



## CD45 Modulates Phosphorylation of Both Autophosphorylation and Negative Regulatory Tyrosines of Lyn in B cells

柳，茂

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1997-07-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2147

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002147>

※ 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)	やなぎ 柳	しげる 茂	(大韓民国)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)		
学位記番号	博ろ第1585号		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位授与の日付	平成9年7月9日		
学位論文題目	CD45 Modulates Phosphorylation of Both Autophosphorylation and Negative Regulatory Tyrosines of Lyn in B cells. (CD45はB細胞においてLynチロシンキナーゼの自己リン酸化部位および負の活性制御部位の両方のリン酸化を調節する)		
審査委員	主査教授 山村博平 教授 片岡徹 教授 中村俊一		

### 論文内容の要旨

#### 緒言

B細胞抗原受容体(BCR)と抗原が反応すると抗原や細胞分化段階などの相違により、最終的に細胞増殖、分化、あるいは細胞死が観察される。このシグナル伝達に重要な役割を担っているチロシンリン酸化反応は、チロシンキナーゼとチロシンホスファターゼにより可逆的に制御されている。したがって、B細胞の制御機構を理解するにはチロシンキナーゼのみならずチロシンホスファターゼからの解析が不可欠である。我々はこの点に注目して、BCRのシグナル伝達に関与しているチロシンホスファターゼについての研究を進めた。

CD45はBCRを介する情報伝達に重要な役割が示唆されている受容体型チロシンホスファターゼであり、LynなどのSrcファミリーチロシンキナーゼを基質とすることが推察されている。しかしながら、その詳細なメカニズムは未だ不明なところが多い。そこで我々は、ニワトリB細胞株(DT40)より遺伝子相同組換法を用いてCD45欠損変異株を樹立し、機能を解析した。

#### 方法

##### 1. CD45欠損変異株の樹立

ニワトリのCD45のcDNA断片をプローブとしてニワトリのゲノムライブラリーよりCD45のゲノム(8kb)をクローニングした。このゲノムを用いてNeoおよびHisDの耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターを構築した。まず最初にpCD45-Neoターゲティングベクターをエレクトロポレーション法(550V, 25mF)によりDT40細胞(野生株)にトランスフェクションし、G418(2mg/ml)にてスクリーニングした。そして相同組換えを起こした耐性株を選択し、同様にpCD45-Hisターゲティングベクターをトランスフェクションし、Histidinol(2mg/ml)にてスクリーニングした。最終的にG418/histidinol耐性株よりCD45のゲノムが完全にターゲティングされたことをサザンプロット法により確かめて、CD45欠損変異株として実験に用いた。

##### 2. 免疫沈降法および試験管内活性測定

免疫沈降法はDT40細胞の粗抽出液から目的蛋白質（Lyn, Syk, Cbl）に対する特異的な抗体を加えて免疫複合体を形成させて、 Protein A-Sepharoseにて沈降、 単離した。試験管内チロシンキナーゼ活性測定はLynおよびSykの免疫沈降物に放射標識された $\gamma$ -P<sup>32</sup>-ATPを含む反応液を混ぜて振盪（30°C, 10min）したのちSDS-PAGEで分離し、 基質（エノラーゼ）へのリン酸化能および自己リン酸化能を検出し測定した。

### 3. TLCの二次元ペプチドマッピング

[<sup>32</sup>P]orthophosphateでDT40細胞を標識し、 Lynのチロシンリン酸化部位を、 免疫沈降、 SDS-PAGE, Immobilon膜への転写、 TPCK-トリプシンによる消化、 TLC上で二次元電気泳動、 薄層クロマトグラフィーによる展開の後、 オートラジオグラフィーにて検出した。

## 結果および考察

1. ニワトリB細胞株（DT40）より遺伝子相同組換え法を用いてCD45のゲノム遺伝子を特異的に破壊し、 CD45のmRNAの発現が全く認められないCD45欠損変異株を樹立した。また、 CD16/45のキメラ遺伝子を発現ベクターに組み込み、 CD45欠損変異株にトランスフェクションしてコントロール変異株を作製した。これらの変異株においてBCRの発現量には影響がないことをフローサイトメーターにより確認した。以上の結果よりこれらの変異株はBCRのシグナル伝達におけるCD45の役割を解析できる格好のモデルであると判断し、 以下の実験を進めた。

