

論文の内容の要旨

論文題名 Lnk ファミリー細胞内アダプター蛋白質 APS の単離と生理学的機能の解析

指導教官 高津 聖志 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 井関 將典

【序】

細胞表面の受容体にリガンドが結合することにより様々なシグナル伝達経路が活性化され、その結果として細胞の増殖、分化、細胞死などが引き起こされる。このシグナル伝達経路にアダプター蛋白質と呼ばれる、分子内に酵素活性を持たない分子群が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

アダプター蛋白質のシグナル伝達経路における役割は、最初成長因子受容体からのシグナルの研究によって証明された。免疫担当細胞における抗原受容体からのシグナル伝達においても、LAT、SLP-76、BLNK 等のアダプター蛋白質が生体の免疫機能の発揮に必須な分子であることが遺伝子導入細胞株、遺伝子欠損マウスを用いた研究により明らかにされてきた。その他にも抗原受容体やサイトカイン受容体からのシグナルの活性化や抑制に関わるアダプター蛋白質が数多く単離、解析されており、免疫系のシグナル制御機構の複雑さが推測できる。既知のアダプター蛋白質の詳細な機能解析を進めるのみならず、新たなアダプター蛋白質を同定し、機能を調べることによって細胞内シグナル伝達機構の更なる解明に貢献できると考えられる。

細胞内アダプター蛋白質の一つである Lnk の遺伝子欠損マウスは骨髄および脾臓にて B 細胞の過剰産生が観察される。このことから Lnk は B 前駆細胞の増殖分化を負に制御していることが示唆される。Lnk は FcεRIγ鎖の ITAM モチーフに結合する SH2-B という分子と相同性を持ちファミリーを形成すると考えられるが、これらの蛋白質群の詳細な機能については未だ明らかではない。私はこれらのアダプター蛋白質群の

機能を検討するため、Lnk、SH2-B と相同性を持つ新しい分子の探索、単離を試みた。

【方法と結果】

(1) マウス APS 遺伝子の単離

Lnk、SH2-B 相同分子を同定する第一歩として、両者の間で保存されているアミノ酸配列を用いて EST データベースを検索したところ、高い相同性を持つ cDNA がヒト胚中心 B 細胞に発現していることが分かった。この配列を元にオリゴマーを合成し PCR によりマウス脾臓から cDNA 断片を増幅した。得られた cDNA 断片をプローブとして脾臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、cDNA クローンを単離し、その塩基配列を決定した。その結果、この cDNA は 621 アミノ酸に相当する読み枠を含んでおり、新規の分子をコードしていると考えられた。この配列を用いたデータベース検索の結果、この新規分子は c-kit に結合する分子として単離されたヒト APS と高い相同性を示し、マウス相同蛋白質であることが分かった。マウス APS は、ヒト APS とアミノ酸レベルで 82% 同一で、N 末端にプロリンに富む領域、PH ドメイン、C 末端側に SH2 ドメインとリン酸化を受ける可能性があるチロシン残基を持っていた。

(2) マウス APS mRNA の発現解析

マウスの各組織の RNA を用いたノザンプロット解析の結果、APS の mRNA は脳、脾臓、筋肉で比較的強く発現しており、胸腺では発現していなかった。脾臓の T 細胞、B 細胞を精製し RT-PCR 法により検討したところ、T 細胞では APS の発現はみられず B 細胞で発現していることが分かった。また、細胞株の RNA を用いたノザンプロットの結果、成熟 B 細胞株に強く発現していることが明らかになった。

また、cDNA クローニングの際に SH2 ドメインの 3' 側に欠失変異を持つクローンと持たないクローンが単離されたが、RT-PCR の結果、変異を持つ転写産物は生体内では主要なものではないということが分かった。

(3) マウス APS 遺伝子の構造と染色体上の位置の決定

マウス APS cDNA をプローブとしてゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングし、得られたクローンから遺伝子の制限酵素地図を作製すると共に、サザンプロット、PCR、塩基配列決定等により、エクソンの位置を決定した。その結果マウス APS 遺伝子は蛋白質をコードする 8 つのエクソンからなることが明らかとなった。また、データベース検索の結果よりマウス APS 遺伝子は第 5 染色体に位置することが推察された。

(4) マウス APS のチロシンリン酸化と細胞の増殖応答

COS7 細胞にチロシンキナーゼと共に APS cDNA を過剰発現させる系を確立し、APS のチロシンリン酸化を調べた。その結果、マウス APS は B 細胞に発現している様々なチロシンキナーゼや c-kit によってチロ

シンリン酸化を受けることが分かった。また Y16 細胞、MC9 細胞に過剰発現させた系を用いて IL-5、IL-3、SCF の刺激による APS のチロシンリン酸化を確認した。内因性のマウス APS を発現している B 細胞株 BAL17 細胞を用いた実験により、抗 IgM 抗体刺激によってもマウス APS はチロシンリン酸化を受けることが明らかとなった。マウス APS のチロシンリン酸化部位を含む C 末端を欠失した変異型マウス APS を導入した MC9 細胞においては IL-3、SCF の刺激によるマウス APS のチロシンリン酸化は検出できなかった。

