



Title	Bruton's tyrosine kinase (Btk) のSH3ドメイン結合 蛋白質SabによるBtk活性の制御
Author(s)	山鳥, 大材
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41655
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	山鳥大材
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14494号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Bruton's tyrosine kinase (Btk) の SH3 ドメイン結合蛋白質 Sab による Btk 活性の制御
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 吉崎 和幸 教授 仲野 徹

論文内容の要旨

【目的】

ブルトン型チロシンキナーゼ (Bruton's tyrosine kinase : Btk) はヒト伴性劣性無ガンマグロブリン血症およびマウスX染色体連鎖免疫不全症における欠損遺伝子であり、非レセプター型チロシンキナーゼのファミリーのひとつである Btk/Tec ファミリーに属する。このファミリーのチロシンキナーゼは、Src や Abl などと同様に SH3 ドメインを有する。これらの SH3 ドメインの生理的機能は未だ不明の部分が多いが、Src や Abl の SH3 ドメインに欠失や変異が起こると活性化して癌原性を持つことから、キナーゼ活性に対し抑制的な機能を持っていることが推定されている。

我々は、これまでに Btk の SH3 ドメインに結合する新規分子 Sab (SH3 domain binding protein which preferentially associates with Btk) を Far Western 法を用いて同定し報告した。Sab と Btk は SH3 ドメインに共通に保存された構造を介して結合しており、また、Sab は他の分子 (Lyn, Fyn, Lck, Src, PLC γ 2, PI3K, Grb2, Crk) の SH3 ドメインよりも、Btk の SH3 ドメインに対してより高い結合親和性を有していることが示された。

本研究は、Sab が Btk の活性を制御する結合分子 (トランスインヒビター) となり、B 細胞内のシグナル伝達へ抑制的な効果を与える可能性を検討し、Sab の生理的機能を解明することを目的とした。

【方法ならびに成績】

1) 細胞内共発現系における Sab と Btk の会合

T7タグ付きの Sab を 293T 細胞内で、野生型 Btk, SH3 変異 Btk (WW251LL), あるいはキナーゼ活性のない Btk (K430R) と共に発現させ、細胞内蛋白質抽出液を、抗 T7 抗体で免疫沈降し、共沈した Btk を抗 Btk モノクローナル抗体によるウエスタンプロットで検出した。Sab と WW251LL Btk との結合は、Sab と野生型 Btk との結合に比し極めて減弱しており、in vivo でも Btk が SH3 ドメインに保存された構造を介して Sab と結合することが示唆された。一方、K430R Btk と Sab との結合は野生型 Btk と Sab との結合に比して有意な差ではなく、本実験に使用した共発現系においては Sab と Btk の結合には Btk の活性あるいはそのリン酸化は関係ないことが示唆された。

2) Sab による Btk の活性の抑制

In vitro キナーゼアッセイを用いて Btk の活性が GST 融合 Sab 蛋白質を加えると抑制されることを示した。T7

タグ付き Btk を挿入した pApuro ベクターを 293T 細胞に導入して Btk 蛋白質を発現させ、Btk を抗 T7 抗体で免疫沈降し、 $\gamma^{32}P$ -ATP と基質ペプチドを加え、基質への ^{32}P の取り込みの量で Btk の活性を比較した。GST-Sab 蛋白質を反応液に加えると量依存的に Btk のキナーゼ活性が抑制された。

3) B 細胞における Sab の強発現は B 細胞レセプター (BCR) 刺激によって生じる初期シグナル伝達を抑制する。DT40 細胞に Sab の cDNA を導入し、CMV プロモーターで Sab 遺伝子を恒常に強発現させた。BCR のクロスリンク後に引き続いて起こる細胞内カルシウムの上昇レベルを Sab 強発現 DT40 細胞と野生型 DT40 細胞で比較したところ、Sab 強発現 DT40 細胞での上昇レベルは野生型の約 30% に減少していた。また、イノシトール 3 リン酸の生成を Sab 強発現 DT40 細胞と野生型 DT40 細胞で比較したところ、Sab 強発現 DT40 細胞では野生型に比して有意（約 60%）に減少していた。これらの結果は、B 細胞に Sab を強発現させることによって、BCR 経由の初期シグナル伝達が抑制されることを示している。

【総括】

In vivo の再構成実験では、Sab と Btk の結合は Btk の活性と無関係に起こっており、Sab と Btk は恒常に結合した状態で存在していると考えられた。

また、Btk のリン酸化能が GST 融合 Sab 蛋白質の添加により阻害されることから、Sab は Btk のキナーゼ活性を抑制することがわかった。Sab は Btk のトランスインヒビターであると考えられる。

BCR のクロスリンクに続いているカルシウムの動員とイノシトール 3 リン酸の生成が Sab 強発現 DT40 細胞では有意に減少した。これは Sab が BCR を介するシグナル伝達を阻害することを示している。

論文審査の結果の要旨

本研究は伴性劣性無ガンマグロブリン血症の欠損蛋白質である Btk の SH3 ドメインに結合する新規分子 Sab の機能について検討したものであり、特に Sab が Btk の活性に与える影響、B 細胞レセプター (BCR) を介するシグナル伝達に与える影響について検討している。In vitro キナーゼアッセイにおいて Btk の活性が Sab 蛋白質の添加により抑制されることを示し、また Sab を B 細胞に強発現させた系において BCR 刺激に引き続いて起こる Ca^{2+} の動員、イノシトールリン酸の生成が野生型の B 細胞に比し減少することを示している。Sab が Btk と特定の結合部位を介して直接結合することを変異 Btk を用いた細胞内再構成実験で確認し、Sab を Btk のトランスインヒビターと位置付けている。Btk のトランスインヒビターの存在に関してはこれまでに報告がなく、Sab の機能に関する報告としてもこれが初めてであり本研究は学位の授与に値すると考えられる。