

審査の結果の要旨

氏名 河野 肇

本研究は、Fc 受容体の信号伝達の初期機構について、特に脂質ラフトとの関連から解析したものであり、下記の結果を得ている。

1) RAW264.7 マクロファージにおいて、低親和性 Fc γ 受容体(Fc γ R)、すなわち Fc γ RIIb および Fc γ RIIIa のリガンド結合鎖(α 鎖)は凝集をうけるとシヨ糖密度勾配遠心法にて分離した DIM へ移行した。また、共焦点顕微鏡における観察において、Fc γ R- α 鎖は凝集前では可溶化剤処理にて膜上から消失するが、凝集後は細胞膜上に可溶化剤不溶性集積巣を形成し、同部位には脂質ラフトマーカであるガングリオシド GM1 の共集積がみられた。シヨ糖密度勾配遠心上の DIM への移行は SrcPTK 活性抑止状態(SrcPTK 阻害剤 PP2 前処置、もしくは SrcPTK を負に制御する機能亢進型 C-terminal Src kinase (mCsk)の発現)でも保たれていた。更に、共焦点顕微鏡における観察において、mCsk 発現株においても Fc γ R 凝集による Fc γ R- α 鎖の可溶化剤不溶性集積巣を形成およびラフトの融合、共集積がみられた。次に、Fc γ R とラフトの会合がアクチン細胞骨格の再構成によるかを検討するために、F-アクチンを脱重合させる Latrunculin A の前処置を行った。Latrunculin A の前処置にては、近位チロシンリン酸化信号伝達は全く影響を受けず、Fc γ R は凝集依存性にラフトと会合した。これらの結果より、Fc γ R の凝集による Fc γ R のラフトとの会合および脂質ラフトの融合は細胞内信号伝達や細胞骨格再構成とは独立した事象であると判明した。

2) Fc γ R- α 鎖と、SrcPTK との共在を操作することによる信号伝達を検討した。コレステロール減少剤 methyl- β -cyclodextrin (M β CD)処理にては、凝集依存性の Fc γ R- α 鎖の DIM への移行は保たれていたが、Lyn が DIM から除かれ、Fc γ R 凝集は Lyn 活性化へつながらなくなった。これら Lyn の DIM からの離脱及び

信号伝達の阻害は可逆的であり、M β CD/コレステロール複合体によるコレステロール回復により部分的に回復がみられた。次に mCsk を強発現させ、内因性の SrcPTK 活性を抑制した後に、mCsk の影響を受けない常時活性型 SrcPTK を共発現させた系を用いての機能回復実験を行った。Lyn および c-Src の N 末端のパルミチン酸化部位のシステイン残基が、これら SrcPTK の DIM との会合および信号伝達の媒介に必要であった。しかし DIM に会合した Lyn が媒介し得る貪食をラフト会合型 c-Src は媒介できないことが判明した。これらの所見より、凝集による Fc γ R- α 鎖のラフト画分への移行および SrcPTK との共在が細胞内信号発生に重要であることを示した。

3) 単量体のマウス Fc γ RIIb、細胞質部分を欠失した分子(Fc γ RIIb-trunc)、欠失部分に γ 鎖の ITAM を結合したキメラ分子(Fc γ RIIb- γ ITAM)をラット好塩基性白血病細胞に異所性に発現させ、リガンド結合鎖がラフト融合に果たす役割について検討した。これらの分子は凝集を受けるといずれも同様にシヨ糖密度勾配遠心上 DIM 画分へ移行した。また、共焦点顕微鏡における観察においては、これら分子は同様に凝集により自身の可溶化剤不溶性の獲得のみならず、ガングリオシド GM1 の不溶性も上昇し、ラフト再構成が誘導されることが示された。Fc γ RIIb- γ ITAM 分子の凝集では細胞内カルシウム濃度上昇がみられ、Fc γ RIIb 分子ではみられなかった。意外なことに Fc γ RIIb-trunc 分子の凝集により、Fc γ RIIb- γ ITAM より弱いものの、細胞内カルシウム濃度上昇がみられた。この Fc γ RIIb-trunc 分子のカルシウム反応は SrcPTK 阻害剤 PP2、M β CD などにより阻害された。即ち SrcPTK 活性およびラフトの統合性に依存していることが明らかとなった。これらの結果から、リガンド結合鎖の凝集によりラフト融合が発生し、細胞内の生化学的な初期信号を導くと考えられた。

以上、本論文は、Fc γ 受容体の信号伝達の開始は脂質ラフト融合によることを明らかにした。本研究は Fc 受容体の信号伝達機構に新たな視点を与えたものであり、学位の授与に値すると考えられる。