課題番号　０５Ｂ－２１

研究題目　リンパ球におけるTRPチャネルを介したリン酸化制御機構の解析

研究組織

研究代表者：大洞将嗣（順天堂大学医学部）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

本研究の目的は、リン酸化プロテオームによってTRPM7で制御されるシグナル伝達分子や経路を同定し、TRPM7によるT細胞活性化の制御機構を解明することである。

細菌などの病原体などから身体を防御する免疫系において、T細胞は中心的な役割を果たす。T細胞の正常な分化や機能のために、T細胞はイオンチャネルやトランスポーターを介して細胞外からカルシウム(Ca)やマグネシウム(Mg)等のイオンを取込み、それらを様々な分子の活性化状態の制御に利用する。イオンチャネルなどの機能異常によってイオンの流出入制御が破綻した場合、免疫不全症や神経疾患を含む様々な疾患を惹起する。したがって、T細胞におけるイオンチャネルなどを介した物質輸送とその後の分子機序を理解することは、免疫システムによる生体防御や炎症制御を理解する上で重要である。

Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7)は、Ca、Mg、亜鉛などを透過する非選択的陽イオンチャネルであり、免疫細胞で機能していることが報告されている（Jin J., et al. Science 2008、Romagnani A., et al. Nat Commun.2017など）。申請者は、TRPM7が末梢$CD8^+$T細胞の活性化と細胞傷害性T細胞(CTL)への分化に必須であることを見出した。しかし、この分子機序は不明である。$CD8^+$T細胞は炎症性サイトカインを産生することで、肥満や老化など慢性炎症を伴う疾患の増悪に関与することが報告されている。したがって、TRPM7による$CD8^+$T細胞の活性化制御機構の解明は、慢性炎症を伴う疾患の制御方法の開発に繋がる可能性が高い。本共同研究では、分子のリン酸化の観点から解析し、T細胞において TRPM7 が関与するシグナル伝達制御機構を明らかにすることを目指した。

[1-2]研究の方法・経過

コントロールマウスと *Trpm7*$^{fl/fl}$ x *Cd4*-Cre マウスの末梢$CD8^+$T細胞をマイクロ磁気ビーズとセルソーティングによって単離し、抗 CD3 抗体と抗CD28抗体でT細胞に結合させた後、抗ハムスターIgG 抗体でこれらを架橋することによってT細胞受容体（TCR）を刺激した。それぞれの$CD8^+$T細胞について、無刺激、刺激後のサンプルを作成し、所属研究室において刺激時間の条件検討を行った後、先端酵素学研究所にてリン酸化プロテオーム解析を実施した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

(1) $CD8^+$T細胞をTCR刺激し、経時解析を行った結果、刺激後６時間後まではコントロール、TRPM7欠損細胞ともに異常は認めなかった。しかし、刺激後１２時間経過後に、TRPM7欠損細胞が細胞死を始め、２４時間後にはほとんど細胞死となることを認めた。この結果から、リン酸化プロテオーム解析のサンプルは刺激後早期（１５分）と後期（９時間）とすることにした。また、本実験で得られたサンプルをウエスタンブロットで解析した結果、TRPM7の欠損によってmTORシグナルの活性化が刺激後早期では正常である一方、刺激後後期では減少することが明らかとなった。

(2) 刺激後後期で表現型が認められたため、ま

ず刺激９時間後のサンプルでリン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、T細胞の増殖や活性化を正に制御することが報告されているアダプター分子や転写因子などのリン酸化がTRPM7欠損によって亢進していた。さらに、所属大学で実施したプロテオーム解析の結果、特にアダプター分子は、TRPM7欠損するT前駆細胞のDN3a細胞（$CD4^{-}CD8^{-}CD44^{-}CD25^{+}CD28^{-}$）において発現が著減することを見出した。

(3) アダプター分子と結合することが報告されている分子も同時に候補分子として同定した。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

同定した分子に関して、リン酸化そのものが報告されていない、あるいは報告されていないリン酸化部位で有った。特にアダプター分子とその結合分子は腸炎や神経炎症など炎症性疾患に関与すること、ヒトでも潰瘍性大腸炎の感受性に関与する遺伝子座にあることが報告されている。したがって今後、これらのリン酸化の意義を解明することでT細胞の活性化メカニズムの新たな知見を得られるだけでなく、炎症性疾患に対する新治療法の開発に発展することが期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

大洞将嗣. カルシウム流入を介した免疫調節機構とその異常による疾患. 第 96 回日本生化学会 シンポジウム, 2023 年 10 月 30 日-11 月 2 日, 福岡

[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