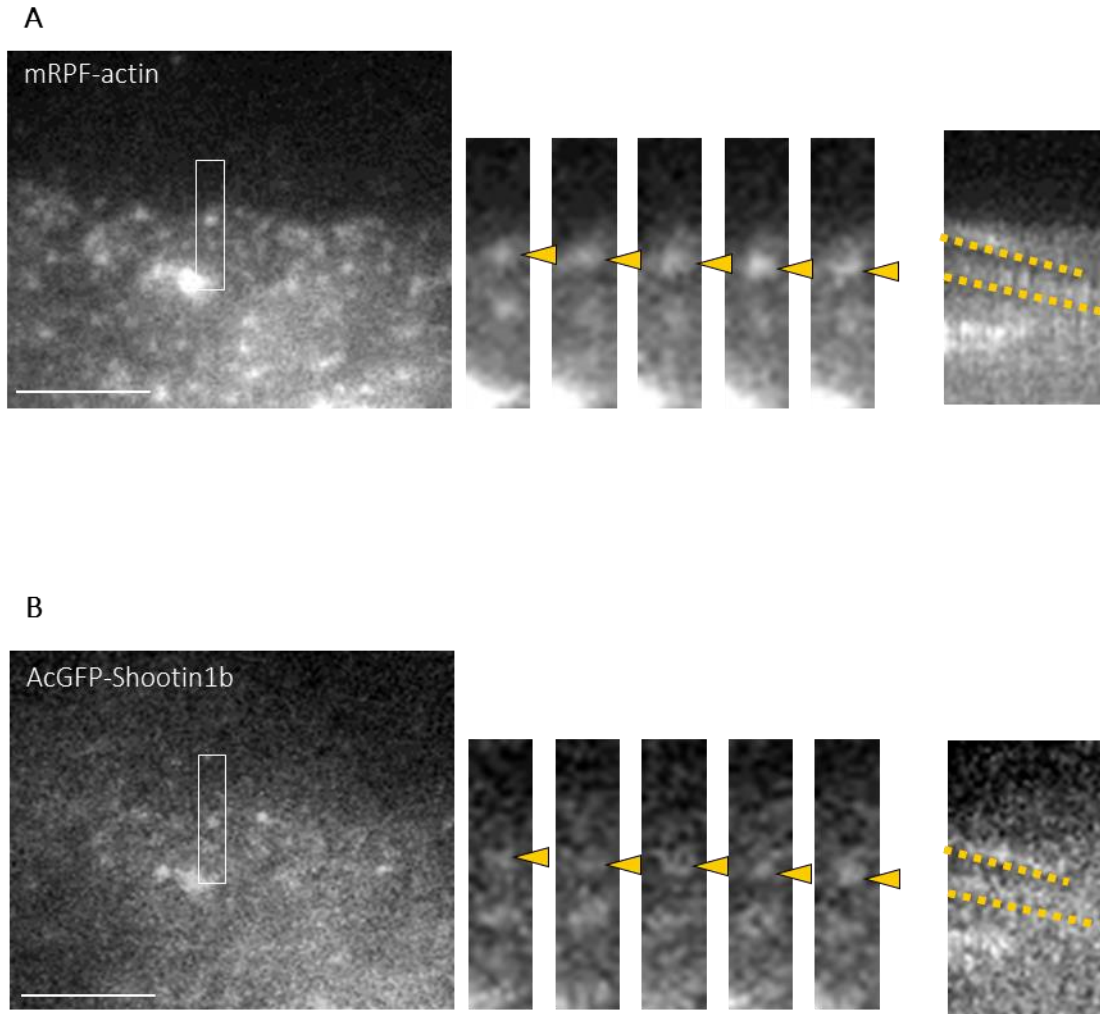


図 14. 樹状細胞における mRFP-actin と AcGFP-Shootin1b の細胞内一分子計測

樹状細胞に mRFP-actin (A) と AcGFP-Shootin1b (B) を発現させた際のタイムラプスイメージ。左図の白枠領域を拡大し、中央に示した。また、タイムラプスイメージから作成したキモグラフを右図に示す。Interval; 3 sec。Bar; 5  $\mu$ m。

