

論文の内容の要旨

高次生命系におけるチロシンキナーゼ標的タンパク質の機能解析

横山 一剛

哺乳類のゲノムには約 500 種類のキナーゼが存在し、細胞増殖・分化、さらには免疫系や神経系の高次機能など、さまざまな生命活動の制御に関与している。しかし、それらのキナーゼの多くはあまり解析されておらず、標的基質についてはほとんど知られていない。例えばチロシンキナーゼ Src は 20 年以上前から精力的に解析されているにもかかわらず、これまでに知られている標的基質だけでは Src の細胞での作用の全てを説明することはできない。

チロシンキナーゼは大きく受容体型と非受容体型に分類される。受容体型は言うにおよばず、非受容体型チロシンキナーゼも多くは自身の脂質修飾や他のタンパク質との相互作用により細胞膜近傍に局在している。すなわち、チロシンキナーゼは細胞外からのシグナルを細胞内に伝える過程に関与していると考えられる。チロシンキナーゼが進化的にセリン/スレオニンキナーゼよりも後に誕生したことから、多細胞系におけるチロシンキナーゼの重要性が示唆される。そして、免疫系や神経系などの高次生命系においては多種の細胞間における複雑な相互作用こそがその本質であると考えれば、高次生命系をより理解するためにはチロシンキナーゼを介するシグナル伝達経路を解明することが肝要であると言える。

そこで本研究では高次生命系でのチロシンキナーゼの意義を明らかにすることを目的として、ファージ発現ライブラリーを用いた固層リン酸化法により、Src 型チロシンキナーゼ Lyn の標的タンパク質を探索した。同定した約 100 個の基質候補分子のうち、新規のタンパ

ク質 BANK (B cell scaffold protein with ankyrin repeats)および NYAN (Neuronal tyrosine kinase substrate which is associated with NMDA receptor complex)ファミリーについて解析を進めた。

BANK は特定の機能ドメインを持たない 755 アミノ酸残基のタンパク質である。Northern blot 解析、および FACS を用いて単離したリンパ球の詳細な RT-PCR 解析により、BANK は immature B ステージ以降の B 細胞に特異的に発現することを明らかにした。immature B ステージ以降の B 細胞は遺伝子再編成後の機能的な B 細胞抗原受容体(BCR)を発現することから、BANK は B 細胞の初期発達段階においてではなく、外来抗原に対する B 細胞の応答に関与していると考えられる。

ヒト B 細胞株 Daudi やニワトリ B 細胞株 DT40 野生型、さらに B 細胞に発現するチロシンキナーゼ Lyn, Syk, Btk を欠損する DT40 変異体の解析から、BANK は BCR 刺激後きわめて短時間のうちに、一過的に Syk によりチロシンリン酸化されることが分かった。

B 細胞における BANK の役割をさらに明らかにするために、BANK 過剰発現 DT40 B 細胞株 BANK(1-755)を樹立し、BCR 刺激後の生化学的応答を調べた。BANK(1-755)細胞は、野生型 DT40 と比べて、BCR 刺激後の Lyn, Syk などのチロシンキナーゼの活性化および PLC- γ 2 のチロシンリン酸化、IP₃ 産生に変化は見られなかったが、細胞内プールからのカルシウム放出が増大していた。これは、BANK は IP₃ 産生とは独立の経路で細胞内プールからのカルシウム動員を制御していることを示唆する。また、BANK(1-755)細胞において IP₃ 受容体(IP₃R)のチロシンリン酸化が増大していることを見出した。細胞内プールからのカルシウム放出は IP₃ 受容体型カルシウムチャンネルが関わっている。IP₃R は Src 型チロシンキナーゼによりリン酸化されることでチャンネル活性が上昇するが、BANK はこのリン酸化経路を調節することで BCR 刺激後のカルシウム動員を制御している可能性が示唆された。

