

特集：生体防御メカニズムの分子基盤

免疫細胞シグナルの1分子イメージングと分子動態

十川 久美子¹, 徳永 万喜洋²

最近の顕微鏡技術や蛍光プローブの開発により生きた細胞内部での個々の分子の動きをリアルタイムで観察することが可能になった。蛍光ラベルした1分子毎の動きをイメージングすることにより、細胞内分子動態の可視化はもとより分子数の定量および分子間相互作用の数値化ができる。また1分子イメージングの高感度特性を生かすことで、生きた細胞でのイベントを長時間照射損傷なく観察できる。T細胞の免疫刺激による活性化初期過程を可視化したところ、従来の説とは異なり、約100分子程度のシグナル伝達分子の集まりであるマイクロクラスター形成がシグナル開始であること、時間的かつ空間的にT細胞の活性化を制御していることが分かってきた。最近、核内でも1分子が鮮明に可視化でき、免疫刺激と応答について、細胞表面から核まで分子動態を直接明らかにする道が開拓されようとしている。

はじめに

異物の体内侵入を抗原として検知し、排除する免疫応答において重要な働きをするT細胞は、どのようにして抗原提示細胞からの情報伝達を受け取り、活性化されてゆくのだろうか。

マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞表面では、主要組織適合抗原遺伝子複合体分子 (major histocompatibility complex: MHC) により、異物由来のペプチドが抗原として提示される。それを、T細胞表面のT細胞受容体 (T cell receptor: TCR) が認識する。その結果、T細胞の活性化が引き起こされる。この現象は、抗原提示細胞と

T細胞の接触面で繰り広げられる。

T細胞が活性化されると、T細胞の接触面では、抗原特異的TCRが中央に集積し、その周りをLFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1) などの接着分子が取り囲む同心円状の特徴的な構造が形成される。この構造は、何時間も維持されており、免疫シナプスと名付けられた¹⁻³⁾。従来は、この免疫シナプス形成こそが、T細胞活性化の中心的役割を担っていると考えられてきた。ところが、活性化の指標の一つであるシグナル伝達分子のリン酸化は、免疫シナプスの形成より以前にすでに始まっているという報告が出され⁴⁾、免疫シナプスの役割に疑問が投げかけられるようになった。

この疑問に答え、抗原提示細胞とT細胞の接触面で起きている現象をつきとめるためには、実際に生きた細胞で分子を直接観察し、時間的・空間的にシグナル伝達分子が変化してゆく様子を直接可視化する必要があった。そこで我々は、刺激直後からの免疫シナプス形成過程を、分子レベルでリアルタイムに観察可能にする、新しい分子イメージングのシステムを開発し、解析を行った⁵⁾。

1. 全反射蛍光顕微鏡法 (TIRF)

明瞭な蛍光観察のためには、試料以外からの背景光をできる限り抑えることが必要である。そのためには、蛍光励

¹ 理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22)

² 東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻 (〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259 B-35)

Single molecule imaging of molecular dynamics in immune cells

Kumiko Sakata-Sogawa¹ and Makio Tokunaga² (¹Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan; ²Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 4259-B-35, Nagatsuta, Midori, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan)

起用照明を必要な範囲に限ることが有用となる。試料全体を照明する落射照明では、明るいシグナルも背景の蛍光に埋もれ、鮮明な画像が得られない。全反射蛍光顕微鏡法 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF) は、照明光の全反射により表面のみを観察する方法である。

図1に対物レンズ型全反射照明法を示す^{6,7)}。対物レンズの端に照明用のレーザー光を入射すると、カバーガラスと試料との境界面で全反射する。その際、表面の反対側にごく薄く光が浸み出す。この光は、エバネッセント光 (evanescent, “消失する” という意の英語) と呼ばれている。これは、簡単に表現すると、全反射面からの光のエネルギーの浸み出しである。反射面に垂直方向でのエネルギーの流れはないために、エバネッセント光の強度は、全反射面から深さ方向に指数関数的に減衰する。全反射面から浸み込む深さは、照明角度に依存し、およそ50~200 nm程度である。このエバネッセント光を蛍光の照明として使うと、ガラス表面近傍のみの蛍光分子を励起することができる。

