

## 研究成果報告書の概要

講座等名	生体情報部門	事業推進者名	松田 達志
所属部門	代謝部門		
分担研究課題	Arf-mTORC1 軸を介した免疫制御機構の解明		
キーワード	小胞輸送制御、Arf ファミリー、mTORC1、細胞増殖		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			4名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）</p> <p>松田達志（准教授）：研究の総括          住吉麻実（助教）：T細胞における Arf 経路の役割解明          小谷唯（研究員）：B細胞における Arf 経路の役割解明          Hanh Hong CHU（研究員）：好酸球における Arf 経路の役割解明</p>			
<p>研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）</p> <p>ADP-ribosylation factor (Arf)は Arf1-6 から成る低分子量 G タンパク質ファミリー分子であり、細胞の恒常性維持に必須な小胞輸送を制御することが知られている。また、ショウジョウバエ由来培養細胞を対象にした siRNA ライブラリースクリーニングにより、mTORC1 経路の活性化に關与する可能性が示唆されている。しかし、従来得られているこれらの知見は、培養細胞を対象とした過剰発現や阻害剤を用いた解析に依拠しており、実際の生体内でどのような生理機能を担っているかについては、驚くほど知見が少ない。例えば、Arf 阻害剤である Brefeldin A は <i>in vitro</i> で T 細胞からのサイトカイン分泌阻害に用いられるが、個体レベルの免疫応答において Arf 経路が果たす役割は不明であった。そこで、Arf 経路の生理的役割を明らかにすべく、Arf の免疫細胞特異的ノックアウトマウスの樹立に取り組んだ。具体的には、mTORC1 経路を介した制御が知られる T 細胞・B 細胞、ならびに予備的な解析から mTORC1 経路が分化過程で必須の役割を果たすことが示唆されている好酸球のそれぞれについて、Arf 経路の欠損が及ぼす影響の検証に取り組んだ。</p> <p>T 細胞においてどのファミリーメンバーが発現しているかを qPCR によって評価したところ、Arf1 と Arf6 が高いレベルで発現していることが明らかとなった。そこで、T 細胞特異的 Cre 発現マウスである Lck-Cre と Arf1-flox マウス・Arf6-flox マウスをそれぞれ交配することで、T 細胞特異的な Arf1 欠損マウス（以下、Arf1-TKO）・Arf6 欠損マウス（以下、Arf6-TKO）を樹立した。驚くべきことに、Arf1-TKO・Arf6-TKO は、何れも T 細胞分化に目立った変化は認められず、BrefeldinA 処理で認められるようなサイトカインの産生阻害も一切観察されなかった。この表現型は Arf1-TKO と Arf6-TKO を交配して得られる Arf1/6-TKO マウスにおいても同様であった。そこで、以降、Arf1/6-TKO に着目して免疫応答能に変化が認められるか否か、種々の解析に取り組んだ。その結果、Arf1/6-TKO マウスでは、B 細胞による抗体産生のヘルプ機能は正常に認められるにも関わらず、多発性硬化症のモデルとして知られる EAE の発症がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。現在、その分子メカニズムの解明に取り組んでいる。</p> <p>B 細胞における Arf 経路の役割を明らかにすべく、同様に、B 細胞特異的 Cre 発現マウスで</p>			

ある mb1-Cre マウスと、Arf1-flox・Arf6-flox・Arf1/6-flox との交配を進めたところ、B 細胞特異的な Arf1 欠損マウス（以下、Arf1-BKO）・Arf6 欠損マウス（以下、Arf6-BKO）・Arf1/6 二重欠損マウス（以下、Arf1/6-BKO）において、それぞれ末梢 B 細胞数の低下と骨髄における部分的な分化障害が観察された。一方、個体に対する免疫応答を調べたところ、Arf1-BKO と Arf1/6-BKO においてのみ著しい抗体産生能の低下が認められた。すなわち、B 細胞による抗体産生過程において Arf1 が重要な役割を果たすことが強く示唆された。現在、その分子機構の解明に取り組んでいる。

骨髄細胞から *in vitro* で好酸球を分化誘導する際に、mTORC1 阻害剤である rapamycin を共存させると得られる好酸球数が著しく減少すること（未発表）から、Arf-mTORC1 軸が好酸球分化に関わる可能性を考えた。そこで、タモキシフェン誘導性に Arf1 ならびに Arf6 を欠損可能なマウス（以下、Arf1-CreERT2 ならびに Arf6-CreERT2）マウスを樹立し、*in vitro* 分化系における Arf 欠損の効果検証に取り組んでいる。マウスの樹立が先行している Arf6-CreERT2 由来の骨髄において、タモキシフェン添加群における好酸球数の低下が観察されており、そのメカニズムの解析を進めている。