BANK は当初 *in vitro* 反応系での Lyn の標的基質として同定した分子であり、また B 細胞において IP₃R のチロシンリン酸化を促進することから、これら 3 者の相互作用を培養細胞での再構成系で調べた。その結果、Lyn は BANK とチロシンリン酸化依存的に、BANK のアミノ酸残基 367-653 の領域を介して会合すること、また IP₃R は BANK のアミノ酸残基 1-155 の領域と会合することが分かった。さらに IP₃R は Lyn によってチロシンリン酸化されるが、BANK を共発現させると IP₃R のチロシンリン酸化が顕著に増大した(図 1A)。以上より BANK は scaffold タンパク質として IP₃R と Lyn の空間的な配置を調節していると考えられる。IP₃R と会合できない変異体 BANK(155-755)は Lyn による IP₃R のチロシンリン酸化を促進しなかった。また、この BANK(155-755)は B 細胞においても BCR 刺激後の細胞内プールからのカルシウム動員を増大させず、むしろ減少させた。このことは 3 者の物理的な会合の重要性を示している。

B 細胞においてカルシウム動員に関わるタンパク質は、免疫系における *Xid* (X-linked immunodeficiency)様の表現型を共通の特徴とする。これらの多くはお互いに会合し、シグナル伝達複合体(signalosome)を形成していることが明らかにされてきた。BANK の類縁分

子 BCAP もまた *Xid* グループに属し、BCAP 欠損 DT40 細胞の解析から、BCAP は同じく *Xid* グループタンパク質である PI3K p85 サブユニットとの会合を介して機能すると考えられていた。しかし BCAP 欠損マウス由来の B 細胞の生化学的解析から、BCAP は PI3K の活性調節にはほとんど関与しておらず、むしろ PLC- γ 2 やカルシウムチャネルを含むシグナル伝達複合体を、空間的にコンパクトな複合体にまとめることに関わっている可能性も示唆されている。従って、BANK も *Xid* signalosome のメンバーとして、Lyn, IP₃R そして他の *Xid* メンバーも含む、より大きな複合体の形成に関与している可能性もある。IP₃R がカルシウムシグナル伝達複合体に含まれる可能性は以前より想定されていたが、本研究は B 細胞においてこのモデルを初めて実証したものである(図 1B)。

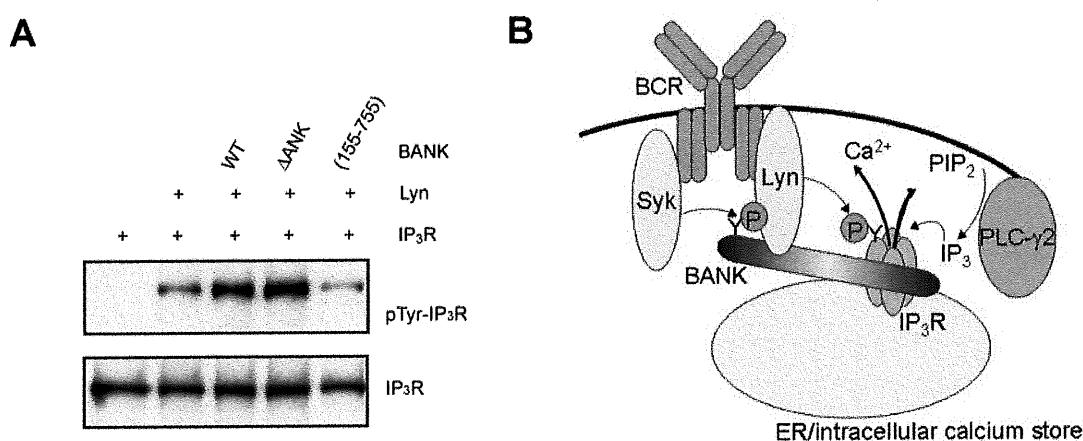


図 1 BANK は Lyn と IP₃R をつなぐ新しいタイプの足場タンパク質である。

(A) BANK は Lyn による IP₃R のチロシンリン酸化を促進する。アンキリンリピートを欠く BANK(Δ ANK)も野生型 BANK と同じ活性を持つが、IP₃R と会合できない変異体 BANK(155-755)は活性を持たない。

(B) BANK が存在すると IP₃R のチロシンリン酸化が促進され、チャネル活性が上昇することで、カルシウム動員が促進される。

NYAN1 もまた特定の機能ドメインを持たないタンパク質である。マウス各組織および単離した神経系初代培養細胞の Northern blot 解析により、NYAN1 は神経細胞に特異的に発現することを明らかにした。マウス脳において NYAN1 は出生後一週間以内に発現量が減少し始めることから、NYAN1 は神経細胞の後期の発達過程において機能している可能性が示唆された。