2. CD45欠損変異株におけるBCR刺激依存性の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇および蛋白質チロシンリン酸化反応について検討した結果、 両者は野生株に比べて著しく抑制されていた。この抑制効果はCD16/45のコントロール変異株ではほぼ完全に消失しており、 CD45は正常なBCR刺激依存性の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇および蛋白質チロシンリン酸化反応に必須であることが明らかとなった。さらに興味深いことにはCD45欠損変異株において観察されたこれらの現象はLyn欠損変異株で観察されたそれと極めて類似のパターンを示しており、 CD45とLynとの密接な関係が示唆された。

3. 上記の結果より、 まず我々は野生株とCD45欠損変異株におけるLynのチロシンリン酸化状態を比較検討した。その結果、 CD45欠損変異株におけるLynのチロシンリン酸化は静止時より亢進しており、 チロシンキナーゼ活性は著しく抑制されていた。チロシンキナーゼ活性の抑制効果を確かめるために、 Lynの特異的な生理的基質の1つと考えられているCblのBCR刺激依存性のチロシンリン酸化状態を調べた結果、 有意に抑制されていた。これらの結果より、 CD45はLynを特異的基質として脱リン酸化し、 Lynの活性化を正に制御していることが明らかとなった。一方、 BCR刺激によるSykの活性化はCD45欠損変異株においても野生株と同様に認められ、 CD45によりSykは影響をほとんど受けていないことが明らかとなった。

4. これまでの結果を総合的に判断するとCD45はLynのC末の負の活性制御部位を特異的に脱リン酸化し、 Lynの活性化を促進しているのではないかと推測された。そこで我々はCD45欠損変異株におけるLynのチロシンリン酸化部位を調べるために野生株とCD45欠損細胞を<sup>32</sup>Pで標識して、 それぞれLynを免疫沈降して単離し、 二次元ペプチドマップにて解析した。その結果、 驚いたことに静止時において野生株ではほとんどチロシンリン酸化が認められないのに対して、 CD45欠損細胞ではC末の活性制御部位のみならず自己リン酸化部位のチロシンリン酸化も著しく亢進していた。これらの結果はCD45がLynチロシンキナーゼの自己リン酸化部位および負の活性制御部位の両方の脱リン酸化に関与していることを意味する。C末の活性制御部位の脱リン酸化がLynの活性化およびBCRのシグナル伝達に重要な役割をしていると推測されるが、 自己リン酸化部位の脱リン酸化の意義も大変

興味深く、今後の重要な課題である。また、CD45がLyn以外の未知の基質を脱リン酸化し、BCRのシグナル伝達を制御していることも考えられ、今後の解析が待たれる。

#### 結語

1. CD45はBCR刺激による正常な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇および蛋白質チロシンリン酸化反応に必須である。
2. CD45はSykの活性化には影響を及ぼさないが、Lynの活性化には不可欠であり、自己リン酸化部位およびC末の活性制御部位の両方の脱リン酸化に関与する。
3. C末の活性制御部位の脱リン酸化がBCRを介するシグナル伝達に重要な役割をしていると推測されたが、自己リン酸化部位の脱リン酸化も何らかの役割をしていることが考えられる。
4. CD45欠損変異株の樹立により、今後、CD45の分子レベルにおけるより詳細な解析が可能となつた。

### 論文審査の結果の要旨

B細胞抗原受容体（BCR）と抗原が反応すると抗原や細胞分化段階などの相違により、最終的に細胞増殖、分化、あるいは細胞死が観察される。このシグナル伝達に重要な役割を担っているチロシンリン酸化反応は、チロシンキナーゼとチロシンホスファターゼにより可逆的に制御されている。したがって、B細胞の制御機構を理解するにはチロシンキナーゼのみならずチロシンホスファターゼからの解析が不可欠である。申請者はこの点に注目して、BCRのシグナル伝達に関与しているチロシンホスファターゼについての研究を進めた。CD45はBCRを介する情報伝達に重要な役割が示唆されている受容体型チロシンホスファターゼであり、LynなどのSrcファミリーチロシンキナーゼを基質とすることが推察されている。しかしながら、その詳細なメカニズムは未だ不明なところが多い。そこで申請者は、ニワトリB細胞株（DT40）より遺伝子相同組換法を用いてCD45欠損変異株を樹立し、その機能を解析した。

#### 方法

##### 1. CD45欠損変異株の樹立

ニワトリのCD45のcDNA断片をプローブとしてニワトリのゲノムライブラリーよりCD45のゲノム(8kb)をクローニングした。このゲノムを用いてNeoおよびHisDの耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターを構築した。まず最初にpCD45-Neoターゲティングベクターをエレクトロポレーション法(550V, 25mF)によりDT40細胞（野生株）にトランスフェクションし、G418(2mg/ml)にてスクリーニングした。そして相同組換えを起こした耐性株を選択し、同様にpCD45-Hisターゲティングベクターをトランスフェクションし、Histidinol(2mg/ml)にてスクリーニングした。最終的にG418/histidinol耐性株よりCD45のゲノムが完全にターゲティングされたことをサザンプロット法により確かめて、CD45欠損変異株として実験に用いた。

