



Antibodies Directed against ZAP-70 Cross-React with a 66kDa Tyrosine Kinase in the Rat Brain

米谷, 博秀

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2018

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002018>

※ 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) | よね や ひろ ひで 米 谷 博 秀 | (青森県) |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) | |
| 学位記番号 | 博い第1241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9月30日 | |
| 学位論文題目 | Antibodies Directed against ZAP-70 Cross-React with a 66 kDa Tyrosine Kinase in the Rat Brain ¹ (抗 ZAP-70抗体により認識されるラット脳66kDa チロシンキナーゼ) | |
| 審査委員 | 主査 教授 天津 睦 朗 教授 山村 博 平 教授 中 村 俊 一 | |

論 文 内 容 の 要 旨

1. 序文

多くの細胞において、増殖、分化に関する情報伝達にチロシンキナーゼは重要な役割を果たしている。免疫系においては、抗原受容体からの情報伝達に、2種類のチロシンキナーゼ、Src および Syk ファミリーチロシンキナーゼが必須である。Src ファミリーチロシンキナーゼと違い、Syk ファミリーチロシンキナーゼである Syk, ZAP-70は、ふたつの SH 領域を持ち、また、膜結合領域を持たない。常染色体劣性遺伝である重症複合免疫不全症患者に ZAP-70の欠損が認められることや ZAP-70ノックアウトマウスの所見より、T細胞の発達、分化、機能において ZAP-70は重要な役割を果たしていることが明かとなった。

神経系では、細胞接着分子、細胞外基質、神経栄養因子が軸策誘導に関する細胞内情報伝達に関与し、さらに、チロシンキナーゼが、細胞内情報伝達に関与していることが明らかになってきている。これまでのところ、神経細胞では Src ファミリーチロシンキナーゼの高発現が認められるが、ZAP-70は、T細胞をはじめ、免疫系に特異的に発現していると考えられてきた。

今回我々は、発達中の神経細胞における ZAP-70類似のチロシンキナーゼの特異的な発現とその生物学的意義について若干の考察を加えて報告する。

2. 方法

実験には SD ラットを使用した。ノーザンブロット法を用いて、種々の臓器での ZAP-70の mRNA の発現を解析した。チオサイアネート法により RNA を抽出後、1.2%ホルムアルデヒドゲルで電気泳動を行い(全 RNA 量20 μ g), Hybond-N メンブレン (Amersham 社) に転写し、プローブとして³²P で標識したラット ZAP-70 cDNA, コントロールとして β -アクチン cDNA を用いて解析した。

次に、抗 ZAP-70ポリクローナル抗体 (Santa Cruz 社) , 抗体認識部位の合成ペプチド (Santa Cruz 社) を用いてウェスタンブロット法による解析を行った。脳および胸腺の全懸濁液 (10 μ g) を10%SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ImmobilonP メンブレン (Millipore 社) へ転写した。

続いて、脳の全懸濁液を100,000 \times g で10分間遠心し、上清を抗 ZAP-70抗体で免疫沈降した後、

免疫沈降物を反応液 (100mM HEPES/NaOHpH8.0, 10 μ M Na₂VO₄, 50mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 50 μ M ATP)中で、10分間30 $^{\circ}$ Cでインキュベートしてチロシンリン酸化反応を行った。この反応液を10%SDS-ポリリアクロンアミドゲルで電気泳動し、ImmobilonP メンブレンへ転写し、抗リン酸化チロシン抗体 4 G10 (Upstate Biotechnology 社) で解析した。

3. 結果

免疫系における ZAP-70 mRNA の高発現：ラットの種々の臓器における ZAP-70 mRNA の発現を、ラット ZAP-70 cDNA をプローブとして、ノーザンブロット法で解析した。胸腺では高発現が認められたが、脳では発現が認められず、神経系では ZAP-70 mRNA は発現していないことが示唆された。

