

審査の結果の要旨

氏名 権 相模

Lnk は蛋白質相互作用に重要と思われる富プロリン配列を含むN末端領域及びPH、SH2ドメインを持つアダプター蛋白質である。Lnk 遺伝子欠損マウスの解析から、Lnk がB細胞産生および造血前駆細胞の造血能制御に重要な役割を果たしていること、c-Kit チロシンキナーゼ受容体からのシグナルを抑制的に制御していること、などが明らかになっている。Lnk を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析からは、B細胞産生障害とともに一部の脾臓B細胞亜集団における細胞径増大及び増殖細胞の減少が観察されている。Lnk の抑制作用の一部として、チロシンキナーゼ受容体の活性化により生じる Gab アダプター蛋白質のリン酸化、引き続く MAPK 経路活性化を抑制することが明らかにされているものの、詳細な分子機構についてはまだ不明な点が多い。

本研究は Lnk の過剰発現によりみられた B 細胞径の増大に着目し、Lnk がアクチン細胞骨格の制御分子として機能する可能性について線維芽細胞株を用いて詳細に検討した。その結果 Lnk がアクチン再構築を促進し、細胞分裂や遊走を制御することを見出した。また、その分子機構について解析し、Lnk がチロシンキナーゼ受容体と Vav, Rac, PAK, filamin A などのアクチン細胞骨格の制御分子群とを結ぶ足場蛋白質として機能しており、効率のよいアクチン再構築に貢献していることを明らかにした。簡単に結果をまとめると以下になる。

I) Lnk 過剰発現による細胞周期抑制と細胞骨格系制御

Lnk トランスジェニック B 細胞のアクチン細胞骨格異常：Lnk トランスジェニックマウスを用いて B 細胞における Lnk 過剰発現の影響を検討した。骨髄 B 前駆細胞や脾臓中の濾胞 B 細胞、辺縁帯 B 細胞で大きな変化はみられなかったが移行型の未熟 B 細胞の細胞径が増大していた。細胞周期を解析したところ、B 細胞減少に伴う代償性の増殖ではなく逆に増殖細胞の割合は減少していた。そこでアクチン細胞骨格について共焦点顕微鏡を使って解析したところ、トランスジェニック B 細胞では正常ではみられないアクチンの集積が観察された。

Lnk と細胞骨格系制御：線維芽細胞株に Lnk を過剰発現させアクチン細胞骨格の観察をおこなった。Lnk の発現により細胞形態は大きく変わり、細胞周辺にアクチンの集積がみられた。細胞周期を調べたところ、G2/M 以後、細胞分裂段階で異常があることが分かった。さらに Lnk の発現により多核の細胞が出現し、アクチン細胞骨格への影響は細胞分裂障害を起こすことがわかった。

II) Lnk による細胞骨格制御の分子機構

Lnk の Rac シグナルを介した細胞分裂制御機構: Lnk を発現させた細胞より免疫沈降を行い、Lnk と Rac が複合体を形成することを明らかにした。活性化した Rac (GTP-Rac) のみ結合出来る PAK 結合蛋白質を用いた Pull-down assay から Rac は Lnk の発現により過剰に活性化されることが分かった。Rac の細胞内局在を検討したところ、Rac は血清刺激によって細胞膜周辺へ移動し、更に Lnk と共に局在することが観察された。Rac のドミナントネガティブ変異体を共発現させることによって Lnk により生じる多核化などの異常は回復した。Lnk によるアクチン再構成、細胞骨格や細胞分裂の異常は Rac の活性化を介することが明らかになった。

Lnk による Rac 活性化の分子機構とそのシグナルに必須なドメイン検討: Lnk による Rac 活性化の分子機構を調べる為に、様々な Lnk のドメイン変異体を作製し、細胞骨格、細胞分裂、Rac 活性化への影響を検討した。Lnk の PH ドメイン変異体や SH2 ドメイン点変異体では、Lnk のアクチン再構成亢進作用が消失することから、Lnk の PH ドメインと SH2 ドメインを介したシグナルが必須であることが分かった。Rac を活性化する GEF として知られている Vav 蛋白質との関係を免疫沈降法によって検討したところ、Lnk は Vav 2 と PH ドメインを介して結合していることが分かった。また、この PH ドメインは PAK の基質である filamin との結合にも関係があることが明らかになった。活性化した Rac は PAK と結合することが報告されている。Rac と PAK の結合には Lnk の PH ドメインや SH ドメインが必須であることが分かった。

細胞表面受容体を介した Lnk-アクチンシグナル伝達系: どの細胞表面受容体が Lnk から細胞骨格異常シグナルに関与しているかを検討した。細胞骨格シグナルに関係のある受容体や既に Lnk ファミリーで報告されている多様な受容体を検討したところ、EGF-R、PDGF-R、c-Kit-R が Lnk シグナルの上流で機能することが示唆された。

本論文は Lnk によるアクチン細胞骨格制御機構の分子機構を解明した。Lnk は、チロシンキナーゼ受容体と Vav2/Rac/PAK/filamin A との複合体形成を補助し、Vav による Rac の活性化、Rac による PAK の活性化、PAK の基質である filamin A の修飾反応を効率良く促進する。チロシンキナーゼ受容体の活性化に伴うアクチン再構成において、Lnk は新規の足場蛋白質として機能することを明らかにした。この Lnk のアクチン細胞骨格制御機能の発現には、PH ドメインによる自身の細胞膜移行及び Vav, filamin A との会合、さらに SH2 ドメインによるチロシンキナーゼ受容体への結合が必須と考えられる。

以上本研究の生化学的および細胞学的な実験によって Lnk の細胞増殖抑制の分子機構としてチロシンキナーゼ受容体による Lnk がアクチン細胞骨格制御を介して細胞分裂を制御するという新たな細胞増殖制御機構の存在を示した。よって本論文は、学位の授与に値するものと考えられる。