

研究題目 GNA family による PLCβ の修飾とその生理的意義の解明

研究組織

研究代表者：山本 雅裕（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：笹井 美和（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

トキソプラズマ原虫は健常人が感染しても免疫系により制御され、重篤な症状を示さない日和見感染症を引き起こす病原体である。トキソプラズマ原虫感染に対する感染防御機構には様々な経路が関与していることが報告されているが、中でも II 型インターフェロンであるインターフェロン γ (Interferon- γ : IFN- γ) によって発現が誘導される p55 GTPase 群や p47 GTPase 群を介したトキソプラズマ原虫含有膜の破壊は、トキソプラズマ原虫感染に対する生体防御機構の要であることが近年の報告で明らかとなっている。

研究代表者らのグループは、トキソプラズマ原虫感染による IFN- γ 産生には CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の両者が関与していることを過去に報告していたが、この両者による IFN- γ 産生に違いがあるかなどは不明であった。そこで、研究代表者らは TCR からのシグナル伝達について解析を行い、CD8 陽性 T 細胞からの IFN- γ 産生に特異的に関与している分子として PLCβ4 を同定した。しかし、TCR からのシグナルが入ったあと、PLCβ4 がどのように制御され IFN- γ 産生に関与しているのか、詳細は未解明であった。

そこで、本共同研究は、TCR からのシグナルが入った際の PLCβ4 翻訳後修飾について、質量分析装置を用いて検討することを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

これまでの解析により、GNA family の中でも

GNAQ が PLCβ4 の上流で、TCR を介した CD8 陽性 T 細胞からのシグナル伝達経路に関与していることが明らかとなっていたことから、GNAQ の GTPase 活性化が何かしら PLCβ4 に翻訳後修飾をしているのではないかと考えた。予備的な解析の結果、ヒト腎由来 293 細胞において、GNAQ と PLCβ4 との相互作用が確認できていたことから、293 細胞に PLCβ4 単独または PLCβ4 と恒常活性化型 GNAQ(Q209L) を共発現させ、PLCβ4 に見られる翻訳後修飾について、免疫沈降後に LC-MS/MS 解析を行った。その結果、PLCβ4 の 886 番目のスレオニンに明らかなリン酸化と、889 から 891 番目の連続したセリンのどれかにリン酸化が見られることがわかった (図 1A)。より詳細なリン酸化部位を同定するため、PLCβ4 の T886A の変異に加え、S889、S890、S891 のそれぞれをアラニンに置換した T886A/S889A、T886A/S890A、T886A/S891A のそれぞれを作成した。293 細胞に変異型 PLCβ4 を単独で発現させる場合と、GNAQ(Q209L) と共発

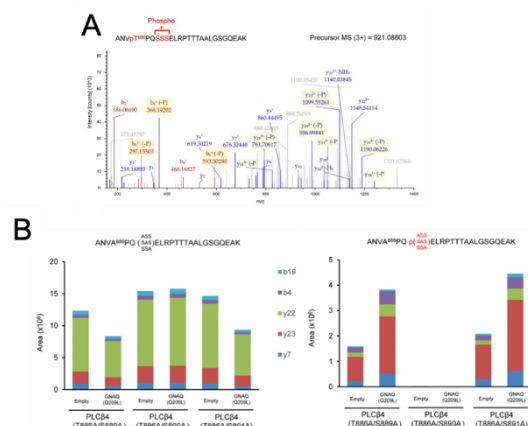


図1 質量分析装置を用いたPLCβ4のリン酸化部位の同定

A. 293細胞に野生型PLCβ4単独または恒常活性化型GNAQを共発現させた際のリン酸化の変化
 B. 293細胞に予想されたPLCβ4のリン酸化部位に変異を入れた変異PLCβ4のリン酸化量の変化

現させた場合の各変異型 PLCβ4 のリン酸化量について PRM 法によって検討した結果、PLCβ4 の T886A/S890A 変異型は完全にリン酸化が検出されなくなった (図 1B) これらの結果から、PLCβ4 は GNAQ の下流で T886 および S890 がリン酸化されていることが示唆された。

この PLCβ4 のリン酸化が CD8 陽性 T 細胞の活性化に関与しているかを明らかにするため、PLCβ4 欠損マウス由来の CD8 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて野生型 PLCβ4 または予測リン酸化部位変異 PLCβ4 (PLCβ4 T886A/S890A) を発現させ、CD8 陽性 T 細胞を活性化させた際の IFN-γ の産生量について検討した。その結果、TCR 刺激を行なった際の CD8 陽性 T 細胞からの IFN-γ 産生は、PLCβ4 T886A/S890A を発現した細胞では、野生型 PLCβ4 を発現した細胞に比べ顕著に IFN-γ の産生量が低下した (図 2 B)。

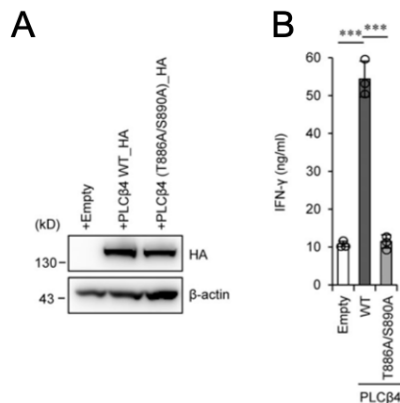


図2 質量分析装置で同定されたPLCβ4リン酸化の意義
 A. PLCβ4欠損マウス由来CD8T細胞に野生型PLCβ4または変異PLCβ4をレトロウイルスベクターを用いて発現させた際の発現量の比較 B. PLCβ4欠損マウス由来CD8T細胞に野生型PLCβ4または変異PLCβ4をレトロウイルスベクターを用いて発現させた後、CD8T細胞を活性化させた際のIFN-γ産生量

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本共同研究により、TCR からのシグナルが入ると、PLCβ4 は GNAQ と結合して、T886 と S890 がリン酸化され、このリン酸化は CD8 陽性 T 細胞において PLCβ4 を介した IFN-γ の産生に必須であることが明らかとなった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究により、CD8 陽性 T 細胞特異的に IFN-γ の産生を増強する新規分子 PLCβ4 の翻訳後修飾部位が同定された。このリン酸化は TCR を介して CD8 陽性 T 細胞が活性化された際に特異的に関与している GNAQ 依存的であり、CD8 陽性

T 細胞特異的な制御機構であることから、CD8 陽性 T 細胞を特異的に活性化することのできる創薬の開発が期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Uncovering a novel role of PLCβ4 in selectively mediating TCR signaling in CD8⁺ but not CD4⁺ T cells. Sasai M, Ma JS, Okamoto M, Nishino K, Nagaoka H, Takashima E, Pradipta A, Lee Y, Kosako H, Suh PG, Yamamoto M. 2021, J Exp Med. 218(7), e20201763.

[3-2]学会発表

山本雅裕、「Role of PLCbeta4 in CD8+ T cell signaling」、The 2nd ImmunoSensation2-IFREC-Joint Workshop. 2021 Dec 16-17. online.

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究により、これまで同じだと考えられていた CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の細胞内シグナル伝達機構が異なった分子により制御されていることが明らかとなった。今回同定された PLCβ4 以外にも CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞のシグナル伝達機構には異なる制御機構があることが期待される。今後は、さらなる新規分子の探索を行うと共に、種々の T 細胞特異的に活性化・抑制化することのできる創薬を開発し、抗トキソプラズマ応答だけでなく CD8 陽性 T 細胞が機能する抗がん免疫の亢進を目指したい。