##### 2. 免疫沈降法および試験管内活性測定

免疫沈降法はDT40細胞の粗抽出液から目的蛋白質(Lyn, Syk, Cbl)に対する特異的な抗体を加えて免疫複合体を形成させて、Protein A-Sepharoseにて沈降、単離した。試験管内チロシンキナーゼ活性測定はLynおよびSykの免疫沈降物に放射標識された[<sup>32</sup>P]ATPを含む反応液を混ぜて振盪(30°C, 10min)したのちSDS-PAGEで分離し、基質(エノラーゼ)へのリン酸化能および自己

リン酸化能を検出し測定した。

### 3. TLCの二次元ペプチドマッピング

[32P]orthophosphateでDT40細胞を標識し, Lynのチロシンリン酸化部位を, 免疫沈降, SDS-PAGE, Immobilon膜への転写, TPCK-トリプシンによる消化, TLC上での二次元電気泳動, 薄層クロマトグラフィーによる展開の後, オートラジオグラフィーにて検出した。

#### 結果および考察

1. ニワトリB細胞株(DT40)より遺伝子相同組換え法を用いてCD45のゲノム遺伝子を特異的に破壊し, CD45のmRNAの発現が全く認められない

CD45欠損変異株を樹立した。また, CD16/45のキメラ遺伝子を発現ベクターに組み込み, CD45欠損変異株にトランسفエクションしてコントロール変異株を作製した。これらの変異株においてBCRの発現量には影響がないことをフローサイトメーターにより確認した。以上の結果よりこれらの変異株はBCRのシグナル伝達におけるCD45の役割を解析できるモデルであると判明した。

2. CD45欠損変異株におけるBCR刺激依存性の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇および蛋白質チロシンリン酸化反応について検討した結果, 両者は野生株に比べて著しく抑制されていた。この抑制効果はCD16/45のコントロール変異株ではほぼ完全に消失しており, CD45は正常なBCR刺激依存性の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇および蛋白質チロシンリン酸化反応に必須であることが明らかとなった。興味深いことにはCD45欠損変異株において観察されたこれらの現象はLyn欠損変異株で観察されたそれと極めて類似のパターンを示しており, CD45とLynとの密接な関係が示唆された。

3. 上記の結果より, 野生株とCD45欠損変異株におけるLynのチロシンリン酸化状態を比較検討した。その結果, CD45欠損変異株におけるLynのチロシンリン酸化は静止時より亢進しており, チロシンキナーゼ活性は著しく抑制されていた。チロシンキナーゼ活性の抑制効果を確かめるために, Lynの特異的な生理的基質の1つと考えられているCblのBCR刺激依存性のチロシンリン酸化状態を調べた結果, 有意に抑制されていた。これらの結果より, CD45はLynを特異的基質として脱リン酸化し, Lynの活性化を正に制御していることが明らかとなった。一方, BCR刺激によるSykの活性化はCD45欠損変異株においても野生株と同様に認められ, CD45によりSykは影響をほとんど受けていないことが明らかとなった。

4. これまでの結果からCD45はLynのC末の活性制御部位を特異的に脱リン酸化し, Lynの活性化を促進していると推測された。さらに申請者はCD45欠損変異株におけるLynのチロシンリン酸化部位を調べるために野生株とCD45欠損細胞を32Pで標識して, それぞれLynを免疫沈降して単離し, 二次元ペプチドマップにて解析した。その結果, 静止時において野生株ではほとんどチロシンリン酸化が認められないのに対して, CD45欠損細胞ではC末の活性制御部位のみならず自己リン酸化部位のチロシンリン酸化も著しく亢進していた。これらの結果はCD45がLynチロシンキナーゼの自己リン酸化部位および負の活性制御部位の両方の脱リン酸化に関与していることを意味する。C末の活性制御部位の脱リン酸化がLynの活性化およびBCRのシグナル伝達に重要な役割をしていると推測されるが, 自己リン酸化部位の脱リン酸化の意義も大変興味深い問題である。また, CD45がLyn以外の未知の基質を脱リン酸化し, BCRのシグナル伝達を制御していることも考えらる。本研究はCD45欠損変異株の樹立により, 今後, CD45の分子レベルにおけるより詳細な解析を可能とした, 大変価値ある研究であると考える。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。