

徳島大学先端酵素学研究所「共同利用」成果報告書

【氏名・所属・職位】

山崎 晶 九州大学生体防御医学研究所・教授

研究分担者

大洞 将嗣 九州大学生体防御医学研究所・准教授

柴田 健輔 九州大学生体防御医学研究所・助教

石川 絵里 九州大学生体防御医学研究所・助教

【研究項目】共同利用 A-3 (プロテオーム解析)

【研究課題】プロテオミクスを用いたリンパ球恒常性維持機構の解明

【目的】これまでに我々はタンパク質キナーゼ PKD が T 細胞抗原受容体刺激依存的にリン酸化されること、また、T 細胞特異的 PKD 欠損マウスにおいて胸腺細胞分化異常が起こることを見出している。本研究課題では、PKD の基質を大規模に解析することを目的とし、リン酸化プロテオーム解析を行った。

【方法】PKD 欠損マウス由来胸腺細胞を用い、2D-DIGE とショットガン LC-MS/MS により PKD 基質候補タンパク質の網羅的な探索を行った。これまで 2D-DIGE によりいくつかの候補分子を得ていたが、2次元ゲル電気泳動の条件を変えて 2D-DIGE を行うことや、電気泳動を行わずに細胞由来のリン酸化ペプチドを大規模に LC-MS/MS 解析することにより、新たな候補分子の検出を試みた。また、質量分析により PKD による基質のリン酸化部位を同定し、野生型と PKD 欠損マウス由来胸腺細胞におけるリン酸化の比較定量を行った。

【成果】PKD 欠損胸腺細胞よりリン酸化タンパク質を精製し、以前行った条件 (pH4-7) より幅広い等電点の分子を検出できる条件 (pH3-10) で 2D-DIGE を行ったところ、前回は検出できなかった新たなスポットが検出され (図 1)、マススペクトル解析により新たな基質候補分子が同定された。これらのうちの 1 つはすでに T 細胞分化に寄与することが報告されている分子であったが、*in vitro* キナーゼアッセイの結果では、PKD の直接の基質ではないことが明らかとなった。

フォスファターゼ SHP-1 を含めたいく

つかの分子は、以前行った 2D-DIGE により同定され、*in vitro* キナーゼアッセイにより PKD の直接の基質であることが明らかとなっている。また、変異体作成によりこれらの分子の PKD によるリン酸化部位が同定されているが、実際に胸腺細胞において TCR 刺激および

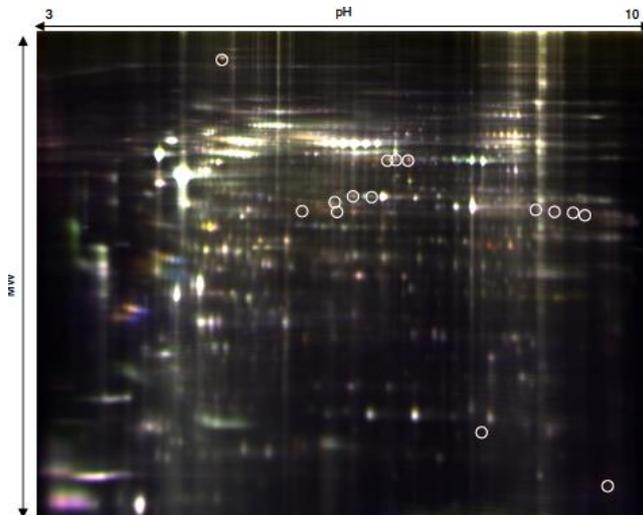


図1 胸腺細胞より精製したリン酸化タンパク質の 2D-DIGE
○=今回新たに検出された PKD 欠損によりリン酸化が减弱している分子 (赤色のスポット)

PKD 依存的にリン酸化されているか否か、また、SHP-1 のフォスファターゼ活性への関与が報告されている他の部位のリン酸化状態が PKD 欠損により変化しているか否かを明らかにするため、リン酸化ペプチドの parallel reaction monitoring (PRM)による定量を行った。これまでに同定されたいくつかの分子のうち、実際の胸腺細胞では SHP-1 ともう 1 つの分子のリン酸化部位についてのみ TCR 刺激および

