



Title	Bruton's tyrosine kinase (Btk) と結合する新規分子の同定とその解析
Author(s)	松下, 正人
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40041">https://hdl.handle.net/11094/40041</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	松下正人
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13023号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Bruton's tyrosine kinase (Btk) と結合する新規分子の同定とその解析 Identification and characterization of a novel molecule (C15) which binds to Bruton's tyrosine kinase (Btk)
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三
	(副査) 教授 吉崎 和幸 教授 平野 俊夫

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

Btk (Bruton's tyrosine kinase) は非レセプター型チロシンキナーゼのひとつであり、ヒト伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia; XLA) およびマウスX染色体連鎖免疫不全症 (murine X-linked immunodeficiency: XID) における欠損遺伝子である。XLA患者においては、末梢血中の免疫グロブリンおよびB細胞が消失、あるいは著減しており、骨髄中のpre B細胞数の減少がみられる。このXLAの病態は、BtkはヒトB細胞の初期分化に必須の分子であることを示している。Btkは、その構造上の特徴から一つのサブファミリーを形成しており、その構造はC末端よりSH1ドメイン(キナーゼ活性を有する)、さらに他の分子と相互作用していると考えられている3つの領域、SH2ドメイン、SH3ドメイン及びN末端のユニーク領域(新規ドメインであるPHドメインが存在する)より成る。Btkの関与するシグナル伝達経路についてはいくつかの報告があるが、どのシグナル伝達経路がBtkに固有なものなのか、あるいはB細胞の分化増殖において他のキナーゼで代替できない経路は何であるのか、といった点については未だに明らかではない。これらの問題を直接的に解明する方法は、Btkと実際に相互作用している分子を同定、解析していくことであると考えられる。本研究では、BtkのSH3ドメインと結合する新規分子の同定、解析を行った。

#### 【方法ならびに成績】

ヒトBtkのSH3ドメインとglutathione-S-transferase(GST)との融合蛋白質をプローブとしてWest-western法によりヒト胎盤由来λgtllcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローナーのうち、結合が著明であり陽性クローナーの過半数を占める同一の遺伝子をコードしたクローナーをC15と呼び、以下の解析を行った。まず、C15遺伝子の全長を得る目的で各種cDNAライブラリーをスクリーニングし、最長のクローナーを得た。このクローナーは1338塩基よりなるORF、1302塩基の3'側非コード領域、poly A tail、及びpoly A付加シグナルをもつ(約49kDa)。GenBankデータ検索によると既知の分子で蛋白質として解析され報告された分子で同一のものは存在しなかった。ノザンプロットによると、C15は約3.0kbのmRNAであり組織分布は調べた全ての組織において発現が確認された。さらに、C15におけるBtkとの結合部位を同定することを目的として、C15分子の種々の断片とGSTとの融合蛋白質をglutathione-S-sepharoseビーズに結合させ、野生型Btkを発現した293T細胞抽出液とインキュベーションし、融合蛋白質とBtkとの結合を抗Btk抗体によるウェスタンプロットにより検出した。そ

の結果、C15はその約30アミノ酸を介してBtkと結合していることが明らかとなった。また、C15とBtkの結合様式を確認することを目的としてBtkのSH3ドメイン内のアミノ酸残基番号251番及び252番のtryptophanをleucineに置換した変異型Btk(Btk(WW25ILL))を作製し、上記と同様の方法により野生型Btkとの結合の差異を比較検討した。その結果、変異型Btkは野生型Btkに比して非常に微弱にしかC15との結合を示さなかった。変異させた残基は各種分子のSH3ドメインによく保存された残基であり、このことよりC15はSH3ドメインに存在する共通構造を介してBtkと結合していることが示された。次に、C15の他のSrcファミリーのキナーゼとの結合を確認することを目的として以下の実験を行った。C15のBtkとの結合部位を含む部分とGSTとの融合蛋白質をglutathione-S-sepharoseビーズに結合させ、Btk、Lyn、Lck、Fynそれぞれを発現している細胞の細胞抽出液とインキュベーションした後、 $\gamma$ - $^{32}$ PATPにてin vitro kinase assayを行った。Sampleを変性した後、各キナーゼに対する抗体により免疫沈降を行い、電気泳動後オートラジオグラフィーにより各キナーゼの活性を検出した。その結果、C15とGSTの融合蛋白質に結合して検出されたのはBtkのキナーゼ活性のみであった。このことより、C15はBtkに結合するが他のSrcファミリーのキナーゼ(Lyn、Fyn、Lck)とは結合しないことが示された。

#### 【総括】

本研究では、蛋白質間相互作用を利用してBtkのSH3ドメインと結合する新規分子C15を同定し、解析した。C15はBtkのSH3ドメインとのみ結合を示し、またC15はBtkのSH3ドメインに存在する保存された配列を介して結合することが示された。しかしながら、同定されたC15のSH3ドメイン結合部位には従来報告されているようなprolineに富むコンセンサス配列は存在しない。現在C15とBtkのSH3ドメインとの結合様式を核磁気共鳴吸収(NMR)法により解析中である。また、C15とGSTとの融合蛋白質を免疫することにより得られたC15に対するポリクローナル抗体を用いたウェスタンプロットによるとC15の分子量は約70kDaであり、ノザンプロットの結果ともよく符合する。このことは、今回得られた最長クローンよりさらに5'側にORFが続いていると考えられ、現在genomic DNAライブラリーにより完全長のC15の塩基配列決定を試みている。Btkの関与するシグナル伝達経路におけるC15の役割については現在全く不明であり、今後の大きな課題の一つである。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、蛋白質間相互作用を利用して、BtkのSH3ドメインに結合する新規分子を同定し、その組織分布、Btkに対する結合部位及び結合様式、他のSrc familyのチロシンキナーゼとの結合について検討したものである。この蛋白は、BtkのSH3ドメインにかなり特異的に結合し、またその結合部位には従来報告されているようなコンセンサス配列は存在しない。即ち、この蛋白はBtkの機能及びその関与するシグナル伝達に関する研究において、新しい展開を導くものであり、またこの蛋白のBtk-SH3ドメインへの結合様式を解析することは、構造生物学的研究にも新たな展開を生む可能性を有している。ひいては、Btkの機能不全により生じる免疫不全症の発症機序の解明に寄与することが期待される。よって、本研究は学位論文に値するものと認められる。