

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860365

研究課題名(和文) CD4+T細胞への分化に必須なキナーゼの発見に基づく新規運命決定機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of novel mechanisms of lineage commitment to CD4+/CD8+ thymocytes based on identification of a kinase that is critical for CD4+T cell development

研究代表者

石川 絵里 (ISHIKAWA, ERI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：20546478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は近年、未熟T細胞において抗原刺激に伴い強くリン酸化されるセリンスレオニンキナーゼPKDを見出し、T細胞特異的PKD欠損マウスを作製したところ、CD4+T細胞が特異的に消失していることを発見した。当該マウスを用いてPKDの基質を探索することで、未だ明らかとなっていないCD4+/CD8+T細胞への運命決定の分子メカニズムの解明を目指した。PKD欠損細胞では、TCRシグナルが減弱しており、CD8+に比べCD4+T細胞への分化がより影響を受けていた。また、未熟T細胞におけるPKDの基質分子を数種類同定し、そのうち1種類の分子のPKDによるリン酸化がT細胞分化に寄与することを示唆する結果を得た。

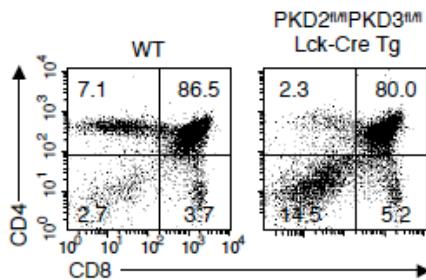
研究成果の概要(英文)：We have found that PKD is phosphorylated upon stimulation with peptides in preselection DP thymocytes. We then established T cell-specific PKD deficient mice and found that CD4+ single positive thymocytes were specifically decreased in the mice. From the finding, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of lineage commitment into CD4+/CD8+ thymocytes by the analysis of the mice. In PKD-deficient mice, TCR signal was attenuated and CD4+ T cell development was more affected than CD8+ T cell. We identified some TCR stimulation-dependent substrates of PKD by proteomic analysis. Phosphorylation of one of these substrates has been revealed to contribute to thymocyte development.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞分化 シグナル伝達 セリンスレオニンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

未熟 T 細胞は T 細胞受容体 (TCR) とリガンドである MHC+抗原複合体との親和性を感知し、生存して CD4⁺あるいは CD8⁺T 細胞へ分化する (正の選択を受ける) か、死に至る (負の選択により除かれる) かが決定されるが、抗原の質を多様な応答に変換する分子機構の詳細は未だに不明である。我々は近年、未熟 T 細胞において抗原刺激に伴い強くリン酸化されるセリン/スレオニンキナーゼ、PKD を見出した。PKD には PKD1、PKD2、PKD3 の 3 つのよく似たアイソフォームが知られており、これまで T 細胞には PKD1 が発現していると考えられてきた (Matthews, et al. *J. Exp. Med.* 2000)。ところが近年の詳細な解析により、実は T 細胞には PKD1 は全く発現しておらず、むしろ PKD2 と PKD3 の 2 種類のみが発現していることが判明した (Irie, et al. *Int. Immunol.* 2006)。そこで我々は、PKD を全く発現しない T 細胞を作製することを目的とし、T 細胞特異的に PKD2/PKD3 を二重欠損するマウスの樹立を試みた。得られた Lck-Cre Tg x PKD2^{flx/flx} x PKD3^{flx/flx} マウスの胸腺細胞では、予期しないことに CD4⁺T 細胞が特異的に消失していることを見出した (図 1)。



(図 1) 胸腺における各細胞群の割合

2. 研究の目的

PKD 欠損により CD4⁺T 細胞のみが特異的に消失するという現象は、これまで報告のない独自の知見であり、当該マウスを用いて PKD の基質を探索することで、未だ明らかとなっていない CD4⁺/CD8⁺T 細胞への運命決定の分子メカニズムを解明できるのではないかと考え、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

樹立した T 細胞特異的 PKD 欠損マウスで CD4⁺T 細胞が著しく減少している原因を明らかにするため、正の選択、commitment、あるいは生存が障害されているか否か、想定し得る全ての可能性を検証した。また、PKD のキナーゼ活性が CD4⁺T 細胞分化に必須であるか否か、キナーゼ欠損変異体を用いて検証を行った。

