



Cross-linking of the B Cell Receptor Induces Activation of Phospholipase D through Syk, Btk and Phospholipase C- γ 2

人見, 知洋

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1961

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001961>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	ひと み とも ひろ 人 見 知 洋	（岡山県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1205号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成11年3月31日	
学位論文題目	Cross-linking of the B Cell Receptor Induces Activation of Phospholipase D through Syk, Btk and Phospholipase C- γ 2 （B細胞抗原受容体の架橋により引き起こされ、Syk, Btk, ホスホリパーゼ C- γ 2を介するホスホリパーゼDの活性化機構）	
審査委員	主査 教授 山村 博 平 教授 吉 川 潮	教授 中 村 俊 一

論文内容の要旨

論文内容の要旨

I. 序文

抗原あるいは抗 IgM 抗体により B 細胞抗原受容体（BCR）が刺激を受けると、プロテインチロシンキナーゼ（PTK）の活性化やイノシトールリン脂質の代謝回転，Ras 経路の活性化等が引き起こされる。この中で，3つの異なったファミリーに属する非受容体型 PTK である Lyn, Syk, Btk の活性化が最初に生じ，BCR からの情報伝達に重要な役割を演じているが，それぞれの酵素がチロシンリン酸化する基質は同一ではない。Ras 経路のアダプター蛋白である Shc は，Lyn と Syk によりリン酸化されるが，ホスホリパーゼ C（PLC）- γ 2 は Syk と Btk によりリン酸化される。PLC- γ 2 はチロシンリン酸化されると酵素活性が上昇し，イノシトールリン脂質の加水分解を触媒し，結果として細胞内カルシウム濃度の上昇とプロテインキナーゼ C（PKC）の活性化が起こる。

一方，様々な細胞外シグナルに反応して起こるホスホリパーゼ D（PLD）の活性化が多くの細胞，組織で観察されており，PLD はコリンリン脂質をフォスファチジン酸（PA）とコリンに加水分解することで情報伝達系において重要な役割を演じているのである。PA は多くの情報伝達系蛋白の制御に関わるセカンドメッセンジャーである。PLD の重要性はよく言及されているが，その活性化の制御は非常に複雑で明らかにされていない。PKC や低分子量 G 蛋白質の ARF や RhoA は，in vitro の実験や細胞実験で PLD の活性化因子として知られており，更に多くの阻害剤を使った実験で，その活性化には PTK，フォスファチジルイノシトール 3 キナーゼ（PI3-K），三量体 G 蛋白質，PLC などが関与していると報告されているが，どのような情報伝達の中で PLD の活性化が引き起こされるのか，その経路は明確に定義されていない。

DT40 という B 細胞系は頻りに相同組換えを起こすことから，ジーンターゲット法にて，Lyn, Syk, Btk, PLC- γ 2 等，それぞれの欠損細胞が確立されている。我々は PLD の活性化が BCR の刺激で生じることをこの細胞系で見出したので，これらの遺伝子株を使って BCR からの PLD 活性化経路を解析した結果，Syk, Btk, PLC- γ 2 が PLD 活性化に必須であるとの結果を得た。この論文はまた BCR

からの情報伝達に PLD が関与していると言う初めての報告でもある。

II. 方法

Lyn, Syk, Btk, PLC- γ 2 それぞれの欠損細胞と、各々の遺伝子を欠損細胞に発現し戻した細胞は、以前樹立されたものを使用した。抗ニワトリ IgM モノクローナル抗体 (M4) は、この抗体を産生するハイブリドーマの培養液中より精製した。阻害剤を含む各種試薬は購入した。

PLD 活性の測定は以下のように行った。10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI1640 培地で培養した DT40 細胞を、 $[^{14}\text{C}]$ リゾフォスファチジルコリン (リゾ PC) にて 37°C , 1 時間標識し ($0.25\mu\text{Ci} / 1 \times 10^7$ 個), PBS で 2 回洗浄した後, 37°C , 30 分間, 1 % エタノール, $6\mu\text{g}/\text{ml}$ の M4 を含み FCS を含まない RPMI1640 培地で刺激した。Bligh and Dyer 法にて抽出した脂質を薄層クロマトグラフィー (TLC) にて酢酸エチル:トリメチルペンタン:酢酸:水=13:2:3:10 (上清) の展開液で分離し、全体に対するフォスファチジリエタノール (PEt) の産生画分をオートラジオグラフィーで測定し、% として酵素反応の強さを表示した。阻害剤の使用時は、M4 による刺激の前に 37°C , 20 分間それぞれ処理した。

ノーザンブロットによる解析は以下のように行った。DT40 細胞より RT-PCR 法で得られた DNA を鋳型とし、ヒト PLD 1 のうち種差なくよく保存されている部分から作成されたプライマーを使い、PCR 法でニワトリ PLD 1 の cDNA を得た。この cDNA をプローブとし、各種の DT40 細胞から得られた RNA との結合を調べた。