脳における ZAP-70類似の蛋白質の発現：ラット脳における ZAP-70類似の蛋白質の発現を、4種類の抗 ZAP-70抗体 (Ab 1～4) を用いて、ウェスタンブロット法で解析した。脳では、Ab 1, Ab 2, Ab 3 によって66kDa の蛋白質が認識され、特に、リンカー領域に対する抗体 Ab 2 (326-343) とキナーゼ領域に対する抗体 Ab 3 (485-499) で強く認識された。しかし、C 末端にたいする抗体 Ab 4 (600-618) では全く認識されなかった。また、この蛋白質と Ab 2, Ab 3 の結合は、低濃度 (1 μ M) の Ab 2, Ab 3 認識部位の合成ペプチドによって完全に阻害された。以上より、この66kDa 蛋白質は、ZAP-70と類似した構造を持つことが示唆された。

66kDa 蛋白質のキナーゼ活性：Ab 3 を用いた免疫沈降法、抗リン酸化抗体 4 G10を用いたウェスタンブロット法で66kDa 蛋白質のキナーゼ活性を解析した。この66kDa 蛋白質はチロシンキナーゼ活性を持ち、また自己リン酸化能も認められた。しかしながら、Syk や ZAP-70に比べ、チロシンキナーゼ活性は低く、不活化された状態で存在していると考えられた。以上より、この66kDa 蛋白質は、中枢神経系に発現している ZAP-70類似のチロシンキナーゼであることが示唆された。

66kDa チロシンキナーゼの発現時期と部位：66kDa チロシンキナーゼの脳の発達に伴う発現量の変化と、各臓器における発現を、Ab 3 を用いたウェスタンブロット法で解析した。ラット脳での66kDa チロシンキナーゼの発現は、生後3週前後で最大となり、以後減少していった。また、生後3週の脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、肺では、脳にのみ高発現を認めた。以上より、この66kDa チロシンキナーゼは主として中枢神経系に発現していることが示唆された。

4. 考察

今回我々は、ZAP-70類似の66kDa チロシンキナーゼが、発達段階にある神経細胞において特異的に発現していることを報告した。ZAP-70がT細胞の分化、増殖に関する細胞内情報伝達に重要な役割を果たしていることにより、この66kDa チロシンキナーゼが、中枢神経系に発現していることの生物学的意義は重要であると考えられる。

現在までに、Src ファミリーチロシンキナーゼが、血球系細胞と中枢神経系細胞の両方に発現し、細胞内情報伝達に関与していることや、神経系の細胞自体が、免疫系と同様のサイトカインを産生し、中枢神経系においてもサイトカインネットワークが存在することが明らかになっている。以上のことから、中枢神経系にも免疫系と類似した制御機構が存在し、そのなかで新規の Syk ファミリーチロシンキナーゼが重要な役割を果たしていることが予想される。

免疫系においては、Syk ファミリーチロシンキナーゼは、標的分子内に存在する tyrosine activated motifs (TAMs) のふたつのリン酸化されたチロシン残基に、ふたつの SH2 領域を介して結合する。したがって、中枢神経系でもふたつの TAMs を持つ新しい分子が存在すると考えられている。ラット脳に発現しているふたつの TAMs を持つ分子、BIT がすでに報告されているが、BIT は SHP-2 の

標的分子であり、Syk ファミリーチロシンキナーゼの標的分子ではないと考えられている。中枢神経系に発現する Syk ファミリーチロシンキナーゼの標的分子の解明には、さらなる解析が必要である。

今回報告した66kDa チロシンキナーゼは、生物学的に如何なる役割を果たしているのであろうか。ラット脳の発達段階で、生後3週前後で発現量が最大となり、以後減少している。また、現在解析中ではあるが、神経細胞の成長円錐分画で、このチロシンキナーゼの活性が高く認められている。以上のことから、このチロシンキナーゼは、成長円錐の進展に関与している可能性も示唆される。軸策突起の成長を誘導する L1, NCAM からの細胞内情報伝達では、Src ファミリーチロシンキナーゼである pp60c-src, p59fyn が、成長円錐において活性化されていることが報告されている。したがって免疫系と同様に、中枢神経系においても、構造的に異なったふたつのチロシンキナーゼである Src ファミリーチロシンキナーゼと Syk ファミリーチロシンキナーゼが、神経細胞の接着分子からの情報伝達に関与しているのではないかと考えられる。

