

[論文の内容の要旨]

論文題目 B 細胞における CD19 シグナル伝達機構の解析
指導教員 玉置邦彦教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 16 年 4 月 入学
医学博士課程
外科学専攻
氏名 石浦信子

リンパ球の細胞膜上には、共受容体とよばれる分子があり、抗原受容体からのシグナルを増強あるいは減弱させて細胞内へと伝達し、シグナルの強さを制御する。CD19 は B 細胞特異的な共受容体で、抗原受容体刺激が加わると、その細胞内領域を介してシグナルを増強させる働きを持つ。CD19 欠損マウスの B 細胞は、B 細胞受容体(BCR)刺激に対する反応が低く、免疫応答が弱い。ヒトにおいても CD19 遺伝子の異常による免疫不全の症例が報告されている。一方、CD19 を過剰発現させたトランスジェニックマウスの B 細胞では、BCR 刺激に対する反応が増強し、自己抗体の産生がみられる。CD19 は、細胞内領域に 9 つのチロシン基を有する。BCR が刺激されると、CD19 のチロシン基がリン酸化され、そこに Lyn をはじめとする Src ファミリータンパクチロシンキナーゼ (PTK) が動員される。続いて PTK が種々のタンパクをチロシンリン酸化し、リン酸化カスケードを介して細胞内へとシグナルが伝わっていく。CD19 の 9 つのチロシン基のうち、CD19-Y⁵¹³ と CD19-Y⁴⁸² は、その部分に変異が入ると CD19 欠損マウスと同程度に免疫応答が低下することから、CD19 の中心的役割を果たしていることが示唆されている。また CD19-Y⁵¹³ と CD19-Y³⁹¹ は、Lyn の重要な基質であることが報告されている。

そこで今回、これらの 3 つのリン酸化チロシン基 (CD19-pY⁵¹³、CD19-pY⁴⁸²、CD19-pY³⁹¹) に対する特異抗体を用いて、様々な刺激により生じる CD19 のリン酸化パターンを解析した。

CD19-pY⁵¹³ 抗体は Cell Signaling Technology 社より購入した。CD19-pY⁴⁸² 抗体と CD19-pY³⁹¹ 抗体は作成した。まず 2 つのリン酸化チロシン基を含む部分

のペプチドと、チロシン基のリン酸化されていないペプチドをそれぞれ合成した。合成したリン酸化ペプチドをウサギに 5 回免疫し、血清を採取した。プロテイン A セファロースコラムを用いて、血清中の IgG 分画を抽出した。リン酸化ペプチドを結合させたセファロースコラムに、血清 IgG 分画液を流し、リン酸化ペプチドと反応する抗体を分離した。この抽出した抗体を、今度はリン酸化されていないペプチドを結合させたセファロースコラムに流し、リン酸化チロシン基以外の配列に反応する抗体を除去した。こうして CD19-pY⁴⁸² 抗体と CD19-pY³⁹¹ 抗体を得た。それぞれの抗体が各リン酸化ペプチドに特異的、かつ濃度依存的に反応することを ELISA 法および slot blot 法により確認した。

次にこれらの CD19 リン酸化チロシン特異抗体を用いて CD19 のリン酸化パターンを解析した。まずマウスの脾臓より B 細胞を抽出し、F(ab')₂ 抗マウス IgM 抗体で刺激をし、様々な時間反応させた後、Western blotting 法にて各 CD19 チロシン基のリン酸化の強さを定量した。Y⁵¹³ は BCR 刺激後速やかにリン酸化され、Y³⁹¹ は Y⁵¹³ と比べて、リン酸化の進行はややゆるやかであった。Y⁴⁸² は他の 2 つのチロシン基よりリン酸化が遅く、かつすぐにリン酸化が解除され、リン酸化状態は一過性であった。したがって、CD19 のこれら 3 つのチロシン基は、BCR 刺激後同時にリン酸化されるのではなく、異なるスピードでリン酸化されていくことが示された。次にマウス B 細胞系列の A20 細胞を、F(ab')₂ 抗マウス IgG 抗体で刺激し、上述と同様免疫ブロットを施行した。A20 細胞でも、マウス脾 B 細胞の場合と同様の経時的推移がみられた。Y⁵¹³ のリン酸化が最も速く、Y⁴⁸² のリン酸化が最も緩徐であった。さらに、リン酸化がピークに達した後、Y⁴⁸² は速やかにリン酸化が解除され、刺激 600 秒後には刺激前の状態に戻る一方、Y⁵¹³ と Y³⁹¹ は、刺激 600 秒後でも刺激前の約 2 倍程度までリン酸化が残ることが示された。

Src ファミリー PTKs の活性を阻害する PP2 で前処置してから BCR 刺激すると、3 つのチロシン基全てが全くリン酸化されなかった。一方、Syk の阻害剤である piceatannol で前処置してから BCR 刺激した場合、チロシンリン酸化はほとんど障害されなかった。したがって Src ファミリー PTKs は、BCR 刺激による CD19 のチロシンリン酸化において、不可欠であることが示された。

BCR のアイソタイプが異なると、そのシグナルも異なることが報告されている。B 細胞の系列は同じ K46 細胞で、抗原受容体としてそれぞれ IgM、IgG2a のみを表出するようにトランスフェクトした K46 $\mu\lambda$ 、K46 γ 2a $\mu\lambda$ 細胞を用い

