

審査の結果の要旨

氏名 石浦信子

本研究は、免疫システムにおいて重要な役割を担う B 細胞の機能を調整する CD19 分子に注目し、そのシグナル伝達機構を解析したものである。CD19 の細胞内領域の 9 つのチロシン基のうち、CD19 の働きにおいて特に重要とされる、Y⁵¹³、Y⁴⁸² および Y³⁹¹ の 3 つのリン酸化チロシン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、下記の結果を得ている。

1. リン酸化チロシン基を含む部分のペプチドを合成し、ウサギに 5 回免疫した後、採取した血清より CD19-pY⁴⁸² 抗体と CD19-pY³⁹¹ 抗体を得た。これら 2 種の抗体と、購入した CD19-pY⁵¹³ 抗体を、それぞれ ELISA 法および slot blot 法にて解析し、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確認した。
2. これらの CD19 リン酸化チロシン特異抗体を用いて、B 細胞受容体 (BCR) 刺激後の CD19 のリン酸化パターンを Western blotting 法にて解析した。マウス脾 B 細胞を F(ab')₂ 抗マウス IgM 抗体で刺激した場合も、マウス B 細胞系列 A20 細胞を F(ab')₂ 抗マウス IgG 抗体で刺激した場合も、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緩徐であった。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。
3. Src ファミリーチロシンキナーゼの活性を阻害する PP2 で前処置してから BCR 刺激すると、3 つのチロシン基とも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。BCR 刺激によ

る CD19 のチロシンリン酸化において、Src ファミリーチロシンキナーゼが、不可欠であることが示された。

4. BCR 刺激において、BCR のアイソタイプによって CD19 のチロシンリン酸化パターンが異なることが明らかになった。B 細胞系列 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 λ 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 2a λ 細胞の CD19-Y⁵¹³ は、K46 $\mu\lambda$ 細胞の CD19-Y⁵¹³ よりも速くチロシンリン酸化され、K46 γ 2a λ 細胞の CD19-Y⁴⁸² と CD19-Y³⁹¹ は、K46 $\mu\lambda$ 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起こり、CD19-Y⁴⁸² と CD19-Y³⁹¹ はより強くリン酸化されることが示された。
5. 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。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。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ことが示された。BCR 刺激がおけると、CD19 のいずれのチロシンもリン酸化されるが、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、BCR 刺激による CD19 のチロシンリン酸化は lipid rafts 内でも外でも生じているが、そのリン酸化過程は異なる可能性が考えられた。
6. 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。BCR 単独刺激と比較して、CD40 と BCR を共刺激すると 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、さらに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 ファミリーチロシンキナーゼによるこ

とが示された。

7. **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、かつ遷延してリン酸化がみられることが示された。

以上、本論文は、マウス **B** 細胞において、**CD19** のチロシンリン酸化パターンが刺激の種類によって異なることを明らかにした。**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 **B** 細胞の反応を質的、量的に変えていると考えられ、**B** 細胞の機能解析に貢献するといえる。またこれまで一定の見解が得られていない、**B** 細胞上の **CD19** の分布や、lipid rafts 内外での **CD19** のリン酸化パターンに関しても新しい知見を示し、学位の授与に値するものと考えられる。