

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 井 関 將 典

本研究は Lnk、SH2-B からなる新しいアダプター蛋白質ファミリーである Lnk ファミリーの機能を明らかにするための方法の一つとして、Lnk、SH2-B のアミノ酸配列と相同性を持つ分子を検索することによりこのファミリーに属する新規分子の同定と機能解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

(1) Lnk と SH2-B 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、PCR、cDNA ライブラリーのスクリーニングによって、621 アミノ酸に相当する読み枠を含んだ新規 cDNA クローンを単離した。この分子は 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 APS 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 末端からプロリンに富む領域、PH ドメイン、SH2 ドメインとチロシンリン酸化部位を持っていた。ノザンプロット等の解析の結果、APS の mRNA は脳、脾臓、筋肉で比較的強く発現しており、胸腺では発現しておらず、また成熟 B 細胞株に強く発現していることが明らかになった。脾臓では 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 RT-PCR 法によって、cDNA クローニングの際に単離された欠失変異型は生体内では主要なものではないということを示した。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し、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。

(2) 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用い

て、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を示した。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 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 APS はチロシンリン酸化を受けることを示した。APS の C 末端を欠失した変異型 APS を導入した MC9 細胞においては IL-3、SCF の刺激による 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 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。

(3) 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、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。しかしウェスタンブロットを行ったところ、APS⁺マウスでも抗 APS 抗体で検出できる蛋白質が発現していた。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 APS の欠失の影響を調べるため、作製した APS⁺マウスの骨髓、脾臓等の細胞のフローサイトメトリーによる解析、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が、野生型マウスと APS⁺マウスの間で差は見出せなかった。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、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、高分子量 APS 欠損による表現型は見出せなかった。今後、完全な APS 遺伝子欠損マウスの作製、解析が期待される。

以上、本論文は Lnk、SH2-B と相同性を有する分子としてマウス APS を同定し、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、また APS が B 細胞でのシグナルに関与することを明らかにした。本研究は、未だ明らかにされていない Lnk ファミリーアダプター蛋白質を介したシグナル伝達系の解明に重要な貢献をもたらすと思われ、学位の授与に値するものと考えられる。