

論文の内容の要旨

論文題目 細胞膜受容体刺激から活性酸素産生に至る
好中球シグナル伝達機構の解析

氏名 百瀬 暖佳

【序論】

細菌感染に対する宿主の生体防御において重要な役割を担う好中球は、体内へ侵入してきた細菌から遊離してくる走化性因子（ホルミルペプチド）の濃度勾配にしたがって、感染部位へと遊走する。細胞遊走に関与しているのは、主に三量体 GTP 結合蛋白質(G_i)と共役している fMLP 受容体であるが、殺菌作用のある活性酸素(O_2^-)や酸性消化酵素の放出を制御することも、fMLP 受容体の果たす役割の一つである。細菌感染部位では、好中球細胞膜上に存在する $Fc\gamma$ 受容体もまた、fMLP 受容体と同様に重要な機能を担っている。宿主の IgG によってすみやかに覆われた細菌は、IgG の Fc 部分を介して $Fc\gamma$ 受容体に認識され、貪食によって一掃される。先に当研究室では、好中球様に分化させた細胞において、 $Fc\gamma$ II 受容体でプライミングした際に、fMLP 刺激による活性酸素の産生が相乗的に増加するという現象を見出した (図 1)。

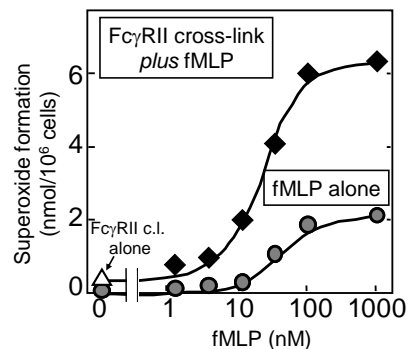


図1 $Fc\gamma$ RII、および fMLP 共刺激時の相乗的な活性酸素 (O_2^-) 産生

fMLP 刺激による活性酸素産生が他の受容体からのシグナル等によって増強されるプライミング効果は、好中球ではよく知られた現象であるが、詳細な分子機構は未だ明らかにされていない。そこで、好中球様に分化させたヒト細胞株 THP-1 を用い、相乗的な細胞応答を引き起こすシグナル伝達機構の解明を試みた。

【結果】

1. 相乗的な活性酸素産生に介在する分子の探索

FcγII 受容体と fMLP 受容体を共に刺激(以下、共刺激と略記)した際の相乗的な活性酸素産生は、Src 型チロシンキナーゼ阻害薬の PP2 によってほぼ完全に抑制された。そこで、相乗的な細胞応答を誘起する分子の候補として、まず Src 型チロシンキナーゼを考えた。Src ファミリーの中で、Fyn の活性化が FcγII 受容体の架橋刺激で起こることを見出したが、fMLP 刺激によってその活性化に変動は認められず、相乗性を担う分子の実態は Fyn でないと結論付けた。一方で好中球における活性酸素産生に対しては、PI 3-キナーゼ阻害薬の wortmannin が非常に強い抑制効果を示すことが報告されている。そこで、PI 3-キナーゼの産物である PIP₃ の変動について検討したところ、共刺激時に顕著な産生量の増大が認められ、また、その増強分が PP2 によってほぼ完全に抑制されることを見出した。したがって、共刺激時の好中球における相乗的な活性酸素産生という細胞応答は、チロシンキナーゼ(Fyn)活性とリンクした p85/p110 型の PI 3-キナーゼ近傍を介して起こる現象であると考えられた。

受容体刺激に伴う p85/p110 型 PI 3-キナーゼの活性化には、チロシンリン酸化されたアダプター蛋白質との結合が必要である。FcγII 受容体の架橋刺激によって、2 種のアダプター蛋白質 c-Cbl と Gab2 がチロシンリン酸化されて PI 3-キナーゼと結合し、その脂質キナーゼ活性を亢進することを明らかにした。共刺激時、

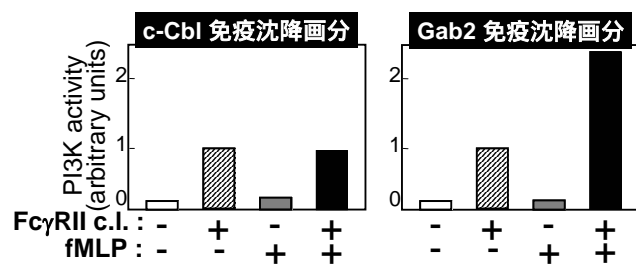


図2 c-Cbl、Gab2によって活性化されるPI 3-キナーゼ

Gab2 と結合する PI 3-キナーゼの活性のみが相乗的に増強されたことから(図 2)、細胞内 PIP₃ 産生の増強は Gab2 によって引き起こされるものと考えられた。また、Gab2 ノックアウトマウス由来の好中球や、PI 3-キナーゼと結合できない Gab2 変異体を導入した細胞において、相乗的な活性酸素産生が顕著に抑制された。これらの結果より、相乗的な PIP₃ 産生や活性酸素産生を誘起する分子として、PI 3-キナーゼのアダプター-Gab2 の重要性が考えられた。そこで Gab2 に着目し、さらに詳細な検討を進めた。