III. 結果と考察

PLD はコリンリン脂質を加水分解し PA とコリンを産生するが、一級アルコールの存在下ではフォスファチジル基転移反応が進み、フォスファチジルアルコールを産生する。このフォスファチジル基転移反応は PLD に特有で、この酵素反応の特異的検出に用いられる。我々は、 $[^{14}\text{C}]$ リゾ PC で標識された DT40 細胞をエタノール存在下で M4 にて刺激した。TLC による解析で時間経過と共に PEt の産生が増加するのが確認された。これは BCR 刺激で PLD が活性化されたことを意味する。Pet 産生は BCR 刺激後 3 分以内に始まり 10 分でプラトーに達した。BCR 刺激後、3 種類の違ったファミリーに属する非受容体型 PTK の Lyn, Syk, Btk が 3 分以内に活性化されるが、PLD はこれら PTK の活性化にわずかに遅れて活性化すると考えられた。M4 の濃度は $4 \sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ で PLD を最大限活性化したが、これは 3 種類の PTK を活性化する濃度と同様であった。そこで PLD の活性化は PTK の活性化により引き起こされるのではないかと考え、PTK 阻害剤であるエルブスタチンアナログを使うと PLD の活性化が完全に抑制された。

更にどの PTK がこの活性化に関与しているかを調べるため、Lyn, Syk, Btk それぞれの欠損細胞を M4 で刺激したところ、Syk 欠損細胞と Btk 欠損細胞では PLD の活性化が完全に消失した (Syk, Btk を発現し戻した細胞では活性化が回復した)。しかし Lyn, 欠損細胞は野性株と同様だった。BCR からこれらの PTK の活性化に引き続いておこる情報伝達系で、Ras 経路と PLC- γ 2 の経路がよく知られている。Lyn 欠損細胞では Ras 経路が機能しないことが以前の研究で知られており、我々の結果からは、BCR からの PLD 活性化経路に Src ファミリーの Lyn は無関係のようで、すなわち Ras 経路の活性化は必要ないようである。繊維芽細胞において v-Src が Ras 経路を経由して PLD を活性化するという報告があったが、BCR からの PLD 活性化これと違うようである (DT40 細胞は Src ファミリーとして Lyn のみ発現している)。これに対して PLC- γ 2 活性は Syk, Btk の共役により制御されており、Lyn 欠損細胞ではこの活性が影響を受けないが、Syk, Btk それぞれの欠損細胞では完全に活性が消失する。そこで PLC- γ 2 欠損細胞において BCR を刺激し PLD 活性を測定したところ完全に消失し

た。(PLC- γ 2を戻した細胞では活性が回復した)。この結果、Lynは無関係にSyk, BtkがPLC- γ 2を活性化し、続いてPLDが活性化されたと考えられた。ノーザンブロットによる解析では各欠損細胞のPLD 1 mRNAの発現量とPLD活性化能に相関は見られなかった。

PLC- γ 2が活性化されるとイノシトールリン脂質の代謝回転が生じ、PKCが活性化される。BCRからのPLD活性化に対するPKCの関与を調べるため、PKC阻害剤であるビスインドリルマレイミドを10 μ M使用するとPLD活性化はほぼ制御され、PKCの活性化も関与していると考えられた。in vitroの実験ではPKC α がPLDを活性化する時にキナーゼドメインを必要としないが、BCRからのPLD活性化にはPKCの活性化が必要と思われた。近年PKC μ やPKC β がBCRの下流で機能しているとの報告が出始めている。

他の細胞系でのPLD活性化におけるPTKの関与については様々な説がある。例えば血小板由来増殖因子(PDGF)受容体刺激ではPLC- γ とPKCの活性化が必要とされ、T細胞受容体(TCR)刺激ではPTKやPKCの阻害剤でPLDの活性化が抑制された等の報告がある。これらはPTK, PLC- γ , PLD経路の存在を支持するが、一方、同じTCR刺激でイノシトールリン脂質の代謝回転が生じないとの報告や、マスト細胞での幹細胞因子(SCF)刺激におけるPLD活性化時にPLCの活性化が見られない、単球におけるFc γ 受容体IからのPLD活性化にPLCは無関係、等の報告もある。しかし我々は、BCRからのPLD活性化がSyk, Btk, PLC- γ に依存することを明確に提示できた。

PLDは幅広く増殖シグナルに関与していると言われている。というのもその酵素反応の産物であるPAが、がん原遺伝子のc-fos, c-mycの発現を誘導できるからである。DT40細胞においてもBCR刺激時にc-mycの発現が観察されるが、Syk, やPLC γ 2欠損細胞では発現が見られない。またごく最近、BCRからの増殖シグナルにともなう、フォスファチジルイノシトールを特異的基質とすると考えられるPLDの存在の可能性が報告され(実体は全くはっきりしてない)、DT40細胞でも我々はPLD阻害剤であるブタノールによるアポトーシスの誘導を観察した。これらはPLDの増殖シグナルへの関与を支持するが、一方この細胞はBCR刺激でアポトーシスを起こすことが知られており、PLDが細胞死に関与している可能性も否定はできない。このようにBCRからのPLD活性化の意義については現在明らかになっていない。

