

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08841

研究課題名(和文) CD4+T細胞分化における新規TCR-PKD-SHP-1 axisの役割

研究課題名(英文) The role of novel TCR-PKD-SHP-1 axis in CD4+ T cell development

研究代表者

石川 絵里 (Ishikawa, Eri)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20546478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞特異的プロテインキナーゼD (PKD)欠損マウスにおけるCD4+T細胞の消失、新規基質SHP-1の同定という独自の知見に基づき、CD4+T細胞分化におけるTCR-PKD-SHP-1 axisの役割を明らかにするためリン酸化不能型変異体SHP-1 KIマウスを作製、解析した。結果、PKDによるリン酸化がCD4+T細胞分化に寄与することが明らかとなった。SHP-1の欠損によりPKD欠損によるTCRシグナル低下が部分的に回復すること、リン酸化依存的なSHP-1の局在や酵素活性の変化は認められなかったことから、他のメカニズムを介してPKDはSHP-1の機能を制御していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞は胸腺でTCRによりMHC-自己抗原ペプチド複合体を認識することで様々な選択を受けて分化するが、親和性の違いを細胞運命決定につなげる分子機構は、現在免疫学に残された重要な課題の1つである。TCR下流のチロシンキナーゼを介したチロシンリン酸化によるシグナル調節機構はよく知られているが、セリン/スレオニンリン酸化の役割に関しては未だ不明な点が多い。本研究で得られた結果は、T細胞分化においてTCR-PKD-SHP-1 axisが存在し、TCR下流でセリン/スレオニンキナーゼがチロシンフォスファターゼを制御するという新たな経路の重要性を強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that serine/threonine kinase, protein kinase D (PKD) plays a crucial role in CD4+ T cell development by generating T cell-specific PKD deficient mice and found tyrosine phosphatase SHP-1 as a substrate of PKD in thymocytes. We generated phosphorylation-defective mutant SHP-1 knock-in mice (KI) to reveal the contribution of TCR-PKD-SHP-1 axis in CD4+ T cell development. Indeed, phosphorylation of SHP-1 was not observed in thymocytes from KI mice. In competitive bone marrow (BM) chimera mice of WT and KI BM, generation of CD4+ T cells from KI cells was impaired, indicating that phosphorylation of SHP-1 by PKD is critical for CD4+ T cell development. Phosphatase activity and localization of SHP-1 was not affected by the mutation. We also analyzed PKD and SHP-1 multiple knockout mice and revealed that impaired TCR signaling by PKD deficiency was slightly restored in these mice, suggesting that PKD regulates the function of SHP-1 through unknown mechanisms.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞分化 セリンスレオニンキナーゼ チロシンフォスファターゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は以前、胸腺未熟 T 細胞を抗原刺激した際に、セリン/スレオニンキナーゼ protein kinase D (PKD) のセリンリン酸化が強く誘導され活性化することを見出し、PKD が T 細胞分化において重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで、T 細胞で発現する PKD2/PKD3 の T 細胞特異的二重欠損マウスを作製し、「PKD 欠損 T 細胞」を有するマウスを初めて樹立した。当該マウスの胸腺を解析したところ、CD4<sup>+</sup>T 細胞が著しく減少していることが判明した。この現象の分子機構を解明するため、未熟 T 細胞における PKD の基質候補分子を探索した結果、4 種類の新規基質が同定された。このうちチロシンフォスファターゼ SHP-1 は様々な親和性の抗原ペプチドを用いた刺激により PKD 依存的なリン酸化が見られたことから、正の選択における機能的な基質候補分子として SHP-1 に注目した。さらに、特異的なリン酸化部位として、SHP-1 の C 末端に位置する Ser557 を同定した。

### 2. 研究の目的

以上の実験結果から、TCR 下流でセリン/スレオニンキナーゼがチロシンフォスファターゼを制御する新たな経路が T 細胞分化に重要であることが示唆された。この知見に基づき、CD4<sup>+</sup>T 細胞分化における新規 TCR-PKD-SHP-1 axis の役割を明らかにすることを目的とした。また、CD4/CD8 lineage 決定における転写因子以外の機能分子については未だ不明な点が多いが、PKD2/PKD3 二重欠損マウスでは、CD8<sup>+</sup>T 細胞に比べ CD4<sup>+</sup>T 細胞が著しく減少しており、正の選択直後の細胞における ThPOK の発現低下も見られた。このメカニズムを明らかにできれば、これまでほとんど分かっていない ThPOK 発現に至る分子機構、ひいては CD4/CD8 lineage 決定に寄与する新たな分子メカニズムを明らかにできる可能性があると考えた。

