

## 審査の結果の要旨

氏名 佐々木 純 子

赤血球と血小板を除く多くの血球系細胞とそれらの前駆細胞に発現している表面抗原の CD45 は、細胞膜を貫通するチロシンホスファターゼをコードしており、T 細胞の成熟や抗原受容体からのシグナル伝達に重要な役割を果している。CD45 のもつチロシンホスファターゼの基質としては、これまでに Src ファミリーに属するチロシンキナーゼ (Src PTK) が同定されており、Src PTK を活性化型または不活性化型に導く 2 カ所のチロシン残基を脱リン酸化して、その酵素活性を制御すると考えられている。しかしながら、サイトカインシグナルにおける CD45 の他の役割や、Src PTK 以外の基質については未同定である。「サイトカインシグナリングにおける CD45 の機能解析」と題する本論文においては、CD45 が Janus kinase (JAK) を直接脱リン酸化することによって、サイトカインシグナル伝達を負に調節することを見出し、この制御の生理的意義について検討を加え、CD45 の新たな機能およびサイトカインシグナリングにおける CD45 を介する負の制御機構を提唱している。

### 1. マスト細胞における JAK/STAT 経路の活性化は CD45 欠損で亢進する

本論文では、先ず CD45 の遺伝子破壊マウスの骨髄に由来するマスト細胞を利用して細胞レベルでのシグナル伝達を解析し、マスト細胞はサイトカインの IL-3 に依存して増殖するが、CD45 欠損マスト細胞は野生型の細胞よりその増殖が速いことを見出している。IL-3 受容体の下流に存在するシグナリング分子を解析した結果、JAK や転写因子 STAT のリン酸化、JAK のキナーゼ活性、STAT の DNA 結合能、さらに標的遺伝子 *cyclin D1* の mRNA が CD45 欠損マスト細胞において著明に増大し、JAK/STAT 経路の活性化は CD45 の欠損によって亢進することを認めた。すなわち、CD45 は JAK/STAT 経路を負に制御することが見出された。さらに、Src PTK 阻害剤を用いた解析により、CD45 による JAK/STAT 経路の制御は、CD45 による Src PTK の活性制御とは独立した、新規の事象であることを確認した。

### 2. CD45 による JAK の脱リン酸化を介した JAK/STAT 経路の抑制

CD45 による JAK/STAT 経路の負の制御には、Src PTK が関与していなかったため、CD45 によって JAK あるいは STAT、もしくは両者が直接脱リン酸化され

る可能性が想定された。そこで、CD45 の組換えタンパク質とリン酸化型 JAK またはリン酸化型 STAT を試験管内で反応させると、JAK ファミリー分子 (JAK1、JAK2、TYK2) のリン酸化レベルは著しく減少したのに対し、STAT 分子は全く脱リン酸化されなかった。また、一塩基置換によりホスファターゼ活性を消失させた CD45 変異体とリン酸化型 JAK2 は *in vitro* で結合した。さらに、CD45 によって脱リン酸化された JAK はそのキナーゼ活性が顕著に減少したことから、CD45 は JAK のキナーゼ活性に重要なチロシン残基を脱リン酸化すると結論された。以上より、CD45 は STAT ではなく JAK を直接脱リン酸化してこれを不活性化し、JAK/STAT 経路を負に制御することが証明された。

こうした CD45 による JAK の負の制御は、骨髄由来のマスト細胞だけではなく、マクロファージ、胸腺細胞、B 細胞、Jurkat 細胞における種々のサイトカイン応答においても認められた。

### 3. CD45 による JAK/STAT 経路制御の生理的意義の解明

サイトカインによって誘導される JAK/STAT 経路の活性化は、増殖、分化、生存、ウイルスに対する抵抗性など多岐にわたる生理応答において重要である。そこで CD45 による JAK の負の制御が、生理的にいかなる意義をもつかについて解析した。CD45 の欠損は、IL-3 依存的な骨髄由来マスト細胞の増殖亢進、およびエリスロポエチンや IL-3 依存的な骨髄細胞の血球細胞への分化、増殖、生存の促進を引き起こした。また Jurkat 細胞を用いたウイルス感染実験では、インターフェロン- $\alpha$ によって誘導される抗ウイルス活性が CD45 欠損により増大した。さらにマウス個体を用いた致死的なウイルス感染においても、CD45 欠損マウスは抵抗性を示した。以上より、CD45 による JAK/STAT 経路の負の制御は、サイトカインが司る生理応答の調節機構として重要な役割を担うものと考えられた。

以上を要するに、本研究はチロシンホスファターゼ CD45 の新規標的分子として JAK ファミリー分子を同定し、CD45 が JAK の脱リン酸化を介してサイトカインシグナル伝達を負に制御することを、遺伝学的、生化学的、細胞生物学的に初めて明らかにしている。さらにマウスの個体を用いた解析から、CD45 による JAK/STAT 経路の制御は生理的にも重要な役割を果たすことが示されている。以上の知見は、CD45 の生理機能を解明する有益な情報を提供するだけでなく、サイトカインが関与する幅広い生命現象の理解に手掛かりを与えており、博士(薬学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。