我々は現在DT40細胞においてPLD欠損細胞の作成を試みている。この細胞は、BCRからのPLD活性化の意義を解明することを含めたPLDの機能解析において非常に有用であると期待される。

論文審査の結果の要旨

抗原あるいは抗IgM抗体によりB細胞抗体受容体(BCR)が刺激を受けると、まず最初に3つの異なるファミリーに属する非受容体型チロシナーゼLyn, Syk, Btkの活性化が生じる。その後Ras経路のアダプター蛋白であるShcは、LynとSyk, によりチロシンリン酸化され、ホスホリパーゼC(PLC)- γ はSykとBtkによりチロシンリン酸化される。活性化されたPLC- γ は、イノシトールリン脂質の加水分解を触媒し、その結果、細胞内カルシウム濃度の上昇とプロテインキナーゼC(PKC)の活性化が生じる。

一方、ホスホリパーゼD(PLD)の活性化が多くの細胞、組織で観察されている。PLDはコリンリン脂質をフォスファチジン酸(PA)とコリンに加水分解することで情報を伝達するが、PLDの活性化の制御は非常に複雑である。PKCや低分子量G蛋白質のARFやRhoA, 更にチロシナーゼ, P13キナーゼ, 三量体G蛋白質, PLCなどがその活性化に関与するといわれているが、その活性化経

路は明確にされていない。

DT40というB細胞系で、Lyn, Syk, Btk, PLC- γ 2等、それぞれの欠損細胞が確立されている。本研究は、この細胞系でBCRの刺激によりPLDの活性化が生じることを見出し、これらの欠損細胞を使ってBCRからのPLD活性化経路を解析している。

PLDは、一級アルコールの存在下ではフォスファチジル基転移反応を触媒する。この転移反応はPLDに特有で、PLD活性の特異的検出に用いられる。本研究では、エタノール存在下において抗ニワトリIgMモノクローナル抗体(M4)でDT40細胞を刺激し、フォスファチジルエタノールの産生を指標としてPLDの活性化を観察している。M4は4~10 μ g/mlの濃度でPLDを最大限活性化し、これはLyn, Syk, Btkを活性化する濃度と同様であるため、本申請者はPLDがチロシンキナーゼの下流で活性化されるのではないかと考えた。

そこで、本申請者はチロシンキナーゼ阻害剤のエルブスタチンアナログを使用し、PLDの活性化が完全に抑制されることを観察した。更にどのチロシンキナーゼがPLDの活性化に関与しているかを調べており、Lyn, Syk, Btkそれぞれの欠損細胞をM4で刺激し、Syk欠損細胞とBtk欠損細胞におけるPLD活性化の消失を観察している。しかしLyn欠損細胞では野性株と変化がない。これら非受容体型チロシンキナーゼの活性化に引き続き、Ras経路とPLC- γ 2の経路が活性化されることがよく知られているが、Lyn欠損細胞ではRas経路が機能しないことから、本申請者はBCRからのPLD活性化経路にRas経路の活性化は必要ないと結論付けている。

これに対しPLC- γ 2活性はSyk, Btkの共役により制御されているため、本申請者はPLC- γ 2欠損細胞においてBCRを刺激し、PLD活性化の消失を観察している。結果として本申請者は、Lynとは無関係にSyk, BtkがPLC- γ 2を活性化し、続いてPLDが活性化されたと考えた。

PLC- γ 2が活性化されるとイノシトールリン脂質の代謝回転が生じ、PKCが活性化される。本研究ではBCRからのPLD活性化に対するPKCの関与も調べており、PKC阻害剤であるビスインドリルマレイミドを使用する事でPLD活性化が抑制されるため、PKCの活性化も関与していると結論付けている。

PLDは幅広く増殖シグナルに関与しているといわれるが、それはPAがc-fos, c-mycの発現を誘導するからである。DT40細胞でもBCR刺激時にc-mycが発現するが、SykやPLC- γ 2欠損細胞では発現が見られない。またこの細胞はPLD阻害剤であるブタノールによりアポトーシスが誘導されることを本申請者は見出ししている。これらはPLDの増殖シグナルへの関与を支持するが、一方この細胞はBCR刺激でアポトーシスを起こすことが知られており、PLDが細胞死に関与している可能性も否定できない。このようにBCRからのPLD活性化の意義については本申請者の今後の課題とすべきであろう。

本研究はBCRからの情報伝達にPLDが関与しているという初めての報告であり、またその活性化経路にチロシンキナーゼSyk, BtkやPLC- γ 2が関与していることを分子レベルで明らかにした。そこで本研究はB細胞におけるPLD研究に道を開くと共にPLDの複雑な活性化のメカニズムの解明につながる重要な知見を得たものとして価値のある業績であると認める。よって、本申請者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。