

審査の結果の要旨

氏名 保田 朋波流

生体の免疫応答にとって重要な役割を担うリンパ球の分化および活性化には、抗原受容体刺激により活性化されるカルシウムシグナル伝達経路が必須である。本研究ではカルシウムシグナル伝達経路の制御機構を明確にするため、ニワトリ DT40 B 細胞を用いた遺伝子ターゲティングにより、B 細胞抗原受容体 (BCR) 下流のカルシウムシグナル伝達系における Cbl ファミリー分子の機能解析を行い、下記の知見を得た。

1. Cbl に関しては BCR 刺激後、チロシンキナーゼ Lyn によってチロシンリン酸化を受けることが知られていたが、Cbl-b もまた BCR 刺激によりチロシンリン酸化を受け、これは Lyn と Syk の両方のチロシンキナーゼが必要であることが明らかとなった。
2. Cbl 遺伝子欠損 DT40 細胞株を作製し、BCR 下流のシグナル伝達について解析したところ、Cbl 欠損細胞では Ras や PI3 キナーゼの経路には影響が認められないものの、細胞内カルシウム動員とそれによるアポトーシス誘導において明らかな更新を認めた。これは B 細胞の細胞内カルシウム動員に必須な酵素である、PLC- γ 2 の活性化亢進に起因するものであることを同定した。また同じく B 細胞の細胞内カルシウム動員に必須なアダプター分子、BLNK と Cbl が BCR 刺激依存的に直接結合していること、Cbl が BLNK と結合することで BLNK と PLC- γ 2 間の会合が阻害されること、それには Cbl の Tyrosine kinase binding (TKB) ドメインが必要であることなどを初めて見いだした。
3. Cbl-b 遺伝子欠損 DT40 細胞株を作製し、BCR 下流のシグナル伝達について解析したところ、Cbl-b 欠損細胞では Cbl 欠損細胞とは逆に PLC- γ 2 の活性化および細胞内カルシウム動員において明らかな減弱を認めた。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 MAP キナーゼの活性化、さらに Rap-1 の活性化はいずれも Cbl-b 欠損細胞において減弱を認めた。これらのことから Cbl-b は BCR 下流のカルシウムシグナル伝達系を正に制御していることが明らかとなった。また Cbl 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、B 細胞の細胞内カルシウム動員に必須なチロシンキナーゼである Btk 依存的な細胞内カルシウム動員に Cbl-b が必須であること、Cbl-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須であることを見いだした。また Cbl-b は BCR 刺激後、細胞質領域からラフト領域へ著しい局在変化を示すこと、Cbl-b 欠損細胞では Btk、BLNK、PLC- γ 2 の BCR 刺激依存的なラフト領域への局在変化に傷害があることを見いだした。さらに Cbl-b が Btk や PLC- γ 2 と会合し、Btk による PLC- γ 2 の活性化を促進することを見いだした。

以上、本論文はニワトリ B 細胞株、DT40 を用いた遺伝子ターゲティングにより、B 細胞抗原受容体下流のカルシウムシグナル伝達系の制御分子として Cbl および Cbl-b が重要な役割を有していることを初めて明らかにした。本研究は抗原受容体を介するリンパ球の分化・活性化機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。