また、これらの野生型、変異型のマウス APS を過剰発現させた細胞株を IL-5、IL-3、SCF で刺激しその増殖応答を測定したが、いずれの細胞も親株と比べて増殖応答に差は見られなかった。

(5) APS 遺伝子欠損マウスの作製

APS の生体内での生理学的機能を明らかにするため、APS 遺伝子を標的としたターゲティングベクターを作製し、ES 細胞に導入し常法に従って遺伝子欠損マウスを作製し、サザンブロットによって APS 遺伝子座の変異を確認した。作製したマウスについて、ウェスタンブロットにより APS の欠損を確認したところ、全く予想外であったが、APS^{-/-}マウスでも抗マウス APS 抗体で検出できる蛋白質が発現していた。野生型マウスで検出される APS の二本のバンドのうち、高分子量のバンドが APS^{-/-}マウスでは消失しており、低分子量のバンドは増強していた。このことから野生型マウスでは分子量の異なる二種類の APS 蛋白質が発現していることが初めて分かり、APS^{-/-}マウスでは高分子量の APS のみが欠損しており、低分子量の APS は依然発現が見られその量も増加していることが明らかとなった。

高分子量の APS の欠失の影響を調べるため、作製した APS^{-/-}マウスにおける、骨髄、脾臓、リンパ節等の免疫系細胞数や分布の変化をフローサイトメトリーにより解析すると共に、B 細胞を刺激した際の増殖応答、抗原に対する免疫反応等を測定した。しかし調べた範囲内では野生型マウスと APS^{-/-}マウスの間で差は見出せなかった。そこで高分子量の APS 欠損の表現型が Lnk 遺伝子欠損によって明らかになる可能性を考え、APS^{-/-}マウスを Lnk 遺伝子欠損マウスと交配させ、二重遺伝子欠損マウス (APS/Lnk^{-/-}) を作製して解析した。調べた範囲内で、APS/Lnk^{-/-}マウスの表現型は Lnk 欠損マウスの表現型とほとんど違いが見られず、APS 遺伝子欠損による表現型は見出せなかった。

高分子量の APS のみの欠損では表現型が見られなかったことから、APS の機能を明らかにするためにはやはり APS を完全に欠損させたマウスの作製が必須であると考えられる。今後、APS 遺伝子欠損マウスを作製し、表現型を解析することにより APS の生理学的機能を明らかにしていく。

【考察】

本研究において、私は細胞内アダプター蛋白質 Lnk、SH2-B と相同性を持つ新規分子をクローニングし

た。この分子はヒト APS と高い相同性を持っており、そのアミノ酸配列の類似性等から、単離した分子はマウス APS であると考えた。マウス APS は Lnk、SH2-B と同様に PH ドメイン、SH2 ドメインを持っており、また機能的に重要と考えられる領域のアミノ酸配列もよく保存されていることからこの APS、Lnk、SH2-B は新しいファミリーを形成すると考えている。各種組織や細胞群の発現パターンより、マウス APS は未熟 B 細胞よりも成熟 B 細胞で高く発現していると考えられ、また、成熟 B 細胞株 BAL17 細胞において抗 IgM 抗体刺激によってチロシンリン酸化を受けることから、B 細胞受容体からのシグナル伝達経路において何らかの役割をしていると考えられた。

C 末端欠失変異型 APS 遺伝子を導入した細胞を IL-3、SCF で刺激してもチロシンリン酸化が見られないことから、マウス APS のリン酸化を受けるチロシン残基は C 末端のチロシン 618 であることが示唆された。この C 末端のチロシン残基は Lnk、SH2-B でも保存されており、これらの分子の機能に大きく関わっていることが考えられる。一方、APS のファミリー分子である SH2-B には C 末端のチロシン残基が欠失したスプライシング変異型、SH2-B β が存在している。この変異型は成長ホルモン、IFN γ 、NGF 等のシグナル伝達系で正の制御因子として機能するという報告がなされており、このことから APS の C 末端のチロシンに依存しないシグナル伝達制御機構も考えられる。野生型、C 末端のチロシン残基欠失変異型 APS を株化細胞に過剰発現させてもサイトカイン刺激による増殖応答の変化は見られなかった。今後更に解析を進め、APS がどのような分子と会合しているのかを明らかにすることが APS の機能を解明する手がかりになることであろう。

APS の生体内での生理学的機能を解析するために遺伝子欠損マウスを作製したが、予想外なことに APS^{-/-}マウスでも低分子量の APS 蛋白質の発現が残っていた。今回作製した APS^{-/-}マウス及び、APS と Lnk の二重遺伝子欠損マウスのいずれも APS の機能を推測させる表現型は見られず、高分子量の APS 蛋白質のみの欠損では免疫系に影響を及ぼさないということが明らかになった。これらのことから APS の機能を明らかにするためには APS 分子を完全に欠損させたマウスの作製が必須であると考えられたため、APS 蛋白質を完全に欠損したマウスの作製を新たに行っている。

本研究で私は Lnk、SH2-B と相同性を有する分子、マウス APS を初めて同定し、これらの分子が新しい細胞内アダプター蛋白質ファミリーを形成することを示した。今後、APS 遺伝子欠損マウスを作製、解析することにより、APS の生体内での生理学的機能を明らかにしていきたいと考えている。