2. Gab2 の分子量シフトを引き起こすメカニズムの解明

刺激依存的な Gab2 の動態について検討したところ、fMLP 刺激によって SDS-PAGE 上での Gab2 の移動度が高分子量側へシフト(分子量シフト)する現象を見出した。百日咳毒素(G_i/G_oと受容体との脱共役)、および PD98059(ERK キナーゼ阻害薬)で細胞を処理した際に、その分子量シフトが抑制されたことから、G_i、および ERK の活性化を介して Gab2 が何らかの化学修飾を受けている可能性が示唆された。リン酸化セリン/スレオニンホスファターゼ処理によって Gab2 の分子量シフトが抑制されたこと、*in vitro*において ERK が Gab2 をリン酸化したことより、Gab2 の分子量シフトを引き起こす化学修飾は、ERK によるセリン/スレオニン残基へのリン酸化であると考えられた。

3. Gab2 を介した相乗的な細胞応答

PD98059 処理によって Gab2 の分子量シフト(セリン/スレオニン残基のリン酸化)が抑制されている条件下、Gab2 による PI 3-キナーゼ活性の増強はほぼ完全に抑制された。同様に、細胞内 PIP₃ 産生(図 3A) や活性酸素産生(図 3B)も、共刺激時に見られる増強分のみが PD98059 処理によって特異的に抑制された。これらの結果より、FcγII 受容体と fMLP 受容体からのシグナルが Gab2 上でクロストークして、相乗的な細胞応答を誘起することが示唆された。

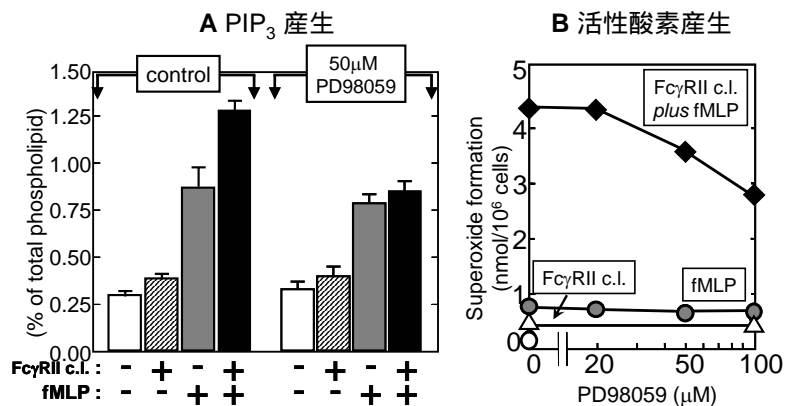


図3 細胞内PIP₃産生と活性酸素産生に対するPD98059処理の効果

4. fMLP 受容体を介した ERK の活性化機構の解析

fMLP 受容体から ERK の活性化に至る経路を明らかにする目的で、種々の阻害薬による検討を行った。その結果、百日咳毒素、wortmannin、1 級ブタノールのそれぞれで細胞を処理した際に、ERK の活性が顕著に抑制されることを見出した。fMLP 受容体の下流で活性化される PI 3-キナーゼは p101/p110 型である。また、1 級ブタノール存在下では、PLD の活性化に伴うホスファチジン酸の産生が阻害される。wortmannin と 1 級ブタノールに対する感受性から、ERK の活性化における p101/p110 型 PI 3-キナーゼと PLD の関与が示された。さらに wortmannin と 1 級ブタノールの共存下で、fMLP 刺激による ERK の活性がほぼ完全に抑制されるという結果を得た(図 4)。以上の結果より、fMLP 刺激による ERK の活性化には、p101/p110 型 PI 3-キナーゼと PLD が協調的に作用していることが考えられた。また、Gab2 の分子量シフト(セリン/スレオニン残基のリン酸化)は wortmannin、1 級ブタノールの処理によって抑制されたことから、p101/p110 型 PI 3-キナーゼ、PLD を介して活性化された ERK が Gab2 をリン酸化する可能性が示唆された。