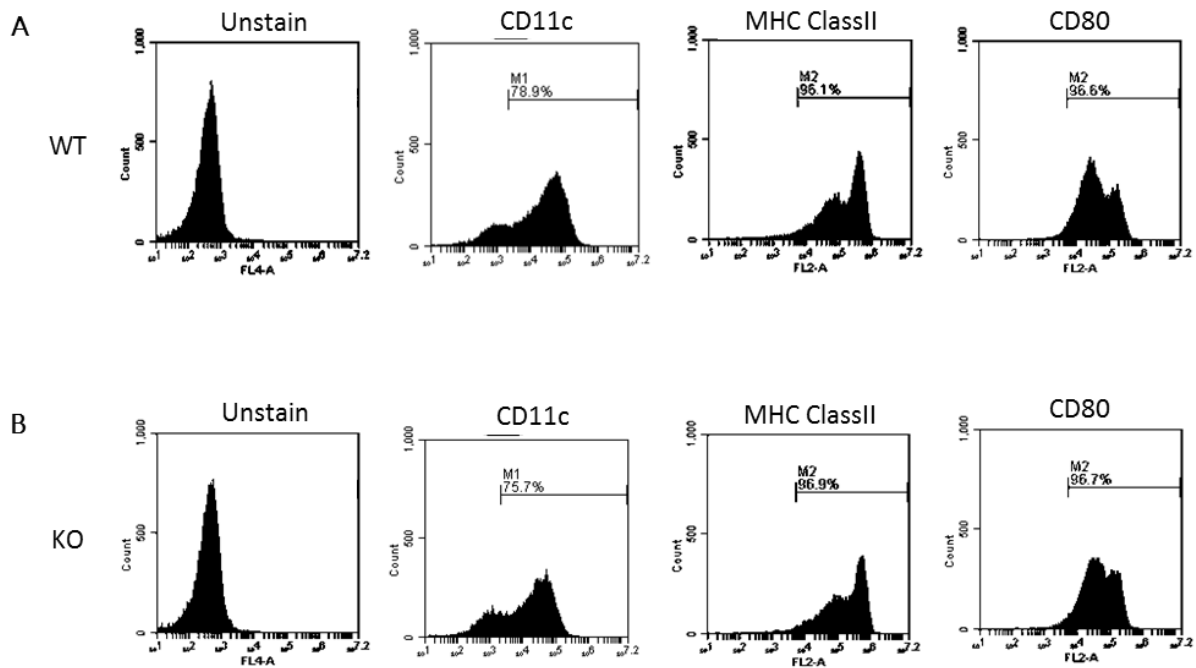


図 15. 野生型樹状細胞と Shootin1 欠損樹状細胞の成熟化比較

フローサイトメーターにより確認した樹状細胞の成熟化マーカーである MHC ClassII 及び CD80 の発現率。

- A) 野生型樹状細胞の CD11c 陽性細胞率は 78.9%。CD11c 陽性細胞の内、MHC ClassII 陽性細胞率は 96.1%、CD80 陽性細胞率は 96.6%。
- B) Shootin1 欠損樹状細胞の CD11c 陽性細胞率は 75.7%。CD11c 陽性細胞の内、MHC ClassII 陽性細胞率は 96.9%、CD80 陽性細胞率は 96.7%。

