

Title	Four Tyrosine Residues in Phospholipase C- γ 2, Identified as Btk-dependent Phosphorylation Sites, Are Required for B Cell Antigen Receptor-coupled Calcium Signaling
Author(s)	渡邊, 大
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43906
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	わた なべ だい 渡 邊 大
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 17632 号
学位授与年月日	平成 15 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	Four Tyrosine Residues in Phospholipase C- γ 2, Identified as Btk-dependent Phosphorylation Sites, Are Required for B Cell Antigen Receptor-coupled Calcium Signaling. (Btk によるリン酸化部位として同定した phospholipase C- γ 2 の 4 つのチロシン残基は B 細胞抗原受容体刺激に伴うカルシウム関連シグナルに必須である)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 吉崎 和幸 教授 金倉 譲

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

B 細胞抗原受容体 (BCR) 刺激により phospholipase C γ (PLC γ)-2 のチロシンリン酸化および細胞内カルシウム動員がみられる。このカルシウムシグナル伝達には PLC γ 2 の活性化が必須である。PLC γ 2 の活性化とチロシンリン酸化の関与は示されてきたものの、チロシンリン酸化によって直接 PLC γ 2 が活性化するかどうかは明らかでなかった。現在まで B 細胞において PLC γ 2 を直接リン酸化するチロシンキナーゼとして Btk と Syk が候補にあげられてきたが、293T や NIH3T3 細胞を用いた共発現系では Syk より Btk のほうがはるかに効率良く PLC γ 2 をリン酸化する。このことから Btk が PLC γ 2 をリン酸化かつ活性化すると仮定し、まず *in vitro* での Btk による PLC γ 2 のチロシンリン酸化部位を決定し、そのリン酸化の活性化における意義について検討した。

【方法ならびに成績】

ラット PLC γ 2 の全長を含むように複数の GST 融合タンパクを作製し、Btk による *in vitro* kinase assay を行ったところ、3 つの GST 融合タンパクにリン酸化を認めた。PLC γ 2 の 753、759、1197、1217 番目に相当するチロシン残基をフェニルアラニンに置換した GST 融合タンパクでは、Btk による *in vitro* でのリン酸化は消失した。以上の事から Btk による PLC γ 2 の *in vitro* でのリン酸化部位を 753、759、1197、1217 の 4 ケ所と決定した。次に一つもしくは複数のリン酸化部位をフェニルアラニンに置換した変異 PLC γ 2 を作製した (single mutant として Y753F、Y759F、Y1197F、Y1217F、double mutant として Y753/759F、そして 4 つすべてのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した Y-4F)。これらを用いて 293T 細胞に Btk と共発現させたところ、wild type (WT) と比較して single mutant ではおのおのチロシンリン酸化が減弱し、Y-4F ではリン酸化が顕著に低下した。このことは *in vitro* で決定したリン酸化部位は共発現系においてもリン酸化されることを示している。この変異 PLC γ 2 を用いて PLC γ 2 欠損 DT40 細胞に再構成し、安定発現株を樹立した。PLC γ 2 の発現量はほぼ同等で、その *in vitro* でのホスホ

リパーゼ活性も同等であった。これらの細胞を用いて BCR 刺激による PLC γ 2 のチロシンリン酸化を検討したところ、1ヶ所の変異 (Y753F、Y759F、Y1197F、Y1217F) ではリン酸化は WT と変わらず、Y753/759F では約 1/3 に減弱し、4つのチロシン残基をすべてフェニルアラニンに置換した Y-4F ではわずかなリン酸化を認めるのみであった。このことからこの4ヶ所のチロシン残基は BCR 刺激による主要なリン酸化部位であることがわかった。次に BCR 刺激による細胞内カルシウム動員を検討したところ、各 mutant にてカルシウム動員の低下を認め、Y-4F においてはわずかなカルシウム動員を認めるのみであった。次に BCR 刺激による *in vitro* での PLC γ 2 のホスホリパーゼ活性の上昇について検討した。Y-4F においては BCR の刺激においてその活性の上昇は WT と比較し約 50%しか認めなかった。このことは PLC γ 2 がチロシンリン酸化によって直接活性化されることを示唆している。

【総括】

本研究では PLC γ 2 のチロシンリン酸化部位を明らかにし、かつチロシンリン酸化によって直接 PLC γ 2 が活性化することを示した。チロシンリン酸化によって PLC γ 2 がどのようにして活性化されるかは明らかになっていない。しかし、本研究で示されたようにチロシンリン酸化が PLC γ 2 の活性化に最も重要であり、それ以外の活性化機能が存在するとしてもその貢献度は少ないと思われる。また、Btk の *in vitro* でのリン酸化部位が BCR 刺激によるリン酸化部位と一致したことから、Btk が直接 PLC γ 2 をリン酸化すると考えられ、Btk-PLC γ 2 経路の重要性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) の責任遺伝子 Btk は 1993 年にクローニングされたチロシンリン酸化酵素である。B 細胞抗原受容体 (BCR) をはじめ、多くの刺激によって Btk が活性化され、そのシグナル伝達に必須であることが示されてきた。一方、Btk の下流、すなわち Btk が何をリン酸化するかについては明らかでない点が多い。その下流として第一にあげられているのが phospholipase C- γ 2 (PLC γ 2) である。しかし、PLC γ 2 の活性化におけるチロシンリン酸化の意義は明らかにされておらず、PLC γ 2 の活性化に必須のチロシンキナーゼとして Btk と Syk の2つがあげられている。予備的な *in vitro* の実験においては Syk より Btk のほうがはるかに効率良く PLC γ 2 をリン酸化した。そこで本研究は PLC γ 2 を細胞内でチロシンリン酸化するのは Btk であると想定し、まず PLC γ 2 のチロシンリン酸化部位を明らかにした。そのチロシンリン酸化部位は 753、759、1197 および 1217 番目のチロシン残基であった。また、これらのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異 PLC γ 2 の発現ベクターを作製し、PLC γ 2 を欠損したニワトリ B 細胞株 DT-40 に再構成し、BCR 刺激によるシグナル伝達における意義についても考察を行った。BCR 刺激による変異 PLC γ 2 のリン酸化の検討から、今回決定したチロシンリン酸化部位が BCR 刺激によってリン酸化されることが明らかになり、また BCR 刺激による細胞内カルシウム動員、細胞内イノシトール3リン酸の産生、*in vitro* phospholipase 活性の測定から、これらのチロシン残基のリン酸化が BCR 刺激に伴うカルシウム関連シグナルに必須であり、チロシンリン酸化によって PLC γ 2 が直接活性化することを明らかにした。

以上のことから、本論文は XLA の責任遺伝子 Btk およびその基質 PLC γ 2 に関する新たな知見を生み出したものであり、学位授与に値すると考える。