### 3. 研究の方法

(1) PKD による SHP-1 のリン酸化が CD4<sup>+</sup>T 細胞分化に寄与しているか否かを、SHP-1 のリン酸化不能型変異体 (SHP-1.S557A) の未熟胸腺細胞株への導入とノックインマウス作製により検証した。

(2) PKD による SHP-1 のリン酸化の意義を明らかにするため、野生型と変異体 SHP-1 を用いて、PKD によるリン酸化が SHP-1 の局在および酵素活性に与える影響を調べた。また、GSH ピーズにコートした GST-SHP-1 を *in vitro* にて PKD によりリン酸化し、胸腺未熟 T 細胞の細胞抽出液を加え、プルダウンアッセイにより SHP-1 に結合するタンパク質の同定を試みた。同様に SHP-1 の非リン酸化ペプチドとリン酸化ペプチドをセファロースビーズに固相化し、細胞抽出液を加え、リン酸化依存的な結合分子の同定を試みた。

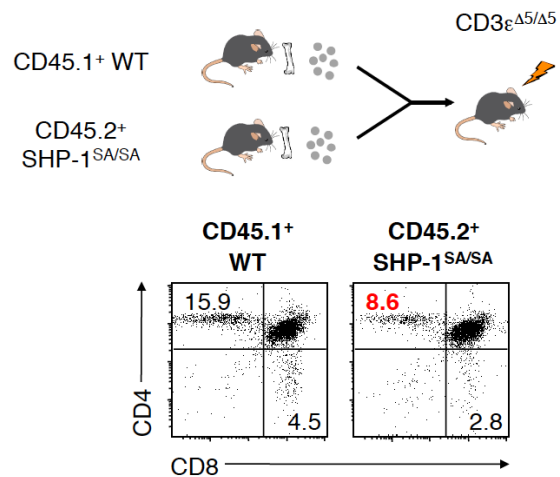
(3) PKD-SHP-1 axis が CD4 lineage 決定に寄与するか否かを明らかにするため、上記ノックインマウス胸腺の正の選択を受けた直後の細胞における ThPOK の発現を調べた。

(4) PKD 下流における基質としての SHP-1 の重要性を検証するため、PKD 欠損マウスと SHP-1 欠損マウスあるいは SHP-1.S557A ノックインマウスを交配し、解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) SHP-1 のリン酸化不能型変異体を導入した細胞では、CD4<sup>+</sup>T 細胞への分化が減弱する

SHP-1 の PKD によるリン酸化部位を変異させたリン酸化不能型変異体 (SHP-1.S557A) を未熟胸腺細胞株 DPK へ導入すると CD4<sup>+</sup>T 細胞への分化が障害された。さらに、SHP-1.S557A ノックインマウスを樹立し、解析を行った。樹立したマウスの胸腺未熟 T 細胞では、PKD 欠損マウスの細胞と同様に SHP-1 のリン酸化が認められないことを確認した。野生型マウス由来骨髓細胞とノックインマウス由来骨髓細胞を混合して移入した骨髓キメラマウスを作製し、競合下で未熟 T 細胞の分化能を比較したところ、ノックインマウス由来細胞では CD4<sup>+</sup>T 細胞への分化が減弱していた (図 1)。



(図 1) 競合的骨髓キメラマウスにおいて変異体 SHP-1 由来細胞の CD4<sup>+</sup>T 細胞分化は野生型に比べ減弱する

(2) SHP-1 のリン酸化依存的な局在およびフォスファターゼ活性の変化は認められない

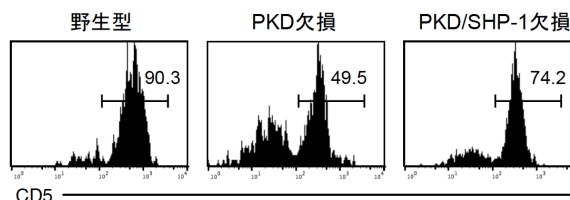
野生型と SHP-1.S557A ノックインマウスの胸腺未熟 T 細胞を TCR 刺激し、細胞質と細胞膜における局在をウェスタンブロットにより解析したところ、違いは認められなかった。また、野生型とリン酸化不能型変異体 SHP-1 を活性化 PKD と混合した後、*in vitro* フォスファターゼアッセイにより酵素活性を比較したが、違いは見られなかった。さらに、非リン酸化、およびリン酸化 SHP-1 に特異的な結合分子の同定を試みたが、これまでのところ目的とする分子は検出されていない。

