

研究題目

リン酸化プロテオミクスによる NKT 細胞分化の分子メカニズムの解明

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

我々はプロテインキナーゼ D (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、NKT 細胞を含む innate-like T 細胞がほぼ消失することを見出した。NKT 細胞における PKD 基質分子を網羅的に探索するため、PKD 欠損細胞株を作製し、昨年度の共同利用において TMT (tandem mass tag) 法を用いた大規模定量リン酸化プロテオーム解析を実施したところ、NKT 細胞特異的と考えられる基質候補タンパク質が多数同定された。そこで本共同研究では、これら基質候補分子やリン酸化不能型変異体タンパク質を生化学的手法、リン酸化プロテオミクスの手法を用いて解析することで、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し、NKT 細胞ひいては innate-like T 細胞分化の分子機構を解明することを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

今年度は、3 つの基質候補分子の組換えタンパク質と PKD との *in vitro* キナーゼアッセイを行い、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、候補分子が PKD の直接の基質となり得るかを検討した。また、リン酸化フォームと考えられるシフトバンドを切り出し、*in-gel digestion* したサンプルを質量分析にかけることで、PKD によるリン酸化部位の同定を行なった。さらに、同定されたリン酸化部位のセリンをアラニンに置換したリン酸化不能型変異体を作製し、PKD によるリン酸化が見られなくなるか

否かを Phos-tag ウェスタンブロッティングにより確認した。

現在は、NKT 細胞株に基質候補分子の野生型あるいは変異体を内在性分子と同レベルに発現させた細胞の作製を進めており、免疫沈降後に質量分析し、PKD によるリン酸化を介して制御される相互作用分子の同定を試みようとしている。また、上記で PKD によるリン酸化部位が同定された 3 つの基質候補分子について、リン酸化不能型変異体ノックインマウスの作製を進めている。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

3 つの基質候補分子と活性化 PKD を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行なったサンプルを Phos-tag ウェスタンブロッティングで解析したところ、いずれの分子もリン酸化フォームと考えられるシフトバンドが検出された。また、このバンドに含まれるタンパク質をゲルより切り出してトリプシン消化し、質量分析により解析したところ、昨年度行なった NKT 細胞株の大規模定量リン酸化プロテオーム解析で検出された部位と同じリン酸化部位が同定された。また実際、同定されたリン酸化部位のセリンをアラニンに置換したリン酸化不能型変異体は、PKD との共発現下においてリン酸化されることが Phos-tag ウェスタンブロットによって明らかとなった。これらの結果から、3 つの基質候補分子は PKD の直接の基質であることが強く示唆された。

考え、マウスの作製を進めている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

NKT 細胞を含む innate-like T 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詳細は未だ明らかになっていない。T 細胞特異的 PKD 欠損マウスでは NKT 細胞を含む innate-like T 細胞がほぼ消失することから、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することで、NKT 細胞ひいては innate-like T 細胞分化の分子機構解明に繋がると考えられる。今年度の研究により、NKT 細胞における PKD の直接の基質である可能性が極めて高い 3 分子が同定され、その一端が解明されつつある。現在作製中の基質候補分子のリン酸化不能型変異体のノックインマウスの解析や、基質分子のリン酸化により変化する相互作用分子の解析により、さらに innate-like T 細胞分化の分子機構の解明に近づくことが期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

NKT 細胞における PKD の直接の基質である可能性が高い分子が同定されたので、今後はこれら分子の PKD によるリン酸化がどのように NKT 細胞分化を制御しているかを明らかにしたいと考えている。生体内における実際の機能を調べるためには、これら分子を NKT 細胞で安定に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。この細胞の作製を進め、ターゲット質量分析によるリン酸化部位の精密定量や、PKD によるリン酸化を介して制御される相互作用分子の同定を目指す。また、基質分子のリン酸化の意義を生体レベルで確認するためには、PKD によるリン酸化不能型変異体のノックインマウスの解析が必要と