全反射照明では、もう一つ重要な特徴がある。エバネッセント光の強度は、全反射境界面において、最大で入射光の約4倍に強くなる^{6,7)}。その結果、背景光を低くすると同時に、シグナル画像強度を強くすることができる。通常の落射照明から全反射に切り替えたときに、急に像のコントラストが上がるが、照明光強度が全反射により強くなることも大きく寄与している。その結果、シグナル/ノイズ比の高い画像を得ることができる。

GFPなどの蛍光タンパク質や蛍光色素分子は、励起光を当て続けると退色してしまう。退色を如何に低くするかが、重要なポイントである。退色までの時間は、照明光の強度にほぼ反比例する。退色を抑え長時間観察するためには、照明光を弱くすればよい。1分子顕微鏡を使えば、微

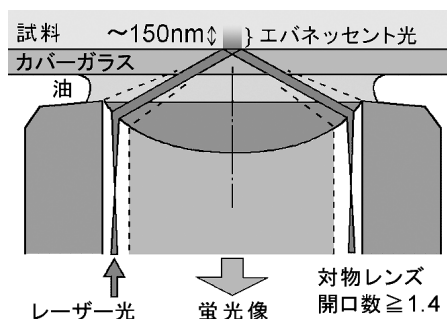


図1 対物レンズ型全反射照明の模式図

対物レンズ辺縁部にレーザー光を入射すると、カバーガラスと試料の境界面で全反射が起こる。全反射する際に、光のエネルギーがガラス表面から試料側にごく薄く漏れる。これがエバネッセント光であり、蛍光照明に用いると表面のみを高画質で観察することができる。全反射を起こすために、開口数NAが試料の屈折率 n (生きた細胞では1.37~1.40) よりも大きな対物レンズを用いる。

弱な光でも高感度にシグナル/ノイズ比の高い画像を得ることができるので、退色時間を長くすることができる。例えば、通常の共焦点顕微鏡に比べると2桁以上退色時間を長くして観察できる。この利点は、特に生細胞における分子イメージングに有効である。

2. 人工平面脂質二重膜

抗原提示細胞とT細胞間の接触面は、共焦点顕微鏡でZスキャン像を再構成することにより可視化が可能であるが、詳細な画像は今のところ得られていない。特に接触面での分子動態を観察・解析するためには、リアルタイムでの観察が必須であるが、共焦点顕微鏡での三次元走査では時間分解能が不十分である。

そこで、抗原提示細胞を模して、必要なタンパク質を埋め込んだ人工平面脂質二重膜²⁾を用いることにした(図2)。抗原-MHC複合体を直接ガラス表面に固定する方法では、抗原-MHC複合体が動くことができないため、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体の状態を再現できない。MHC分子をGPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー修飾して脂質二重膜に組み込むと、細胞膜と同様に脂質二重膜を自由に動き回ることが可能となる。

脂質二重膜を用いるもう一つの重要なメリットは、T細胞との接触面を平面として観察できることである。しかも、全反射蛍光顕微鏡法と組み合わせることで、細胞表面における分子の動きを、鮮明に観察することが可能になる。

