

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

我々は以前に、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 リンパ球の一種であり、NKT 細胞や Mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞などが含まれる innate-like T 細胞がほぼ消失することを見出した。そこで昨年度までの共同研究により、NKT 細胞での PKD 基質を網羅的に探索するために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、基質候補タンパク質が多数同定された。

本年度の共同研究では、これら候補分子が PKD の直接の基質であるか否かを検証し、NKT 細胞特異的な PKD 基質の同定を目指した。さらに、PKD によるリン酸化によって制御される相互作用因子の同定や、リン酸化不能型変異体ノックインマウスの作製により、PKD が寄与する NKT 細胞分化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

大規模定量リン酸化プロテオーム解析により同定された PKD 基質候補分子のうち、T 細胞の分化や活性化に寄与することが報告されている幾つかの分子について、GST 融合タンパク質を作成し、*in vitro* キナーゼ

アッセイを行い、Phos-tag SDS-PAGE で解析した。その結果、PKD により直接リン酸化される分子が見出されたため、このリン酸化分子の質量分析と共に、リン酸化部位をアラニンに置換したリン酸化不能型変異体の作製により、PKD によるリン酸化部位の同定を試みた。

次に、PKD が関与する NKT 細胞分化の分子機構を生体レベルで明らかにするため、これら分子の PKD によるリン酸化不能型変異体のノックインマウスを作製し、胸腺 NKT 細胞の割合および数を野生型マウスと比較した。

並行して、PKD によりリン酸化された分子の機能制御を明らかにするため、野生型またはリン酸化不能型変異体を安定かつ内在性分子と同程度に発現させた NKT 細胞株を作製した。免疫沈降後に質量分析を行い、PKD によるリン酸化によって制御される相互作用分子の大規模同定を試みた。しかし、基質候補分子の免疫沈降の効率が良くなかったため、現在は BioID（近位依存性ビオチン標識）法を用いて相互作用分子の同定を進めている。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

大規模定量リン酸化プロテオーム解析により同定された PKD 基質候補分子のうち、T 細胞分化や活性化への寄与が報告されている 3 つの分子について *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、3 分子とも PKD により直接リン酸化され、PKD の基質となりうることが明らかとなった。また、これら分子のリン酸化フォームを Phos-tag SDS-PAGE ゲルより切り出し、質量分析を行ったところ、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部位のリン酸化が検出された。さらに、このうちの 1 分子については、リン酸化部位をアラニンに置換したリン酸化不能型変異体では、PKD との共発現下でリン酸化されなかったことから、これら基質候補分子は PKD の直接の基質であることが強く示唆されると共に、そのリン酸化部位を同定できたと考えられた。

また、上記候補分子の 1 つである転写因子のリン酸化不能型変異体ノックインマウスにおいて、preliminary な結果ではあるが、胸腺 NKT 細胞の割合が野生型マウスの半分程度に減少する結果が得られている。一方、他の 2 分子のリン酸化不能型変異体のノックインマウスでは、野生型と比べ変化は見られなかった。

[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。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。実際、本共同研究により、NKT 細胞における PKD の基質分子である可能性の高い転写因子が同定され、このリン酸化不能型変異

体ノックインマウスでは NKT 細胞が減少する傾向が見られていることから、その一端を解明しつつあると考えている。

また、PKD は細胞質のみでなく核にも局在する分子であり、T 細胞においては核内における基質が一つ報告されているが、転写因子をリン酸化するという報告はこれまでにない。よって、本研究は PKD の新たな分子機能を提示するものと考えられる。

【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

本研究で NKT 細胞における PKD の基質であることが強く示唆された転写因子について、実際に生体内の NKT 細胞においても PKD 依存的にリン酸化されているかを検証する必要がある。この目的のため、PRM (parallel reaction monitoring) 法を用いたターゲット質量分析により、PKD の活性化前後でのこのリン酸化部位の精密定量を計画している。今後は、PKD によるリン酸化を介して制御される基質分子の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の詳細を明らかにすることが大きな課題であると考えている。