## 9. Shootin1b は樹状細胞においてクラッチ分子として機能する

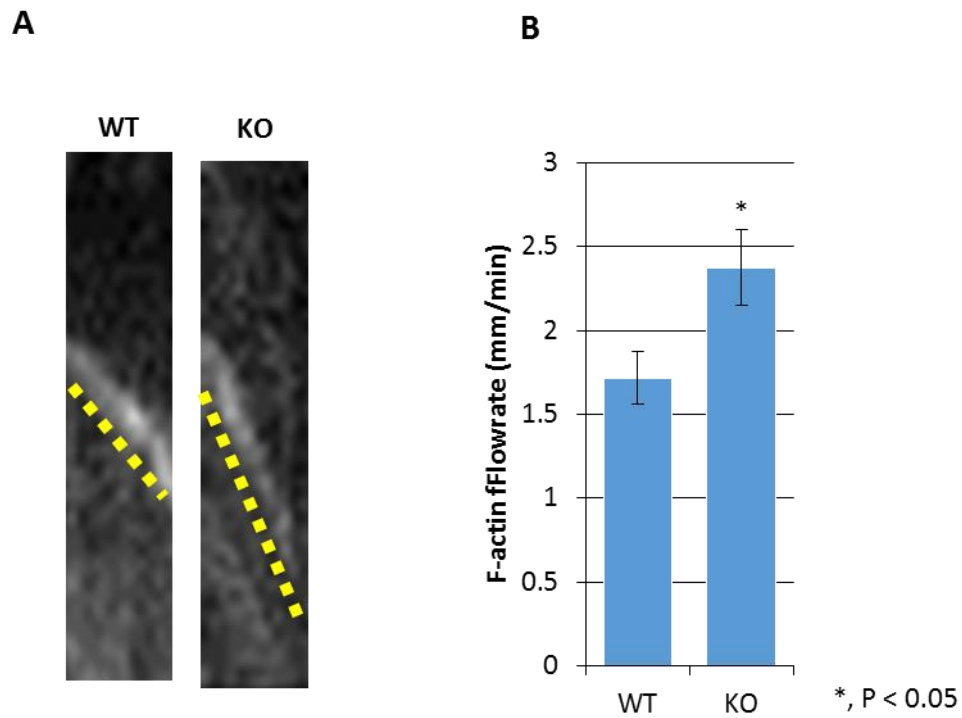
これまでの結果から、Shootin1b が樹状細胞の先端端に局在し、クラッチ分子である可能性が示唆された。Shootin1b がクラッチ分子として機能する場合、Shootin1b の欠損によってスリップが生じ、アクチン逆行性移動の速度が上昇することが予想される。そこで、野生型樹状細胞及び Shootin1 欠損樹状細胞を用いてアクチンの細胞内一分子計測を行った。その結果、野生型樹状細胞に比べ、Shootin1 欠損樹状細胞のアクチン逆行性移動の速度が優位に上昇した (図 16)。よって、Shootin1b が樹状細胞内においてクラッチ分子として機能することが示唆された。