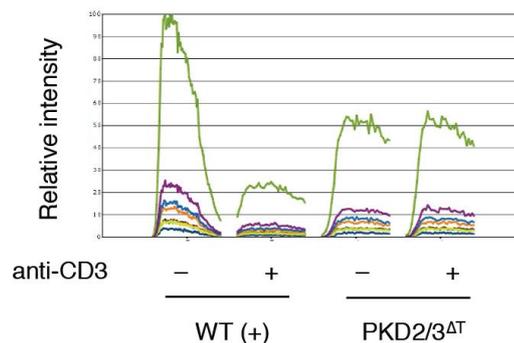


図 2 PRM 法による SHP-1 のリン酸化部位の定量解析

PKD 依存的なリン酸化が認められたが、他の候補分子のリン酸化部位については PKD 依存性が認められなかった。SHP-1 のフォスファターゼ活性に関与することが報告されているリン酸化部位については、野生型細胞では TCR 刺激によりリン酸化が減少するが、PKD 欠損細胞ではその減少が認められなかったことから (図 2)、PKD が SHP-1 のターゲット部位をリン酸化することで、SHP-1 の活性に寄与するリン酸化部位に影響を及ぼし、SHP-1 の機能を変化させている可能性が示唆された。

さらに、tandem mass tag (TMT)法と酸化チタン(TiO₂)によるリン酸化ペプチドの精製を組合せた TMT10/TiO₂法により、野生型胸腺細胞の刺激ありなし(それぞれ n=3)、PKD 欠損胸腺細胞の刺激ありなし(それぞれ n=3、n=1)の計 10 サンプル間で、リン酸化ペプチドの大規模定量解析を行った。2D-DIGE と同じ分子が検出され、2D-DIGE の結果が確認されたと共に、2D-DIGE では検出されなかった新たな分子も認められた (図 3)。

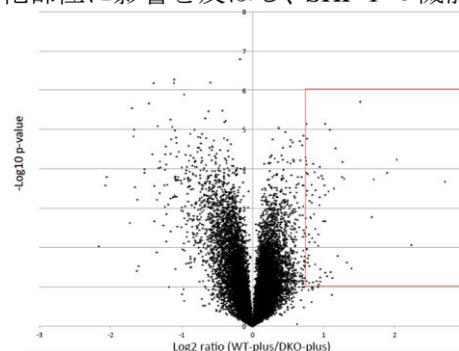


図 3 TMT10/TiO₂法による野生型および PKD 欠損胸腺細胞の大規模リン酸化定量解析
赤枠は PKD 欠損により有意に減少しているリン酸化ペプチド

【今後の展望】PRM 定量法により、実際に胸腺細胞においても SHP-1 は PKD の基質として働き、また、PKD が SHP-1 をリン酸化することで、SHP-1 の機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後、PKD によるリン酸化が起きない変異体 SHP-1 ノックインマウス由来細胞における SHP-1 の活性に寄与する部位のリン酸化状態を調べることで、PKD による SHP-1 のリン酸化が直接 SHP-1 の機能的リン酸化部位に影響を及ぼしているか否かを明らかにできると考えられる。これまでに我々は T 細胞特異的 PKD 欠損マウスにおいて胸腺細胞分化異常が起こることを見出している。PKD 欠損細胞および変異体 SHP-1 ノックインマウス細胞を用いて PKD による SHP-1 の機能制御機構を明らかにすることで、分化異常の原因を明らかにできることが期待される。

また、TMT10/TiO₂法により、2D-DIGE では検出されなかった、新たな胸腺細胞における PKD の基質・下流候補分子が検出されてきた。胸腺細胞における PKD 基質が SHP-1 のみであることは考えにくく、新たに検出された分子の検証を進め、胸腺細胞における PKD 下流リン酸化ネットワークを明らかにすることで、複雑で緻密な胸腺細胞選択メカニズムの解明に繋げたい。