

審査の結果の要旨

氏名 百瀬 暖 佳

細菌感染に対する宿主の生態防御において、好中球は重要な役割を果たす免疫担当細胞の一種である。好中球は、主に殺菌作用をもつ活性酸素を産生して体内より異物を排除する。活性酸素はG蛋白質共役型の走化性因子 fMLP 受容体を介して産生されるが、同時に炎症性サイトカイン等で好中球を刺激すると、活性酸素の産生量が相乗的に増強するプライミング現象が知られていた。しかしながら、好中球のプライミング現象を引き起こす詳細な分子機構は不明であった。「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」と題する本論文においては、免疫グロブリン FcγII 受容体によるプライミング機構を解析し、相乗的な活性酸素産生に介在する分子として脂質リン酸化酵素 PI 3-キナーゼのアダプター分子 Gab2 を見出した。さらに、FcγII 受容体と fMLP 受容体からのシグナルが Gab2 上の多重のリン酸化を介してクロストークした結果、相乗的な活性酸素産生が誘起される新たな可能性を提示している。

1. 相乗的な活性酸素産生は PI 3-キナーゼのアダプター-Gab2 を介する

種々の阻害薬等による検討から、相乗的な活性酸素産生を誘起する分子として、チロシンキナーゼ活性とリンクした p85/p110 型 PI 3-キナーゼの可能性を示した。この PI 3-キナーゼはチロシンリン酸化されたアダプターとの結合によって活性化されるが、そのアダプターとして Gab2 を見出した。FcγII 受容体の架橋刺激によってチロシンリン酸化された Gab2 は、PI 3-キナーゼと結合してその活性を亢進させるが、fMLP 受容体を同時に刺激すると、Gab2 を介する PI 3-キナーゼの活性が顕著に亢進した。また、Gab2 ノックアウトマウス由来の好中球や p85/p110 型 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は、相乗的な活性酸素の産生が消失した。したがって、この相乗的な細胞応答には p85/p110 型 PI 3-キナーゼが介在し、その脂質キナーゼ活性を調節するアダプター分子 Gab2 の重要性が示された。

2. fMLP 刺激によって活性化された ERK は Gab2 をリン酸化する

刺激依存的な Gab2 の動態について解析を進め、Gab2 が FcγII 受容体刺激によるチロシンリン酸化に加えて、fMLP 受容体刺激によって化学修飾を受けることを明らかにした。阻害薬等による検討から、fMLP による Gab2 の化学修飾はセリン/スレオニン残基

へのリン酸化であり、G蛋白質 G_i を介して活性化された ERK がこのリン酸化に寄与することが示された。

3. Gab2 の多重のリン酸化によって相乗的な細胞応答が引き起こされる

Fc γ II 受容体と fMLP 受容体を同時に刺激すると、Gab2 に結合した PI 3-キナーゼの活性は顕著に増強される。MEK1 阻害薬 PD98059 処理によって Gab2 のセリン/スレオニンリン酸化を抑制した条件下では、両受容体の同時刺激による PI 3-キナーゼ活性の増強が、ほぼ完全に抑制されることを見出した。また、同様の条件下において、両受容体を同時に刺激した時の細胞内 PIP₃ 産生の増強分、および活性酸素産生の増強分は特異的に抑制された。以上の知見から、Gab2 のセリン/スレオニン残基へのリン酸化により PI 3-キナーゼの活性が増強し、細胞内 PIP₃ 産生が増大した結果、相乗的な活性酸素産生が誘起される可能性が示された。

4. fMLP 刺激による ERK 活性化には PI 3-キナーゼとホスホリパーゼ D が関与する

種々の阻害薬を用いた検討より、fMLP 受容体から ERK 活性化へと至る経路には、先に同定した分子種とは異なる p101/p110 型 PI 3-キナーゼとホスホリパーゼ D が介在することを見出した。また、両分子の下流において、MEK のリン酸化、および GTP 型 Ras 量の増加が認められた。以上の結果より、fMLP 刺激によって p101/p110 型 PI 3-キナーゼと PLD が活性化され、Ras より始まる古典的 MAP キナーゼ経路介して ERK の活性化に至るシグナル伝達経路の存在が新たに示された。

本研究においては、好中球の相乗的な活性酸素産生に介在する分子として、p85/p110 型 PI 3-キナーゼとそのアダプター Gab2 を同定した。Fc γ II 受容体の架橋刺激によってチロシンリン酸化された Gab2 は p85/p110 型 PI 3-キナーゼと結合するが、G 蛋白質共役型の fMLP 受容体刺激は、Gab2 のセリン/スレオニン残基をリン酸化することを明らかにした。さらに、Gab2 のセリン/スレオニン残基は、p101/p110 型 PI 3-キナーゼとホスホリパーゼ D の下流で活性化された ERK によってリン酸化されること、Gab2 のセリン/スレオニン残基のリン酸化が PI 3-キナーゼの活性を増強し、その結果として相乗的な活性酸素産生という細胞応答に寄与することを示している。これらの研究成果は、好中球が効率よく異物の排除を行う上での活性酸素産生を誘起する分子基盤の理解に有用な知見を提供しており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。