Src 型キナーゼの一つである Fyn の欠損マウスにおいて NYAN1 のチロシンリン酸化は顕著に減少しており、NYAN1 は Src 型キナーゼによりリン酸化されていると考えられる(図 2A)。NYAN1 の Fyn によりリン酸化されるチロシン残基は 2 箇所あり、2 箇所とも PI3K p85 サブユニットの SH2 ドメイン結合コンセンサス配列に合致し、実際にマウス脳内で NYAN1 が p85 と結合することを示した。

アデノウイルスベクターにより海馬神経初代培養細胞に発現させた NYAN1 はスパインの先端部に強く発現した(図 2C)。さらに NYAN1 がシナプス可塑性に関わる NMDA 受容体複合体と会合していることを明らかにした(図 2B)。

またデータベース検索により、NYAN1 の 2 箇所のリン酸化チロシン残基周辺においてのみ NYAN1 と相同性を示すタンパク質が 2 分子存在することを明らかにし、NYAN2, NYAN3 と名付けた。NYAN2, NYAN3 とともに神経系に特異的に発現するが、NYAN1, 2, 3 の間で脳内における発現部位および経時的な発現パターンは異なっていた。

NYAN2, 3 も Fyn によりチロシンリン酸化され、かつ NMDA 受容体複合体と会合していることから、NYAN ファミリーは全体的な構造はファミリー間で異なるが、機能的には共通して NMDA 受容体複合体からの PI3K-Akt シグナルを制御し、神経細胞の生存・機能調節に関わっていると考えられる。

NYAN1, 2, 3 はタンパク質の構造・大きさが異なるだけでなく、マウス染色体における genome 構造も互いに異なる。染色体領域全体の大きさは *Nyan1* は 10kbp 以内に全ての exon が含まれるのに対し、*Nyan2* は 250kbp 以上、*Nyan3* は 400kbp と全く異なっている。このような全体的な genome 構造の違いに関わらず、2 箇所のリン酸化チロシン残基を含む exon は *Nyan1, 2, 3* とも 1kbp 以上の大きな exon であり、「NYAN ドメイン」は cDNA 配列においてのみならず、genome 構造においても保存されている。このように特異な形で NYAN ドメインが保存されていることは、このドメインの生理的な重要性を強く示唆するものであり、また神経系におけるチロシンリン酸化の重要性をも示していると考えている。

本研究で解析した BANK, NYAN ファミリーを始めとして、チロシンキナーゼの新規標的タンパク質を同定・解析することにより、免疫系や神経系などの高次生命系の分子基盤の理解が進むだろう。

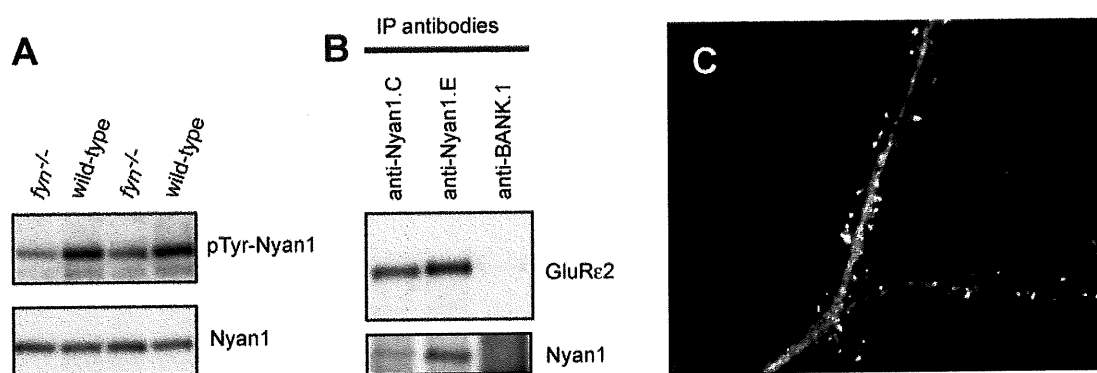


図 2 NYAN1 はグルタミン酸受容体と会合する新規のチロシンリン酸化タンパク質である。

(A) Nyan1 は Src 型キナーゼによりリン酸化される。

(B) Nyan1 は NMDA 受容体サブユニット GluRe2 と会合する。

(C) 海馬神経初代培養細胞に発現させた Nyan1 はスパインの先端部に強く発現する。