

## 研究題目

プロテオミクスを用いた NKT 細胞分化・活性化メカニズムの解明

### 研究組織

研究代表者：山崎 晶（大阪大学微生物病研究所）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：石川 絵里（大阪大学微生物病研究所）

#### 【1】研究の概要

##### [1-1]本研究の目的・概要

我々はタンパク質キナーゼ PKD の T 細胞特異的欠損マウスにおいて T リンパ球の一種である NKT 細胞が殆ど消失することを見出した。本共同利用では、NKT 細胞の分化・活性化メカニズムの解明を目的とし、NKT 細胞における PKD の基質を大規模に解析するため、リン酸化プロテオーム解析を行った。

##### [1-2]研究の方法・経過

CRISPR/Cas9 システムにより作成した PKD 欠損 NKT 細胞株を用いて、TMT (tandem mass tag) 法による大規模リン酸化プロテオーム解析を実施し、NKT 細胞における PKD 基質候補タンパク質の網羅的探索を行った。その結果、PKD リン酸化モチーフに一致し、かつ以前行った conventional T 細胞を用いた解析では同定されなかった分子をいくつか見出した。現在これらの候補分子について、PKD との共発現下でのリン酸化の詳細な解析や、リン酸化をバンドシフトにより検出できる Phos-tag を用いたウェスタンブロッティングにより、PKD の基質であるか否かの検証を行っている。

#### 【2】研究成果

##### [2-1]本共同利用で明らかになった研究成果

TMT 法による大規模リン酸化プロテオーム解析により、NKT 細胞特異的と考えられる PKD の基質候補分子がいくつか同定された。

まず、これらの分子のうちリンパ球分化に寄与することが報告されている転写因子に着目した。Flag タグを付加したコンストラクトを HEK293 細胞で PKD と共発現させ、抗 Flag 抗体により免疫沈降を行いリン酸化部位の同定を試みたところ、大規模解析で検出されたリン酸化が確かに PKD 存在下で増強することが明らかとなった。

さらに、他の基質候補分子のうちの 1 つが、野生型 PKD と共発現させた時のみ、Phos-tag ウェスタンブロッティングでリン酸化される様子が見られたことから、この分子は基質である可能性が高いと考えられた。そこで、この分子についても Flag タグを付加し同様の解析を行ったところ、大規模解析で同定されたリン酸化が PKD 依存的に増強した。以上の結果から、これらの分子は PKD の基質である可能性が極めて高いことが明らかとなった。

[2-2] 本共同利用による波及効果及び今後の発展性

NKT 細胞の分化は通常の T 細胞とは異なる選択過程を経て、異なる転写因子により制御されるが、その転写因子発現に至るシグナル経路の理解は遅れている。我々が作製した T 細胞特異的 PKD 欠損マウスでは NKT 細胞が殆ど消失することから、NKT 細胞における PKD 下流リン酸化ネットワークを明らかにできれば、未解明の NKT 細胞分化の分子機構解明に繋がると考えられる。本共同利用により、NKT 細胞における PKD の基質候補分子が同定され、その一端が解明されつつある。

NKT 細胞は免疫応答の制御、がん免疫、病原体感染防御などに働くことが知られているが、NKT 細胞の活性化にも PKD が寄与することがこれまでの研究結果から示唆されている。よって、本共同利用で得られた結果により今後 PKD の基質が明らかとなれば、NKT 細胞の効率的な活性化を誘導するための創薬ターゲットとなる可能性もある。

### 【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

- 1) [雑誌] なし
- 2) [書籍] なし

[3-2] 学会発表

- 1) 石川絵里、山崎晶  
NKT 細胞分化における PKD の役割  
第 28 回 Kyoto T Cell Conference  
京都大学医学部芝蘭会館  
平成 30 年 6 月 15 日～16 日

2) ISHIKAWA Eri, YAMASAKI Sho  
Pivotal role of protein kinase D in innate-like T cell development

第 47 回 日本免疫学会総会・学術集会  
福岡国際会議場  
平成 30 年 12 月 10 日～12 日

[3-3] 成果資料等  
なし

### 【4】 今後の課題等

今回得られた基質候補分子が PKD の直接の基質であるか否かを *in vitro* kinase assay により検証する必要がある。また、今回は HEK293 細胞での過剰発現系を用いたが、基質候補分子の生体内における実際の機能を調べるためには、NKT 細胞で stable かつ内在性分子と同程度に発現させた系を用いた検証が必要である。今後基質が明らかとなれば、PKD によるリン酸化を介して制御される相互作用分子を同定し、PKD が寄与する NKT 細胞分化の分子機構を明らかにしていきたい。