### (3) PKD による SHP-1 のリン酸化は ThPOK 発現には寄与しない

変異体 SHP-1 ノックインマウスの正の選択を受けた直後の胸腺未熟 T 細胞における CD4 lineage 決定のマスター転写因子 ThPOK の発現は、野生型マウスと遜色なかった。

### (4) PKD 欠損による TCR シグナル減弱が SHP-1 欠損により部分的に回復する

PKD と SHP-1 の多重欠損マウスの解析を行ったところ、SHP-1 を無くすことで PKD 欠損による CD4<sup>+</sup>T 細胞分化障害が正常に戻ることはなかった。しかし、PKD 欠損マウスでは胸腺選択直後の未熟 T 細胞の CD5 の発現が野生型マウスに比べて低下するが、多重欠損マウスではこの CD5 の発現低下が部分的に回復していた(図2)。さらに、PKD 欠損マウスと SHP-1.S557A ノックインマウスを交配し解析を行ったが、PKD 欠損マウスで見られる分化障害ならびに CD5 の発現低下の回復は認められなかった。



(図2) 胸腺選択を受けた直後の未熟T細胞において、PKD欠損マウスで見られるCD5の発現低下がSHP-1との多重欠損により部分的に回復する

本研究では、PKD によるリン酸化を受けない変異体 SHP-1 ノックインマウスの解析結果から、*in vivo* において PKD による SHP-1 のリン酸化が CD4<sup>+</sup>T 細胞分化に寄与していることが示された。つまり、セリン/スレオニンキナーゼによるチロシンフォスファターゼの制御という新たな経路の T 細胞分化における重要性が示唆された。このノックインマウスにおける ThPOK の発現は野生型マウスと遜色なく、TCR-PKD-SHP-1 axis は ThPOK 発現誘導には関係しないと考えられた。また、PKD 欠損マウスにさらに SHP-1 を欠損させると、TCR シグナルの低下が部分的に回復したこと、リン酸化依存的な SHP-1 の局在やフォスファターゼ活性の変化は認められなかったことから、PKD によるリン酸化は未知のメカニズムを介して SHP-1 の機能を制御していると考えられる。今後このメカニズムを解明するため更なる研究が必要である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

石川絵里、山崎晶、プロテインキナーゼ D (PKD) の未熟 T 細胞物価における役割、化学と生物、査読有、56 巻、2018、pp.308-309

石川絵里、山崎晶、プロテインキナーゼ D による未熟 T 細胞の分化制御、生化学、査読無、89 巻、2017、pp.748-751

Ishikawa, E., Kosako, H., Yasuda, T., Ohmuraya, M., Araki, K., Kurosaki, T., Saito, T. and Yamasaki, S. Protein kinase D regulates positive selection of CD4<sup>+</sup> thymocytes through phosphorylation of SHP-1. *Nat. Commun.*, 査読有, 7:12756, 2016, DOI: 10.1038/ncomms12756

### 〔学会発表〕(計5件)

ISHIKAWA Eri and YAMASAKI Sho, Pivotal role of protein kinase D in innate-like T cells development, 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018 年

ISHIKAWA Eri and YAMASAKI Sho, A critical role of protein kinase D in NKT cell development, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017 年

Eri Ishikawa, Hedetaka Kosako, Takashi Saito and Sho Yamasaki, Protein kinase D regulates positive selection of CD4<sup>+</sup> thymocytes through phosphorylation of SHP-1, 7<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T cell Conference, 2017 年

ISHIKAWA Eri, SAITO Takashi and YAMASAKI Sho, Serine phosphorylation of SHP-1 by protein kinase D promotes CD4<sup>+</sup> thymocyte development, 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016 年

Eri Ishikawa, Hedetaka Kosako, Tomoharu Yasuda, Tomohiro Kurosaki, Takashi Saito and Sho Yamasaki, Critical role of protein kinase D in thymocyte positive selection. 16<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2016 年

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

上記記載の 2016 年 *Nat. Commun.* に発表した論文のプレスリリースに伴い、以下の報道機関による報道があった。  
読売新聞（福岡版）、日経電子版

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8 桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。