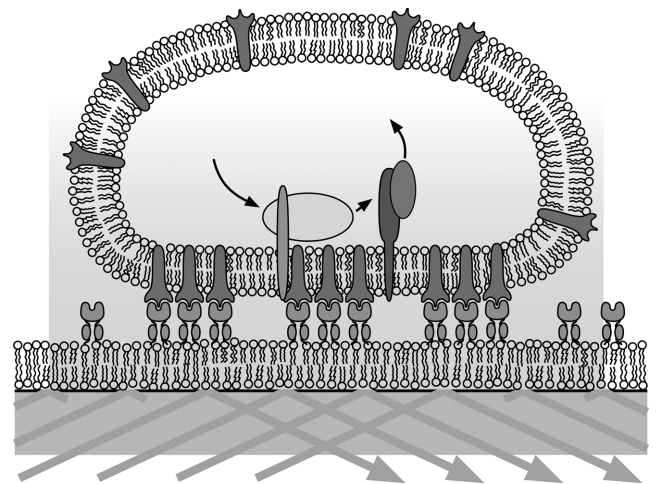


図2 人工脂質二重膜と全反射照明法による観察系

免疫刺激を引き起こす抗原分子を埋め込んだ人工脂質二重膜と、全反射照明の組み合わせにより、細胞間接触面でのシグナル伝達開始過程を可視化した。カバーガラス表面に、抗原ペプチド-MHCを組み込んだ人工脂質二重膜を張る。その上に、T細胞を上から落とす。T細胞が表面に落ちた瞬間から抗原ペプチド-MHCとの反応が開始する。その開始の瞬間から観察する。

3. 反応開始直後からのリアルタイム観察

観察対象の分子として、TCR構成タンパク質であるCD3 ζ 鎖、T細胞の代表的シグナル伝達タンパク質のチロシンキナーゼであるZap70、および相互作用の場を提供する役割のアダプタータンパク質であるSLP-76の3種類に注目した。それぞれのGFP-融合タンパク質を発現させたT細胞について観察を行った。

抗原提示細胞を模した人工平面脂質二重膜にT細胞を落とすと、接触直後から多数のマイクロクラスター（直径1ミクロン以下）が接触面一面に形成されるのが見られた（図3）⁵⁾。マイクロクラスターにはTCRだけでなく、シグナル伝達分子やアダプタータンパク質が含まれること、細胞内カルシウム濃度が細胞接触直後のマイクロクラスター形成と同時に上昇することから、マイクロクラスターがT細胞の活性化初期過程に関与していることが示唆された。

T細胞は、接触面を拡げながら1~2分後に最大まで拡

がり、その後収縮した。細胞の収縮に伴い、マイクロクラスターは中心に向かって移動を始めた（図4）。移動の過程でシグナル伝達分子、アダプタータンパク質はマイクロクラスターから解離し、約5~10分後には、細胞中心でTCRのみが集積したcSMAC（central-supramolecular activation cluster）という特徴的な免疫シナプス形成が観察された（図5）。cSMACでは、シグナル伝達分子が存在せず、タンパク質のリン酸化も見られないが、T細胞辺縁では、シグナル伝達分子を含む新たなマイクロクラスターが形成され、リン酸化も行われていることから、cSMACがT細胞活性化維持の役割を果たしていると示唆された。

4. T細胞活性化初期過程の時空間的制御

抗原ペプチドを加えない人工平面脂質二重膜では、T細胞の接触面にマイクロクラスターが形成されない。このことから、マイクロクラスターは、あらかじめ細胞内にできているのではなく、抗原ペプチド-MHC複合体と相互作用

