

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 **Regulation of B Cell Receptor Signaling by Cbl Family Adaptor Proteins**

B 細胞受容体を介するシグナル伝達における Cbl ファミリー蛋白質の機能解析

氏名 保田朋波流

生体の免疫応答に重要な役割を担っている B 細胞は、その細胞表面に抗原特異的な受容体である B 細胞受容体 (BCR) を発現している。BCR を介したシグナル伝達は B 細胞の増殖応答を誘導するのみならず、B 細胞自身の発分化にも必須であることが明らかとなっている。BCR はリガンドである抗原を認識するサブユニットと、シグナル伝達を担っているサブユニットの複合体として細胞表面に発現しており、前者は免疫グロブリン (Ig) L 鎖と膜型 IgH 鎖が、後者は Ig- α と Ig- β が相当する。Ig- α 及び Ig- β の細胞内領域には、ITAM (Immune receptor Tyrosine-based Activation Motif) と呼ばれる 26 個のアミノ酸配列があり、この中のよく保存されたチロシン残基のリン酸化が細胞内シグナル伝達に不可欠である。BCR 刺激後、最も早期には Src ファミリー、Syk、Btk といったチロシンキナーゼ群が活性化され、Ig- α や Ig- β を含む細胞内の様々な蛋白質のチロシンリン酸化を引き起こす。それに続き、Ras-MAPK 経路、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)、phospholipase C (PLC)- γ 2 といった下流のエフェクター分子群が活性化される。このうち PLC- γ 2 は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) を加水分解することで、diacylglycerol と inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) を生成し、それぞれ PKC の活性化と細胞内カルシウ

ム動員を誘起する。また PLC- γ 2 自身の活性化には Btk 及び Syk によるチロシンリン酸化、さらにはアダプター分子である BLNK との結合とそれに伴う細胞膜近傍への移行が必須である。PLC- γ 2、Btk、BLNK の遺伝子欠損マウスの解析からこれらの分子が B 細胞の分化、増殖、免疫応答に必須であることが明らかであり、実際に B 細胞の分化不全を伴うヒトの免疫不全症の原因遺伝子として Btk や BLNK が同定されている。しかしながら、Btk、BLNK、PLC- γ 2 がどのような機構で細胞膜近傍、特に BCR を介した細胞内カルシウム動員に必須な構造とされるラフトドメインに移行するのかは不明であり、また BLNK 以外には Btk と PLC- γ 2 を結びつけるアダプター分子は知られていない。さらに、PLC- γ 2 の活性化を直接負に調節する分子に関しても未だ同定されていない。

一方、マウスにおいて pre-B 細胞リンパ腫や骨髄細胞腫を発症させる Cas NS-1 レトロウイルスの原因遺伝子として同定された v-cbl の細胞ホモログ、c-cbl が Lyn と会合し、BCR 下流で Lyn によってチロシンリン酸化されることが示されている。ほ乳類の Cbl ファミリーは、Cbl、Cbl-b、Cbl-c の3つが同定されているがそのうち、リンパ球において高い発現を示すのは Cbl と Cbl-b である。いずれの分子も N 末端側にリン酸化チロシン残基を認識して結合する tyrosine kinase-binding (TKB)ドメイン、中央部にユビキチンリガーゼ活性を有する RING finger ドメイン、中央部から C 末端側にかけては SH3 ドメインの認識配列であるプロリンリッチドメインと SH2 ドメインを有する様々な蛋白質とリン酸化依存的に結合するチロシン残基を多数有する。Cbl は上記の Lyn 以外にも Syk/Zap-70 ファミリーや Btk といったチロシンキナーゼ、Grb2、Crk、Nck といったアダプター分子、PI3K や Vav のようなエフェクター分子など多数のシグナル制御分子と会合することが知られている。また肥満細胞では Fc ϵ RI 刺激後、Syk と結合し、Syk の活性をを負に制御しており、更に線虫の遺伝学的解析からも、Cbl はチロシンキナーゼを介するシグナル伝達の負の制御分子として位置づけられている。