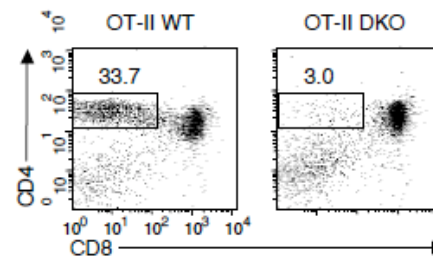
次に、野生型と PKD 欠損胸腺細胞の TCR 下流シグナル分子のリン酸化を比較することにより、T 細胞における PKD の基質候補分子の探索を行った。また、PKD 欠損マウスに One-StrEP-tag (強親和性 Tag)-PKD2 Tg マウス

を交配することで PKD を再構築したマウスを樹立し、Tag を用いて高純度に PKD 結合タンパク質を回収することにより、基質および上流/下流シグナル候補分子を探索した。プロテオミクス解析により挙げた候補分子のキナーゼアッセイにより、いくつかの基質分子を同定できたため、基質のリン酸化不能変異体を胸腺細胞株に導入し、分化における影響を検討した。

4. 研究成果

(1) PKD 欠損 T 細胞では、TCR シグナルが減弱している

当該マウスの詳細な解析を行ったところ、PKD 欠損 CD4⁺T 細胞は野生型に比べ生存率が低いことが明らかとなったが、生存シグナルを補っても CD4⁺T 細胞への分化を回復できなかったことから、CD4⁺細胞の消失は、単に細胞の生存率が低いことだけが原因ではないと考えられた。また、TCR Tg マウスと交配し TCR を 1 種類に固定することで、CD4⁺T 細胞あるいは CD8⁺T 細胞への正の選択における影響を調べたところ、CD4⁺T 細胞への正の選択が著しく障害されていることが明らかとなった (図 2)。また、CD4⁺T 細胞への commitment も障害されていた。さらに、TCR シグナルの総和と考えられる CD5 の発現上昇も PKD 欠損 CD4⁺T 細胞で著しく低下していた。これらの結果から、PKD 欠損 T 細胞では、TCR シグナルが減弱しており、CD8⁺T 細胞に比べ、CD4⁺T 細胞がより影響を受けていると考えられた。



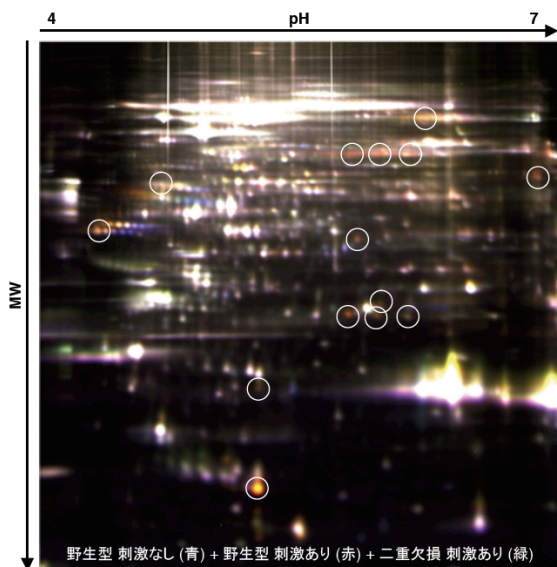
(図 2) PKD 欠損 T 細胞では CD4⁺T 細胞への正の選択が著しく障害される

(2) 胸腺細胞における PKD の基質同定

次に、*in vitro* T 細胞分化系を用いることにより、PKD がアダプターとして働いているのではなく、そのキナーゼ活性が CD4⁺T 細胞生成に必要であることが確認できたため、TCR シグナル下流における PKD の基質探索を行った。TCR 下流の MAPK、NF-κB のリン酸化およびカルシウム流入には野生型と PKD 欠損胸腺細胞で明らかな違いが認められなかった。そこで、TCR 刺激によりリン酸化が誘導され、PKD 欠損胸腺細胞でリン酸化が減弱する分子を、蛍光標識二次元ゲルディファレンス電気泳動 (2D-DIGE) とマスマスペクトル解析により調べたところ、10 種類の分子が同定され、そのなかにはアダプター分子やフォスファターゼといった