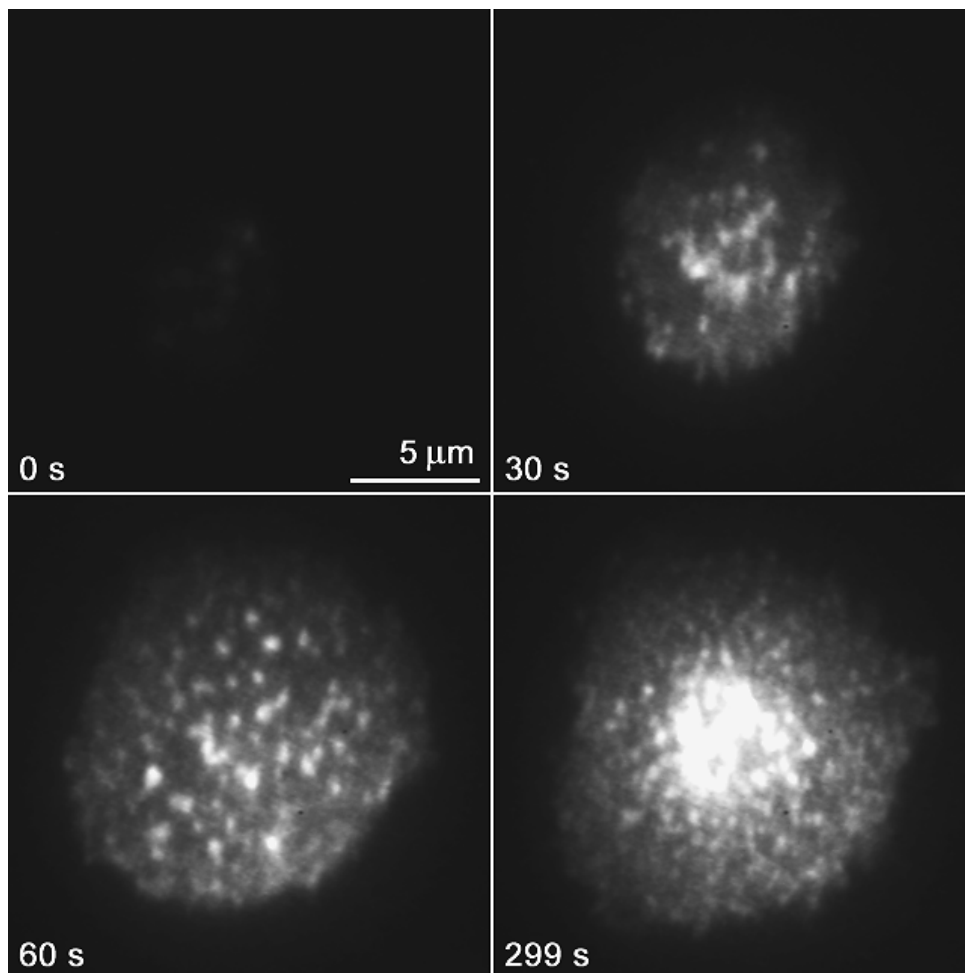


図3 免疫細胞におけるシグナル伝達開始の可視化
刺激開始の瞬間（ $t=0$ 秒）からのリアルタイム観察分子イメージング。T細胞リセプター（CD3 ζ ）が反応開始とともに集まり、分子集合体であるマイクロクラスターが形成される。従来の説とは異なりマイクロクラスター形成が、シグナル開始に重要であることが分かった。バー、5 μm 。

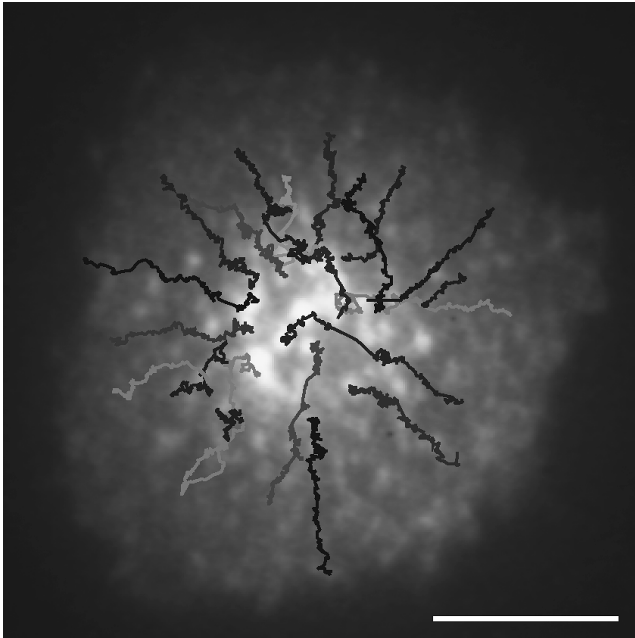


図4 マイクロクラスター移動の軌跡

細胞接着全面で形成されたマイクロクラスターは、やがて中央に向けて移動し、集積して免疫シナプス構造を形成する。マイクロクラスターの軌跡は、周辺部から中央に向けて、ある程度直線的だがゆらぎながら移動する。バー、5 μm 。