## 10. Shootin1b は細胞移動のための細胞極性の形成に関与する

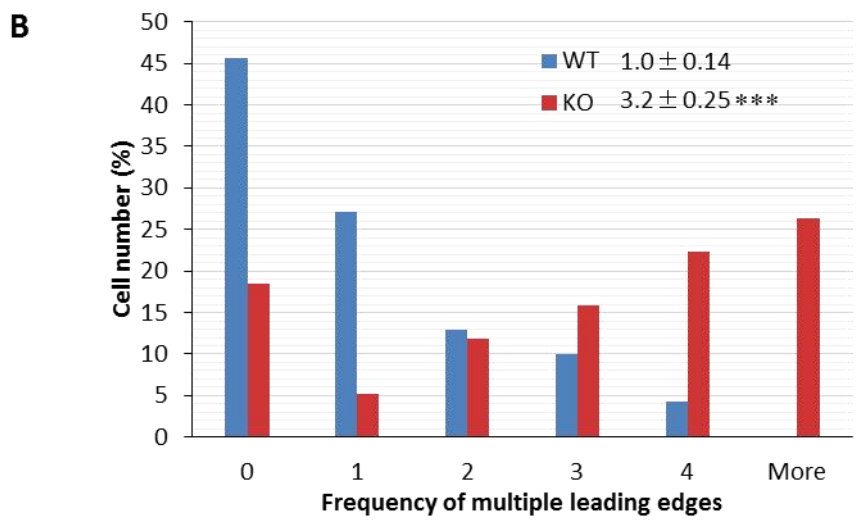
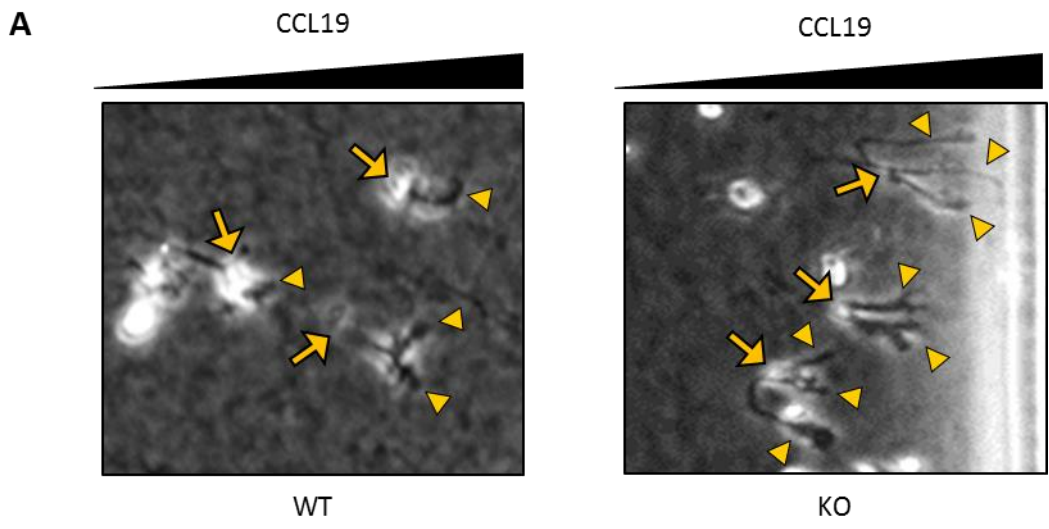
細胞移動における Shootin1b の機能を調べるため、Shootin1 欠損樹状細胞を用いた細胞移動の解析を行った。三次元環境下における移動を解析するために、樹状細胞に LPS 刺激を行い、ケモカインである CCL19 の濃度勾配を作製したコラーゲン・マトリゲル混合ゲルを用いて 3D 移動解析を行った。CCL19 の濃度勾配に従って移動する細胞の形態をタイムラプスイメージングによって観察した結果、Shootin1 欠損樹状細胞は複数の先端端を形成することが分かった (図 17A)。そこで、複数の先端端を形成した回数とその細胞の割合を定量的に解析した結果、野生型では  $1.0 \pm 0.14$  回であったが、Shootin1 欠損樹状細胞では  $3.2 \pm 0.25$  回であり、Shootin1 欠損樹状細胞では、複数の先端端を形成する回数が有意に上昇していた (図 17B)。よって、Shootin1b は樹状細胞の移動において、単一の先端端の形成、すなわち細胞極性の形成に関与することが示唆された。

## 11. Shootin1b は樹状細胞の移動に関与する

細胞移動における Shootin1b の機能を更に調べるため、三次元環境下における Shootin1 欠損樹状細胞の移動解析を引き続き行った。移動開始地点から終了地点までの直線移動距離を解析した結果、野生型樹状細胞が  $295.3 \mu\text{m}$  であったのに対し、Shootin1 欠損樹状細胞は  $229.6 \mu\text{m}$  と優位に減少していた (図 18A)。また、総移動距離も優位な減少が見られた (野生型樹状細胞:  $476.2 \mu\text{m}$ , Shootin1 欠損樹状細胞:  $377.4 \mu\text{m}$ ) (図 18B)。この時の移動速度を解析した結果、野生型樹状細胞が  $1.95 \mu\text{m}/\text{min}$  であったのに対し、Shootin1 欠損樹状細胞は  $1.60 \mu\text{m}/\text{min}$  と優位に減少していた (図 18C)。一方で、直線移動距離と総移動距離から移動の方向性を解析した結果、野生型樹状細胞と Shootin1 欠損樹状細胞に差は見られなかった (図 18D)。これらの結果から、Shootin1b は樹状細胞の移動に関与することが示唆された。