シグナル伝達分子も5種類含まれていた(図3)。

これら PKD の基質および下流候補分子が PKD の直接の基質であるか否かを培養細胞における強発現系およびキナーゼアッセイにより検証したところ、T細胞シグナルに関与することが報告されている4種類の分子が PKD2、PKD3 により直接リン酸化される基質であることが判明した。また、変異体を作製することで、各分子の PKD によるリン酸化部位を同定した。

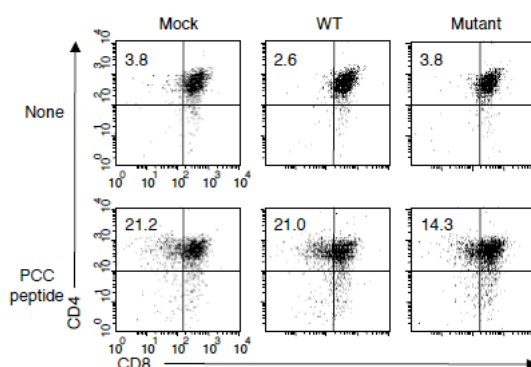


(図3) 胸腺細胞より精製したリン酸化タンパク質の 2D-DIGE ○=PKD 欠損によりリン酸化が减弱している分子 (赤色のスポット)

(3) 基質分子のリン酸化不能変異体導入により T 細胞分化が减弱する

抗原刺激により $CD4^+T$ 細胞への分化を誘導できる $CD4^+CD8^+$ ダブルポジティブ細胞株 DPK に基質分子のリン酸化不能変異体を導入したところ、4種類のうち1種類の分子の変異体を導入した細胞でのみ $CD4^+T$ 細胞への分化(図4)および $CD5$ の発現上昇に减弱傾向が見られた。このことから、PKD によるこの基質分子のリン酸化は、T細胞分化に寄与していることが示唆された。今回、基質の活性化型変異体を導入し、 $CD4^+T$ 細胞の分化障害を回復できるか否かの検討には至らなかった。

一方、昨年度までに PKD 結合分子探索のツールとして作製した One-STrEP-tag(強親和性 Tag)-PKD2 Tg マウスを PKD 二重欠損マウスと交配し、PKD2 を再構築したマウスでは、T細胞分化異常が回復することが確認できた。そこで、未熟 T細胞より Tag を用いて高純度に PKD を精製し、マスペクトル解析により PKD 結合分子の同定を試みたが、これまでのところ PKD 特異的な結合分子は得られていない。



(図4) 基質分子のリン酸化不能変異体導入により T 細胞分化が减弱する

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計4件)

① 石川絵里、齊藤隆、山崎晶
T細胞分化における PKD の基質及び下流分子の同定
第25回 Kyoto T Cell Conference
平成27年5月15日~16日
京都大学医学部芝蘭会館

② ISHIKAWA Eri, SAITO Takashi and YAMASAKI Sho
Identification of pro-IL-16 as a substrate of protein kinase D during T cell development
第43回 日本免疫学会総会・学術集会
平成26年12月10日~12日
京都国際会館

③ Eri ISHIKAWA, Hidetaka KOSAKO, Masatsugu OHORA, Tomoharu YASUDA, Tomohiro KUROSAKI, Takashi SAITO and Sho YAMASAKI
Search for downstream targets of Protein kinase D that is critical for T cell development
第42回 日本免疫学会総会・学術集会
平成25年12月11日~13日
幕張メッセ (千葉)

④ Eri Ishikawa, Takashi Saito and Sho Yamasaki
Protein kinase D is a critical component for T cell development
The 6th international workshop of Kyoto T Cell Conference
平成25年6月3日~7日
京都大学医学部芝蘭会館

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
研究室ホームページ
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/molimm/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 絵里 (ISHIKAWA ERI)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：20546478

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：