て、IgM 型抗原受容体、IgG 型抗原受容体を刺激した。これらの細胞の抗原を認識する可変領域は同一で、いずれもニトロフェノール(NP)のみを認識するように設計されている。NP₁₂-BSA で刺激すると、K46 γ 2am λ 細胞の CD19-Y⁵¹³ は、K46 μ m λ 細胞の CD19-Y⁵¹³ よりも速くチロシンリン酸化された。また K46 γ 2am λ 細胞の CD19-Y⁴⁸² と CD19-Y³⁹¹ は、K46 μ m λ 細胞のそれよりも強くリン酸化されることが示された。このことから、IgG-BCR 刺激では IgM-BCR 刺激よりも速やかに CD19-Y⁵¹³ のチロシンリン酸化がおこり、CD19-Y⁴⁸² と CD19-Y³⁹¹ はより強くリン酸化されることがいえた。

lipid rafts は、コレステロールやスフィンゴ脂質が豊富な細胞膜上の微小環境であり、細胞表面からのシグナル伝達において重要な役割を担う。抗原が結合して BCR が架橋されると、BCR は lipid rafts に移動することが知られており、この領域には Src ファミリーキナーゼが恒常的に存在しているため、効率よくリン酸化カスケードが進行していく。CD19 のチロシンリン酸化と細胞膜上の局在につき検討した。無刺激あるいは BCR 刺激した A20 細胞を溶解し、ショ糖濃度勾配遠心した。そして濃度勾配にしたがって分画をとりだすと、lipid rafts は不溶成分であり、分画 4-5 に集められる一方、細胞膜の rafts 外のは可溶成分であり、分画 10-12 に集められる。分画ごとに、各 CD19 チロシン基のリン酸化の強さを定量した。無刺激の状態の A20 細胞ではチロシンリン酸化はほとんど検出されないが、発色の際に長く露光していると、リン酸化 Y⁵¹³ が不溶分画に検出された。このことから、細胞膜上の CD19 のうち一部は lipid rafts に存在し、わずかであるが、Y⁵¹³ が恒常的にリン酸化されているものと考えられる。BCR 刺激がおこると、リン酸化 Y⁵¹³ はほとんどが lipid rafts 内で検出されるのに対し、Y⁴⁸² と Y³⁹¹ のリン酸化は、一部は lipid rafts 内で検出されるものの、主として lipid rafts 外で検出された。したがって、A20 細胞において、Y⁵¹³ と Y⁴⁸²、Y³⁹¹ のリン酸化がおこる分布が異なることが示された。また、NP₁₂-BSA で刺激した、K46 μ m λ 細胞も K46 γ 2am λ 細胞でも、リン酸化 Y⁵¹³ の割合は、lipid rafts 内が多く、リン酸化 Y⁴⁸² と Y³⁹¹ は lipid rafts 外の割合が多い傾向がみられた。従って、BCR 刺激による CD19 のチロシンリン酸化は lipid rafts 内でも外でも生じるが、そのリン酸化過程は異なる可能性が指摘できる。

T 細胞依存性の反応において、B 細胞表面の CD40 と活性化 T 細胞上の CD40 リガンドとの結合が、B 細胞の生存、活性化、分化に重要である。そこで B 細胞の抗原受容体と CD40 を同時に刺激した際の、CD19 のリン酸化パターンを

解析した。抗 CD40 抗体刺激単独では CD19 のいずれのチロシンもリン酸化されなかった。抗 IgG 抗体単独刺激と比較して、抗 CD40 抗体と抗 IgG 抗体で共刺激すると 3 つのチロシン基はいずれも有意に強いリン酸化がみられた。さらに抗 IgG 抗体単独刺激では 600 秒後には、CD19 のチロシンリン酸化が減弱するのに対し、抗 CD40 抗体と抗 IgG 抗体の共刺激後は、リン酸化が遷延することが示された。こうした共刺激後のリン酸化の増強は、PP2 の前処置によりみられなくなるが、piceatannol の前処置ではほとんど影響がないことから、BCR と CD40 の共刺激による CD19 のチロシンリン酸化の増強、遷延は、Src ファミリー PTKs、特に Lyn によるものと考えられる。共刺激で CD19 のチロシンリン酸化が増強、遷延し、それにより Lyn がより多く、かつ長く動員されると予想され、そのために B 細胞内へと活性化シグナルがより増強されて伝わっていくものと考えられる。

B 細胞はリポ多糖類(LPS)による刺激でも活性化し、増殖や IgM 産生をおこすことが知られる。B 細胞上の LPS の受容体としては Toll-like receptor 4 (TLR4)と RP105(CD180)が知られており、LPS 刺激は、BCR を介さない。3 種類の CD19 リン酸化特異抗体を用いて、LPS 刺激後の CD19 チロシンリン酸化パターンを検討したところ、BCR 刺激と異なり、3 つのチロシン基ともかなり緩徐にリン酸化が始まり、同じような推移で進行し、かなり遷延してリン酸化がみられることが示された。

以上より CD19 のチロシンリン酸化パターンは、様々な刺激に対して異なる。CD19 のチロシンリン酸化パターンの多様性は、外界刺激に対する反応を質的、量的に変えていると考えられる。