論文審査の結果の要旨

1. 序文

多くの細胞において、増殖、分化に関する情報伝達にチロシンキナーゼは重要な役割を果たしている。免疫系においては、抗原受容体からの情報伝達に、2種類のチロシンキナーゼ、Src 及び Syk ファミリーチロシンキナーゼが必須であり、Syk ファミリーチロシンキナーゼである ZAP-70は T 細胞の発達、分化、機能において重要な役割を果たしている。

神経系では、細胞接着分子、細胞外基質、神経栄養因子が、軸策誘導に関する細胞内情報伝達に関与し、さらに、チロシンキナーゼが、細胞内情報伝達に関与していることが明らかになってきている。これまでのところ、神経細胞では Src ファミリーチロシンキナーゼの高発現が認められているが、ZAP-70は、T 細胞をはじめ、免疫系に特異的に発現していると考えられてきた。

今回申請者は、発達中の神経細胞における ZAP-70類似のチロシンキナーゼの特異的な発現と、その生物学的意義について若干の考察を加えて報告する。

2. 方法

実験には SD ラットを使用した。

ノーザンブロット法を用いて、種々の臓器での ZAP-70の mRNA の発現を解析した。

次に、抗 ZAP-70ポリクローナル抗体を用いて、脳の全懸濁液を、ウェスタンブロット法を用いて解析した。

続いて、脳の全懸濁液を円心分離し、上清を抗 ZAP-70抗体で免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体 4 G10を用いて、免疫沈降物の自己リン酸化反応を解析した。

3. 結果

ZAP-70mRNA は、胸腺では高発現が認められたが、脳では発現が認められず、免疫系では ZAP-70mRNA が高発現しているが、神経系では発現していないことが示唆された。

ラット脳における ZAP-70類似の蛋白質の発現を、4種類の抗 ZAP-70抗体を用いて、ウェスタンブロット法で解析した。3種類の抗体により66kDa の蛋白質が認識され、特に、リンカー領域とキナーゼ領域に対する抗体で強く認識された。しかし、C 末端にたいする抗体では全く認識されなかった。以上より、この66kDa 蛋白質は、ZAP-70と類似した構造を持つことが示唆された。さらに、この66kDa 蛋白質は、チロシンキナーゼ活性、自己リン酸化能を有することが認められた。以上より、

この66kDa蛋白質は、中枢神経系に発現しているZAP-70類似のチロシンキナーゼであると考えられた。

また、この66kDaチロシンキナーゼの発現量は、生後3週で最大となり、以後減少し、また、生後3週の脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、肺では、脳にのみ高発現を認めた。以上より、この66kDaチロシンキナーゼは主として中枢神経系に発現していることが示唆された。

4. 考察

今回我々は、ZAP-70類似の66kDaチロシンキナーゼが、発達段階にある神経細胞において特異的に発現していること報告した。

現在までに、Srcファミリーチロシンキナーゼが、血球系細胞と中枢神経系細胞両方の細胞内情報伝達に関与していることや、中枢神経系においても免疫系と同様のサイトカインネットワークが存在することが明らかになっている。以上のことから、中枢神経系にも免疫系と類似した制御機構が存在し、その中で新規のSykファミリーチロシンキナーゼも重要な役割を果たしていることが予想される。

今回報告した66kDaチロシンキナーゼは、ラット脳の発達段階において、生後3週前後で発現量が最大となり、以後減少している。また、現在解析中ではあるが、神経細胞の成長円錐分画で、このチロシンキナーゼの活性が高く認められることにより、成長円錐の進展に関与している可能性も考えられる。軸索突起の成長を誘導するL1、NCAMからの細胞内情報伝達では、Srcファミリーチロシンキナーゼが、成長円錐において活性化されることが報告されており、免疫系と同様に、中枢神経系においても、構造的に異なったふたつのチロシンキナーゼであるSrcファミリーチロシンキナーゼとSykファミリーチロシンキナーゼが、神経細胞の接着分子からの情報伝達に関与しているのではないかと考えられる。

以上本研究は、中枢神経内の細胞内情報伝達機構におけるチロシンキナーゼの存在についてラットを用いて研究したものであるが、従来知られていなかった、抗ZAP-70抗体によって認識される新しいチロシンキナーゼの存在が示唆された点、価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。