**図 16. 野生型樹状細胞と Shootin1 欠損樹状細胞のアクチン逆行性移動の速度比較**  
 野生型樹状細胞 (n=25) と Shootin1 欠損樹状細胞 (n=32) に蛍光アクチンを発現させた際のアクチン逆行性移動の速度をタイムラプスイメージングにより測定。  
 A) 野生型樹状細胞と Shootin1 欠損樹状細胞のアクチン分子のキモグラフ。黄色破線部はアクチン分子の移動の軌跡を示す。  
 B) アクチン逆行性移動の速度解析結果を示す。



**図 17. Shootin1b 欠損による先導端への影響**

A) 3D 環境下における野生型樹状細胞 (n=70) と Shootin1 欠損樹状細胞 (n=76) の移動中の細胞形態。矢頭は複数形成された先導端を示す。矢印は細胞体を示す。

B) 移動中に複数の先導端を形成した回数とその細胞数を示したグラフ。

(\*\*\*,  $P < 0.01$ )

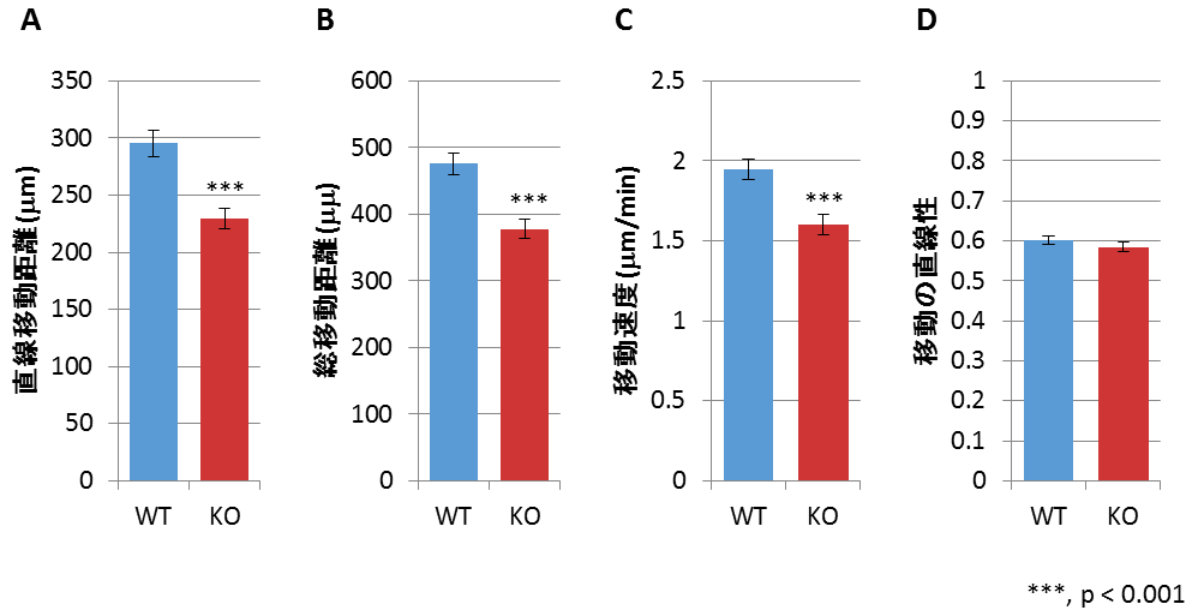


図 18. 3D 環境下における野生型樹状細胞と Shootin1 欠損樹状細胞の移動解析

3D 環境下における野生型樹状細胞 (n=185) と Shootin1 欠損樹状細胞 (n=147) の移動解析結果。移動開始地点から終了地点までの直線移動距離(A)、総移動距離 (B)、移動速度 (C)、直線移動距離と総移動距離 から移動の直線性 (D) を解析、比較した。