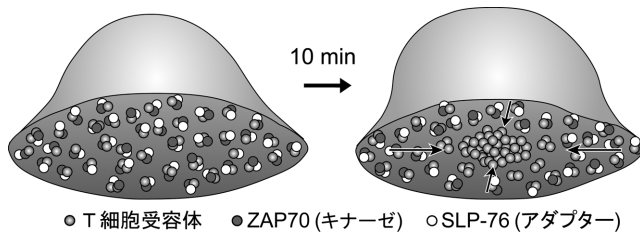


図5 マイクロクラスター形成の模式図

マイクロクラスターは最初に全面で形成される。数分後から中央に集積し、免疫シナプス構造を形成する。TCRは中央に集積するが、ZAP70(チロシンキナーゼ)とSLP-76(アダプター)は途中でマイクロクラスターから解離する。免疫シナプスが形成されると共に、マイクロクラスターは周辺だけで新たに形成されるようになる。

することにより初めて形成されると考えられる。その後、速やかにZap70およびSLP-76がマイクロクラスターに集められてくる。三者が共存する間は、リン酸化を介して活性化が起きている。

マイクロクラスターが中心部へ移行するのに伴い、Zap70やSLP-76が解離する(図5)。TCRは、マイクロクラスターを形成したまま中心部分に集積し、cSMACを形成する。latrunculin-A添加によりマイクロクラスターの中心部への移行が妨げられることから、アクチンの関与が示唆されている⁸⁾。cSMACは、リン酸化反応が起きず、活性化の場ではないと考えられる。その役割については、抗原提示細胞とT細胞を安定に接着させておくためのアン

カーとして機能している、あるいはTCRを細胞内に取り込んで再利用する場である、などが考えられる。

最近、免疫シナプス形成後の抗体染色の結果、後期エンドソームである多胞体(MVB: multivesicular body)に含まれる脂質であるlysobisphosphatidic acid(LBPA)が辺縁部のマイクロクラスターには存在しないにも拘わらず、cSMACに集積するという興味深い結果が報告された⁸⁾。これは、cSMACがTCR分解に関与していることを示唆している。TCRは分解されるべく中心部に集められるのかもしれない。

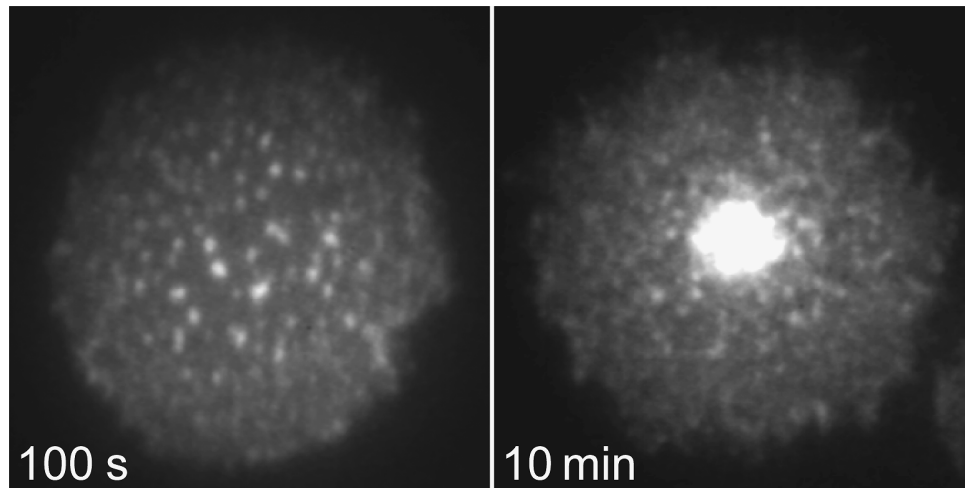
5. マイクロクラスターの蛍光1分子定量解析

1分子蛍光強度との比較から、マイクロクラスターの蛍光強度解析により分子数の定量を行った⁵⁾。細胞の接触直後に形成されるマイクロクラスター、およびcSMAC形成後に周辺部で新たに形成されてくるマイクロクラスターは50~100分子程度と計算された(図6)。また、中心近くに移動し、融合した大きめのものでは200~500分子程度の集合体であると分かった。なぜ100分子程度の集合がシグナル開始になるのか興味深い問題である。1分子イメージングによる定量解析を進めることにより、解明できると考えている。