本論文では BCR を介したシグナル伝達における Cbl の機能的役割を明らかとする目的で、ニワトリ B 細胞株 DT40 を用いて、その Cbl 欠損細胞を樹立した。Cbl 欠損細胞では BCR 刺激後の Ras の活性化、並びに PI3K の下流で活性化を受ける Akt の活性化に関しては、野生型と比較し変化を認めなかった。これに対し、BCR 刺激依存性の IP3 産生、それに引き続いて起こる細胞内カルシウム動員は野生型と比べ著明に増加していた。DT40 細胞では BCR 刺激後、24 時間程でアポトーシスが誘導され、それには細胞内カルシウム動員が必須であることが知られているが、実際に Cbl 欠損細胞では BCR 依存性のアポトーシスの誘導は野生型と比べ明らかな亢進を示した。以上から Cbl は BCR 下流のシグ

ナル伝達、特にカルシウムシグナル伝達系において特異的に抑制していることが示された。さらに BCR 刺激依存性の PLC- γ 2 のチロシンリン酸化が Cb1 欠損細胞において亢進していたことから、Cb1 が PLC- γ 2 の活性制御に関わるものと推測された。PLC- γ 2 の活性化には Syk、Btk という2つのチロシンキナーゼが必須であることが知られているが、いずれのチロシンキナーゼの活性に関しても、Cb1 欠損の影響を認めなかった。すなわち B 細胞以外の結果から推測されるような機能とは異なる働きにより、PLC- γ 2 の活性を負に制御しているものと考えられた。次に BLNK と PLC γ -2 との会合状態について検討した結果、Cb1 の欠損によって顕著に亢進していることがわかった。実際に Cb1 は TKB ドメインを介して直接チロシンリン酸化された BLNK と結合することが確認された。また Cb1-TKB ドメインのリン酸化チロシン認識配列が PLC γ -2-SH2 による BLNK 上のリン酸化チロシン認識配列の極めて近傍に位置していることは上記の結果を支持するものである。

Cb1 遺伝子欠損マウスおよび Cb1-b 遺伝子欠損マウス由来のリンパ球の活性化並びに分化状態の差異から、Cb1 と Cb1-b は生体内においてそれぞれ個別の機能を有していることが示唆される。そこで Cb1-b 欠損 DT40 細胞株を樹立し、BCR シグナル伝達系について解析を行った。Cb1-b 欠損細胞では、Cb1 欠損細胞とは逆に、BCR 刺激後の PLC- γ 2 のチロシンリン酸化、IP3 産生及び細胞内カルシウム動員が野生型と比べ、著しく減弱していることが分かった。この結果から予想されるように、BCR 刺激依存性に PLC- γ 2 下流で誘導されるアポトーシス、Erk、JNK、p38 といった MAPK の活性化、さらに Rap-1 の活性化はいずれも Cb1-b 欠損細胞において減弱を認めた。このことから Cb1-b は BCR 下流のカルシウムシグナル系を正に制御していることが明らかである。しかしながら Cb1 とは異なり、BLNK と PLC- γ 2 との間の結合状態には影響を及ぼさなかった。一方、Btk 依存的な細胞内カルシウム動員の持続に Cb1-b が必須であり、Cb1-b による細胞内カルシウム動員の制御には TKB ドメインと C 末側半分の構造の両方が必要であることが分かった。また Cb1-b は BCR 刺激依存的にラフトドメインへと移行し、Cb1-b 欠損細胞では Btk、BLNK、PLC- γ 2 のラフトへの移行に傷害があることが分かった。さらに Cb1-b 欠損細胞では BLNK や PLC- γ 2 と Btk との間の会合が極めて減弱していること、Cb1-b が Btk や PLC- γ 2 と会合しうることなどから、Cb1-b が Btk による PLC- γ 2 の活性化を促進するアダプター蛋白質としての機能を有していることが明らかとなった。