## 考察

本研究で着目している Shootin1b は、当研究室によって同定された新規タンパク質である。このタンパク質にはスプライスバリエーションである Shootin1a が存在しており、Shootin1a の機能は海馬培養神経細胞を用いた先行研究によって明らかとなった。Shootin1a は、Cortactin を介して逆行性移動する F-actin と相互作用し、細胞接着分子である L1-CAM と結合することによって、クラッチ分子として軸索成長円錐の移動に関与することが見出されている (Kubo et al., 2015; Shimada et al., 2008; Baba et al., 2018)。Shootin1b は、Shootin1a と共通のアミノ酸配列を N 末端側に持ち、Shootin1a の C 末端側 3 アミノ酸が 178 アミノ酸に置換された配列を有するが、機能は不明であった。そこで本研究では、Shootin1b の発現が確認された末梢組織における Shootin1b の機能解明を目指した。

### Shootin1b は上皮細胞に発現し、細胞膜近傍に局在する

Shootin1b を特異的に認識する抗体を用いて、マウスの各臓器における Shootin1b の発現解析を行った結果、脳、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、脾臓、膵臓、皮膚など様々な組織に発現することを見出した。これらの臓器における Shootin1b の局在を調べた結果、Shootin1b が上皮細胞に局在することを見出した。また、アドヘレンスジャンクション (AJ) の構成タンパク質である E-cadherin と共染色を行った結果、Shootin1b が E-cadherin と共局在することが明らかになった。さらに、Shootin1a と直接結合する Cortactin との共染色を行った結果、Shootin1b は Cortactin とも共局在していた。Cortactin は上皮細胞の AJ 形成に重要であり、E-cadherin と相互作用することが報告されている (Helwani et al. 2004; Ren et al. 2009)。以上のことから、Shootin1b が Cortactin を介して AJ の形成に関与する可能性が考えられる。

### Shootin1b は樹状細胞に発現し、接着性の移動に関与する

Shootin1b が脾臓に発現しており、樹状細胞のマーカーとして知られる CD11c と共局在していたことから、Shootin1b が免疫細胞の一種である樹状細胞に発現することが明らかとなった。樹状細胞は移動性細胞であり、病原体の感染時には、その抗原情報をリンパ節の T 細胞へ伝えるために組織内を遊走する。樹状細胞の移動に異常が生じると T 細胞の活性化が起こらないため、その後の免疫応答に甚大な影響を及ぼす。そのため樹状細胞のリンパ節への移動は、病原体の感染から免疫応答を開始させるために非常に重要なステップである。

細胞移動の分子メカニズムとして、クラッチモデルが提唱されている (Mitchison and Kirschner 1988)。移動方向の先端端で、逆行性に移動する F-actin と細胞接着分子の結合を“クラッチ分子”が仲介し、逆行性移動する F-actin を駆動力として細胞が

前進するというモデルである。Shootin1a は神経細胞の成長円錐内でクラッチ分子として機能し、軸索成長円錐を前進させるために重要である。Shootin1a が結合するタンパク質として、F-actin との結合を仲介する Cortactin と細胞接着分子である L1-CAM が挙げられる。Cortactin と L1-CAM は Shootin1a の 261-377 アミノ酸領域、1-125 アミノ酸領域にそれぞれ結合することが分かっている (Kubo et al., 2015; Baba et al., 2018)。Shootin1b もこの配列を有しており、大腸菌由来の精製タンパク質を用いた結合実験により、Shootin1b が Cortactin、L1-CAM と直接結合することが明らかとなっている (嶺岸 博士論文, 2018)。これらのことから、Shootin1b がクラッチ分子として機能することが予想される。樹状細胞の移動メカニズムには、非接着性と接着性の 2 種類が存在することが知られている。その内、接着性の移動にはクラッチ分子の関与が考えられているが、詳細は不明であった。Shootin1b が樹状細胞において、クラッチ分子として接着性の細胞移動に関与する可能性を考え、樹状細胞内の Shootin1b と F-actin、Cortactin、L1-CAM の共染色を行った。その結果、Shootin1b はこれらのタンパク質と共局在することが明らかとなった。さらに、樹状細胞内で Shootin1b が F-actin と同様に逆行性移動を行っており、Shootin1 欠損樹状細胞においてアクチン逆行性移動の速度が優位に上昇していたことから、Shootin1b がクラッチ分子であることが示唆された。

