



Title	BLNK mediates Syk-dependent Btk activation
Author(s)	馬場, 義裕
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43793">https://hdl.handle.net/11094/43793</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">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	馬 場 義 裕
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 8 5 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	BLNK mediates Syk-dependent Btk activation (BLNK 存在下で Btk は Syk によって活性化される)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川瀬 一郎  (副査) 教 授 吉崎 和幸    教 授 荻原 俊男

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

B細胞の分化障害による免疫不全疾患の代表的なものとして伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) が知られており、本邦で最も多い先天性免疫不全症のひとつに位置付けられる。本疾患の責任遺伝子は非レセプター型チロシンキナーゼである Bruton's tyrosine kinase (Btk) であり、この分子の異常に起因する XLA 発症は、Btk が B細胞分化に必須の分子であり、その機能は他の分子では代替できないことを示している。B細胞抗原レセプター (BCR) の刺激により、速やかに Lyn、Syk、Btk といったチロシンキナーゼが活性化され、B細胞の増殖、分化、アポトーシスなどが引き起こされる。BCR 刺激で活性化した Lyn が Btk をリン酸化することにより、Btk が活性化されることが報告されているが、Btk の活性化は Lyn にのみ依存しているわけではなく、実際、Lyn 欠損 B細胞でも BCR 刺激後の Btk の活性化が観察されている。一方、Syk も BCR 刺激で活性化され、Syk 欠損 B細胞では Btk のリン酸化／活性化が著減していることから、Syk が Btk の上流にあることが示唆されるが、Syk は Btk をリン酸化しないとの報告もあり、Syk が如何にして Btk を活性化するのかは全く不明であった。そこで、本研究では Syk による Btk の活性化メカニズムの解明を目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

BLNK (B cell linker protein) というアダプター分子は Syk によりリン酸化され、そのリン酸化部位に Btk が SH2ドメインを介して結合し、シグナルを下流に伝えることから、Syk-BLNK-Btk の functional association が存在し、Syk 依存的な Btk の活性化に BLNK が必要なのではないかと考えた。

Btk cDNA を 293T 細胞にトランスフェクションし、発現した Btk 蛋白質を抗 Btk 抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体を用いた Western Blot を行くと、Btk の自己リン酸化が強く観察されたため、他分子からの Btk に対するトランスのリン酸化を評価しにくいと考え、キナーゼ不活性型の Btk (Btk(K-)) を作製し、以下の実験に用いた。Syk と Btk(K-) を 293T 細胞に共発現させても、Btk(K-) のリン酸化は観察されないが、Syk、Btk(K-) に加えて、BLNK を共発現させると、Syk が Btk(K-) をリン酸化することが判明した。Btk の SH2ドメイン内のコンセンサス配列およびチロシン551番 (Lyn によってリン酸化される部位で、Btk が活性化されるためには、このチロシン残基のリン酸化が必須であることが報告されている) に変異を導入すると、Syk による Btk のリン酸化が

著減することが見い出された。このことから、Syk は Btk のチロシン551番をリン酸化し、このリン酸化には Btk と BLNK の結合を必要とすることが考えられる。次に、Syk による Btk のリン酸化が Btk の活性化を誘導するかどうかを検討するために、in vitro kinase assay を行ったところ、BLNK 存在下で Syk が Btk のキナーゼ活性を上昇させることが明らかとなり、Lyn 同様、Syk も Btk の positive regulator として働くことが確かめられた。さらに、B細胞内においても Btk の活性が BLNK 依存的であるかどうかを検討した。BLNK を欠損させたニワトリ B 細胞株 DT40 に T7 エピトープタグをつけた Btk を stable に発現させ、BCR 刺激後の Btk のリン酸化および活性化を野生型 DT40 と比較したところ、Syk 欠損 DT40B 細胞株と同様、BLNK 欠損 DT40B 細胞株における Btk のリン酸化および活性化の上昇は認められなかった。

#### 【総括】

1) BLNK 存在下で Btk は Syk によってリン酸化され、このリン酸化には Btk の SH2 ドメインと BLNK の結合を必要とする。2) Syk は Btk のチロシン551番をリン酸化し、Btk のキナーゼ活性を上昇させる。3) BCR 刺激後の Btk のリン酸化および活性化に BLNK が関与する。

以上のことから、B細胞における BCR 刺激後の Syk による Btk の活性化に BLNK が介在する事が示唆される。また、B細胞だけでなく、他の血球系細胞（T細胞、肥満細胞、血小板）にも、Btk family、Syk/ZAP70 family、血球系アダプター分子が発現していることから、Syk 依存的な Btk 活性化と類似の機構がそれらの細胞にも存在し、Btk family の活性が Syk/ZAP70 family と血球系アダプター分子により調節されるというメカニズムの存在が想定される。

#### 論文審査の結果の要旨

本学位申請者は、Syk による Btk のリン酸化（チロシン551番）および活性化が BLNK（B cell linker protein）によって仲介されることを明らかにし、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 誌に報告した。Syk による Btk のリン酸化が Btk の SH2 ドメインに依存しており、これは Btk の SH2 ドメインとチロシンリン酸化された BLNK の結合が Btk のリン酸化に必須であることを示している。また、B細胞抗原レセプター刺激による Btk のリン酸化および活性化に BLNK が必須であることも明示した。これらは非常に重要かつ興味深い知見であり、B細胞抗原レセプター刺激における Syk 依存的な Btk 活性化の分子機序を示した最初の報告で、Lyn と異なり Syk がなぜ非血球系細胞で Btk をリン酸化し得ないかという重大な疑問を見事に解明している。本研究で示された実験データは明瞭かつ信頼性が高いものであり、博士論文の記述も論理的で、非常に簡明である。

以上のことから、本博士論文が学位授与に値すると考える。