

研究題目

リン酸化プロテオミクスと定量プロテオミクスを用いた NKT 細胞分化の分子機構解明

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 細胞の亜種であり、iNKT 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。これまでの研究から PKD が iNKT 細胞の分化、活性化に寄与することが強く示唆された。また、昨年度までの共同研究において、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により同定された基質候補タンパク質が PKD の直接の基質となることが明らかとなった。

本共同研究では、これまでに同定した基質分子の一つである転写因子のリン酸化部位が、実際に生体内の iNKT 細胞において PKD 依存的にリン酸化されているか否かを明らかにすることを試みた。また、iNKT 細胞分化における PKD 基質リン酸化の機能的役割を明らかにするため、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の同定を目指した。

[1-2]研究の方法・経過

PRM (parallel reaction monitoring) 法を用いたターゲット質量分析によるリン酸化部位の精密定量により、基質分子のリン酸化部位が、実際に生体内の iNKT 細胞においてリン酸化されているかを明らかにすることを試みた。まず、リン酸化ペプチドの事前情報を得るため、内在性の PKD を CRISPR-Cas9 によりノックアウトした HEK 細胞に PKD と基質を共に強制発現させた細胞を準備した。この細胞を用いた質量分

析により、以前 TMT 法を用いた大規模定量リン酸化プロテオーム解析によって同定されたリン酸化ペプチドの検出を試みた。ところが、複数の消化酵素を試し、Fe-IMAC によるリン酸化ペプチドの濃縮も行なったものの、検出することが出来なかった。

並行して、BioID (近位依存性ビオチン標識) 法を用い、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の同定を試みた。まず、恒常的なビオチン存在下におけるビオチン化タンパク質の質量分析を行い、基質分子自身を含めて確かにビオチン化が起きていることを確認した。さらに、PKD によるリン酸化に伴い増加する相互作用分子もいくつか同定され、その中で基質分子と協同して働く可能性のある分子を見出したため、*in vitro* における検証を行った。同様に BioID 法を用いて、PKD の相互作用分子の同定を試みている。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

TMT 法を用いた大規模定量リン酸化プロテオーム解析で同定された PKD 基質のリン酸化が、HEK 細胞の強制発現株を用いても PRM によるターゲット質量分析では同定できなかった。これは、TMT 法ではタグ標識により当該リン酸化ペプチドの分子量と疎水性が増加し、短いリン酸化ペプチドでも検出されやすくなるため検出できたが、タグ無しでは検出が難しかったものと考えられる。

BioID 法による PKD 基質分子の相互作用分子の探索では、基質とは異なる転写因子のビオチン化が刺激に伴い有意に増加することが明

らかとなった。この転写因子のビオチン化ペプチドは、PRM を用いた精密定量でも有意に増加が見られた。この結果から、基質分子は当該転写因子と相互作用し、協同して iNKT 細胞の分化に重要な遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。実際、レポーターアッセイにより、この仮説を支持する結果が得られている。

また、この BioID 法を用いた解析では刺激に伴い PKD のビオチン化が増加しており (図 1)、当該分子が PKD の基質であることを強くサポートする結果となった。反対に BioID 融合 PKD を発現させた細胞の解析でも、当該基質分子のビオチン化が有意に検出された。

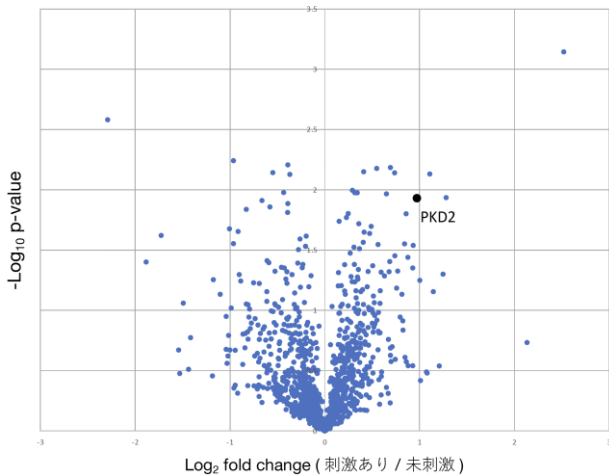


図 1 BioID 法による PKD 基質分子の相互作用分子の探索

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

iNKT 細胞の分化は通常の T 細胞同様に胸腺で起きるが、その選択過程は異なり、セレクションリガンドや、分化を制御する転写因子の発現に至るシグナル経路の詳細など、未だ不明な点が多い。iNKT 細胞が消失する PKD 欠損マウスの発見を基に、今回我々は PKD の基質となる転写因子およびその相互作用分子を同定した。*in vitro* の実験から、これらの転写因子は、iNKT 細胞の分化を司る転写因子の発現を制御する可能性が示唆され、iNKT 細胞分化における PKD の役割が明らかになりつつある。つまり、これまで未知であった iNKT 細胞分化の分子機構を明らかにしつつあると考えている。

本共同研究で用いた BioID 法では、これまで報告されていた、あるいは我々が別の手法で明らかにしてきた基質と PKD の相互作用が実際に検出され、相互作用分子を探索する強力なツールとなることを実感した。今後さまざまな形で研究への応用が期待される。

【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

1) 石川絵里、山崎晶

セリンスレオニンキナーゼ PKD による iNKT 細胞分化制御機構の解析

第 30 回 Kyoto T Cell Conference

オンライン開催

令和 3 年 10 月 8 日～9 日

2) ISHIKAWA Eri, YAMASAKI Sho

Deciphering molecular link between kinases and transcription factors during iNKT cell development

第 50 回 日本免疫学会総会・学術集会

奈良春日野国際フォーラム 薨

ハイブリッド開催

令和 3 年 12 月 8 日～10 日

[3-3] 成果資料等

なし

【4】 今後の課題等

本共同研究で明らかとなった PKD の基質とその相互作用分子が、生体内で実際に iNKT 細胞の分化を制御しているか否かを検証することは重要な課題である。現在、基質である転写因子のゲノム上の結合配列を欠損させたマウスの作製を進め、iNKT 細胞分化への影響を明らかにしたいと考えている。

本共同研究で用いた BioID 法では、これまで用いた手法では同定できなかった PKD の基質を新たに同定できる可能性がある。このため、BioID 融合 PKD の安定発現細胞株の作成を試みている。