6. T細胞補助刺激因子によるシグナル

T細胞の活性化では、今まで述べてきたTCRによる抗原特異的なシグナルの他に、CD28などの補助刺激因子が関与する抗原特異性のないシグナルが同時に伝えられる。このシグナルにより、増殖、分化、サイトカイン産生または免疫不応答といったT細胞の運命が左右されている。補助刺激因子のTCRマイクロクラスターとの関わりを調べるために、人工平面脂質二重膜にCD28の抗原提示細胞におけるリガンドであるCD80を追加して、クラスター形成を観察した⁹⁾。接触直後、および周辺部分で新たに形成されるマイクロクラスターでは、CD28が共存するのが見られた。TCRと共に細胞中央への移行が観察され、集積が確認されたが、TCRの集積するcSMACに隣接し、取り囲むような環状構造を形成した。さらにシグナル伝達分子であるPKC θ がCD28にリクルートされ、同様に集積した。cSMACにおけるTCR集積と異なり、CD28の環状クラスターではリン酸化が行われ、活性化に関与していると示唆される。

補助刺激因子は、マイクロクラスターでは、TCR、キナーゼ、アダプターおよびシグナル伝達分子と共存し、活性化開始の場を形成しているが、時間と共に、細胞中央部のTCRとは異なる場所に集積し、活性化の維持に関与していると考えられる。T細胞活性化において、TCRシグナル、補助因子シグナルのどちらもが時間的空間的に制御



	小	中	大
100 s	52 ± 26	144 ± 48	337 ± 146
10 min	54 ± 19	135 ± 55	—

図6 マイクロクラスター中に含まれる TCR 分子の数

1 分子像と、マイクロクラスター像との蛍光強度を比べることにより、マイクロクラスター中の TCR 分子数を評価した。100 秒後と 10 分後の画像（上図）から計測した結果を表に示す。周辺の小さなマイクロクラスターは約 50 分子、中間体の中程度のマイクロクラスターは約 100–200 分子、100 秒後の中心部の大きなマイクロクラスターは約 200–500 分子を含んでいた。分子数が大きな偏差を示しているのは、マイクロクラスター同士が離合集散して大きく変化しているためである。

され、T 細胞の免疫応答の調節が行われている^{9,10)}。

7. おわりに

最近、薄層斜光照明法 (HILO microscopy) を用いて、細胞内部でも鮮明に 1 分子を可視化することが可能となった¹¹⁾。細胞表面から核まで、シグナル伝達に伴う変化や分子動態を、1 分子レベルで直接観察できる。さらに、時間・空間・分子種の関数として相互作用を定量可能である。免疫細胞における刺激と応答、感度と選択性の分子機構を、直接的に解明する新たな道が拓かれようとしている。

文 献

- Monks, C.R.F., Freiberg, B.A., Kupfer, N.S., & Kupfer, A. (1998) *Nature*, 395, 82–86.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., & Dustin, M.L. (1999) *Science*, 285, 221–227.
- Huppa, J.B. & Davis, M.M. (2003) *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 973–983.
- Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., & Shaw, A.S. (2002) *Science*, 295, 1539–1542.
- Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L., & Saito, T. (2005) *Nat. Immunol.*, 6, 1253–1262.
- Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A.H., & Yanagida, T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 47–53.
- 徳永万喜洋 (2002) バイオイメージングでここまで理解 (わかる) (楠見, 小林, 吉村, 徳永編), pp. 104–113, 羊土社, 東京.
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., & Dustin, M.L. (2006) *Immunity*, 25, 117–127.
- Yokosuka, T., Kobayashi, W., Sakata-Sogawa, K., Takamatsu, M., Hashimoto-Tane, A., Dustin, M.L., Tokunaga, M., & Saito, T. (2008) *Immunity*, 29, 589–601.
- Seminario, M.-C. & Bunnell, S.C. (2008) *Immunol. Rev.*, 221, 90–106.
- Tokunaga, M., Imamoto, N., & Sakata-Sogawa, K. (2008) *Nat. Methods*, 5, 159–161.