樹状細胞は、病原体由来の抗原を取り込んだ後、組織内を遊走してリンパ管に入る。この組織内を模倣した三次元環境下において、Shootin1b が樹状細胞の移動に関与するかどうか検証するため、3D ゲルを作製し、Shootin1 欠損マウスから採取・培養した樹状細胞を用いた移動解析を行った。その結果、Shootin1 欠損樹状細胞では複数の先端端の形成が観察された。また、移動距離及び移動速度の有意な減少が見られた。以上の結果から、Shootin1b がクラッチ分子として機能し、樹状細胞の移動に関与することが示唆された。

樹状細胞は、CCL19 などのケモカインによって PAK1 が活性化されることが知られている。神経細胞において Shootin1a が PAK1 によってリン酸化され、Cortactin 及び L1-CAM との結合が強まることから (Toriyama et al., 20013; Kubo et al., 2015; Baba et al., 2018)、樹状細胞でも同様の現象が生じていることが予想される。これまでの研究から、樹状細胞において CCL19 の刺激により、Shootin1b のリン酸化が上昇することが分かっている (酒井, 修士論文, 2018)。また、Shootin1b 欠損樹状細胞を用いた研究により、Shootin1b がメカノセンシングに関与する可能性が示されている。

今後は、樹状細胞内における Cortactin 及び L1-CMA との相互作用解析や Shootin1b のリン酸化とメカノセンシングに関する解析を行うことで、樹状細胞における Shootin1b の更なる機能解明を目指す。



## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導を賜りました指導教員の稲垣直之教授に心より感謝申し上げます。研究の方向性、研究者としての姿勢など、多くのご助言を頂きました。また、奈良先端科学技術大学院大学での5年間に社会人での3年間を加え、計8年に渡る研究生活に関わってきたすべての方々に御礼申し上げます。アドバイザー委員である河合太郎教授、石田靖雅准教授、また退官されました河野憲二教授には、本研究に対する鋭いご指摘や適切な助言を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

神経システム生物学研究室の鳥山道則助教、浦崎明宏助教、勝野弘子研究員、久保祐亮研究員には、実験の方向性、実験技術、解析方法、プレゼンテーションの方法など数多くのことを学ばせて頂きました。また、研究室の秘書である植田美恵子さんをはじめとする先輩方や後輩の皆様には本研究を進めるにあたり多くのサポートを頂きました。この場をお借りして深く御礼申し上げます。

また、関西医科大学の木梨達雄教授並びに小澤まどかさんには、樹状細胞の研究の礎となる培養技術など多くのご助言とご指導を賜りました。徳島大学大学院の米村重信教授には、上皮組織の研究を行う上で、細胞のご提供と多くのご助言、ご指導を賜りました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