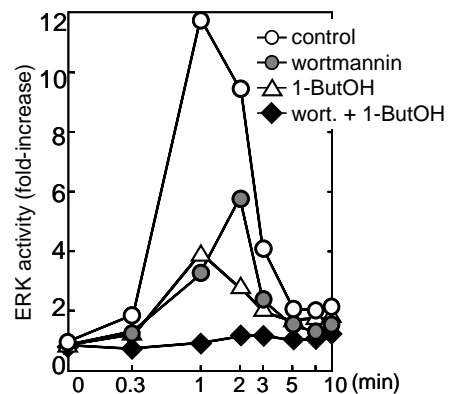


図4 fMLP刺激に依存したERKの活性化に対する阻害薬の効果

チロシンキナーゼ型受容体による ERK の活性化に関しては、古典的 MAPK 経路 (Ras/Raf/MEK/ERK) を介するシグナル伝達がよく解析されている。古典的 MAPK 経路において ERK はその上流キナーゼである MEK により活性化され、MEK はさらにその上流キナーゼ、Raf によるリン酸化で活性化する。Raf は GTP 型の低分子量 G 蛋白質、Ras との結合により活性化する。本研究において、G 蛋白質共役型の fMLP 受容体を介しても MEK のリン酸化が検出され、このリン酸化が wortmannin や 1 級ブタノールの処理によって消失することを見出した。さらに、fMLP 刺激に応じて増加する GTP 型 Ras の量は、wortmannin 処理、および、1 級ブタノール処理によって顕著に抑制されるという結果を得

た。したがって、p101/p110 型 PI 3-キナーゼと PLD が fMLP 刺激による Ras の活性化に関与し、Ras より始まる古典的 MPAK 経路を介して、ERK の活性化を引き起こしている可能性が示唆された。

【まとめ】

本研究において、1) アダプター蛋白質 Gab2 が FcγII 受容体の架橋刺激によってチロシンリン酸化され、p85/p110 型 PI 3-キナーゼと結合すること、2) fMLP 刺激下、Gab2 が ERK によってセリン/スレオニンリン酸化され、結合する p85/p110 型 PI 3-キナーゼの活性を増強しうることを明らかにした。さらに、3) Gab2 のセリン/スレオニン残基をリン酸化する ERK の活性化には p101/p110 型 PI 3-キナーゼと PLD が介在しており、4) Gab2 上で 2 種を受容体からのシグナルがクロストークした結果、細胞内 PIP₃ 産生や活性酸素産生の増強を引き起こしている可能性を見出した。

PI 3-キナーゼには、チロシンリン酸化されたアダプター蛋白質との結合によって活性化される p85/p110 型と、三量体 GTP 結合蛋白質共役型受容体の刺激で産生した Gβγ によって活性化される p101/p110 型がある。FcγII 受容体の架橋刺激によって Gab2 はチロシンリン酸化されて p85/p110

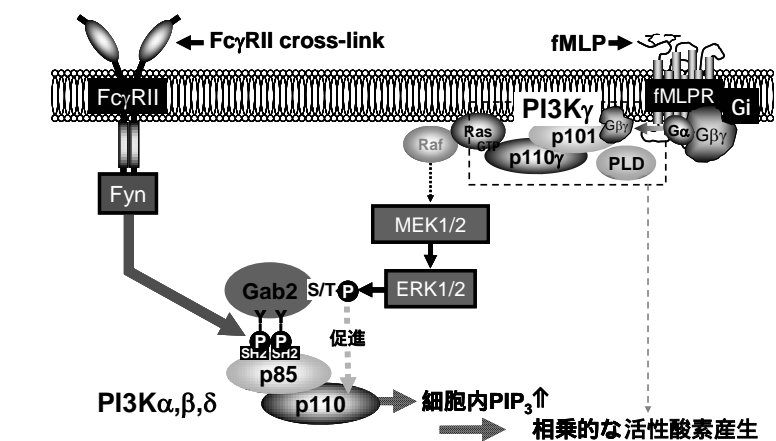


図5 相乗的活性酸素産生を誘起する好中球シグナル伝達のモデル図

その活性化を引き起こす。さらに fMLP 刺激が加わると、Gab2 が結合しているタイプとは異なる p101/p110 型の PI 3-キナーゼと PLD がシグナル伝達経路の上流で活性化する。その下流で活性化された ERK は、Gab2 のセリン/スレオニン残基をリン酸化する。こうして、Gab2 と結合する p85/p110 型 PI 3-キナーゼの活性をさらに亢進させ、PIP₃ 産生の増強を引き起こしているものと考えられる。PIP₃ 産生の増大が、最終的な細胞応答としての相乗的活性酸素産生を誘起する、という本研究で得られた好中球シグナル伝達のモデルを図5に提示した。