最後に、長きに渡る研究生活を支えてくれた両親、多くの苦楽を共にし、励ましあった友人たちに感謝申し上げます。

## 参考文献

- Baba, K., Yoshida, W., Toriyama, M., Shimada, T., Manning, C. F., Saito, M., Kohno, K., Trimmer, J. S., Watanabe, R., Inagaki, N. (2018). Gradient-reading and mechano-effector machinery for netrin-1-induced axon guidance. *eLife*, 7.
- Bañón-Rodríguez, I., Monypenny, J., Ragazzini, C., Franco, A., Calle, Y., Jones, G. E., & Antón, I. M. (2011). The cortactin-binding domain of WIP is essential for podosome formation and extracellular matrix degradation by murine dendritic cells. *European Journal of Cell Biology*, 90, 213–223.
- Bard, L., Boscher, C., Lambert, M., Mege, R.-M., Choquet, D., & Thoumine, O. (2008). A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *Journal of Neuroscience*, 28, 5879–5890.
- Beningo, K. a., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J. V., & Wang, Y. L. (2001). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 153, 881–887.
- Carlos Jurado, J. R., Haserick, & Lee, J. (2005). Slipping or gripping? Fluorescent speckle microscopy in fish keratocytes reveals two different mechanisms for generating a retrograde flow of actin. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 507–518.
- Case, L. B., & Waterman, C. M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature Cell Biology*, 17, 955–963.
- Clainche, C. Le, & Carlier, M.-F. F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological Reviews*, 88, 489–513.
- Dent, E. W., & Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and guidance. *Neuron*, 40, 209–227.
- Giannone, G., Mège, R.-M., & Thoumine, O. (2009). Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends in Cell Biology*, 19, 475–486.
- Guillot, C., & Lecuit, T. (2013). Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science*, 340, 1185–1189.
- Helwani, F. M., Kovacs, E. M., Paterson, A. D., Verma, S., Ali, R. G., Fanning, A. S., Weed S. A., Yap, A. S. (2004). Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *Journal of Cell Biology*, 164, 899–910.
- Hu, K., Ji, L., Applegate, K. T., Danuser, G., Waterman-S, C. M. (2007). Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science*, 315, 111–115.
- Kubo, Y., Baba, K., Toriyama, M., Minegishi, T., Sugiura, T., Kozawa, S., Ikeda, K., Inagaki, N. (2015). Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *The Journal of Cell Biology*, 210, 663–676.
- Lammermann, T., Renkawitz, J., Wu, X., Hirsch, K., Brakebusch, C., & Sixt, M. (2009). Cdc42-dependent leading edge coordination is essential for interstitial dendritic cell

- migration. *Blood*, 113, 5703–5710.
- Maddaluno, L., Verbrugge, S. E., Martinoli, C., Matteoli, G., Chiavelli, A., Zeng, Y., Williams, E. D., Rescigno, M., Cavallaro, U. (2009). The adhesion molecule L1 regulates transendothelial migration and trafficking of dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206, 623–35.
- Mitchison, T., & Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*, 1, 761–772.
- Reis E Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: For whom the bug tolls. *Seminars in Immunology*, 16, 27–34.
- Ren, G., Helwani, F. M., Verma, S., McLachlan, R. W., Weed, S. a., & Yap, A. S. (2009). Cortactin is a functional target of E-cadherin-activated Src family kinases in MCF7 epithelial monolayers. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 18913–18922.
- Renkawitz, J., Schumann, K., Weber, M., Lämmermann, T., Pflücke, H., Piel, M., Polleux, J., Spatz, J.P., and Sixt, M. (2009). Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nat. Cell Biol.* 11, 1438–1443.
- Renkawitz, J., and Sixt, M. (2010). Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *EMBO Rep.* 11, 744–750.
- Shimada, T., Toriyama, M., Uemura, K., Kamiguchi, H., Sugiura, T., Watanabe, N., & Inagaki, N. (2008). Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *The Journal of Cell Biology*, 181, 817–829.
- Stainman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine*, 137, 1142–1162.
- Toriyama, M., Kozawa, S., Sakumura, Y., & Inagaki, N. (2013). Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through Pak1-mediated Shootin1 phosphorylation. *Current Biology*, 23, 529–534.
- Toriyama, M., Shimada, T., Kim, K. B., Mitsuba, M., Nomura, E., Katsuta, K., Sakumura, Y., Roepstorff, P., Inagaki, N. (2006). Shootin1: a protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *The Journal of Cell Biology*, 175, 147–157.
- Ward, S. G. (2006). T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends in Immunology*, 27, 80–7.
- Yanagawa, Y., & Onoé, K. (2002). CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood*, 100, 1948–56.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., & Shibata, M. (2010).  $\alpha$ -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature Cell Biology*, 12, 533–542.
- Zaidel-bar, R., Itzkovitz, S., Ma, A., Iyengar, R., & Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome, *Nature Cell Biology*, 9, 858-867.

- 酒井 瑞貴. (2018). "樹状細胞の郵送におけるshootin1bの機能解析" 修士論文.
- 嶺岸 卓徳. (2018). "脳組織形成と神経細胞の移動を担うShootin1bを介した牽引力発生メカニズムの解明" 博士論文