

学位論文題名

原索動物マボヤの細胞性防御システムに関する
抗原レセプター様分子に関する研究

学位論文内容の要旨

系統発生学的に脊椎動物と無脊椎動物の中間に位置する原索動物ホヤ類が、脊椎動物に存在する細胞性免疫システムの原型を有していると考えられるので、原索動物の免疫担当細胞に存在する膜蛋白質が進化的に保存されて脊椎動物の免疫システムで機能している可能性が考えられる。マボヤの体液(哺乳類の血液に相当する)では傷口などの局所において凝集塊を形成する。この時、血球が互いに接着することで細胞間のシグナルを伝達し、血球の活性化が引き起こされている可能性があり、マボヤの血球の凝集機構の解析は細胞性防御システムの初動反応を捕える手掛かりを与えると考えられる。

初めに、マボヤ血球の凝集を定量的に測定することにより、マボヤから体液をシリンジで採取すると採取の刺激による局所的な血球凝集の活性化がおきること、マボヤ血球の凝集に金属イオン、ペプチド性物質、プロテアーゼ、チロシンキナーゼ、アクチンフィラメントおよび糖鎖が関与することを明らかにした。

次に、マボヤの血球凝集に対する阻害作用を指標にしてモノクローナル抗体(A74)を作製した。A74抗体は、マボヤ血球による食作用をも阻害することから、血球-血球間あるいは血球-異物間の接着を阻害すると考えられる。マボヤ血球膜画分からA74抗原蛋白質(A74蛋白質)を精製し、N末端部分アミノ酸配列を決定した。A74蛋白質はシアル酸を含む分子量160Kの糖蛋白質で、約70%の血球群の細胞膜に存在することも明らかにした。

マボヤの細胞性防御システムにおける細胞間接着に関与するA74蛋白質の分子構造を明らかにするために、そのc-DNAクローニングを行った。決定されたN末端部分アミノ酸配列をもとにプライマーを作製し、それを用いてマボヤ血球c-DNAライブラリーを鋳型にしてPCR産物を得た。それを、プローブとして用い、マボヤ血球c-DNAライブラリーからA74蛋白質をコードするc-DNAクローンを得た。A74 c-DNAクローンは全長3390bpでポリAテイルを含み、722アミノ酸をコードしている。蛋白質から決定されたN末端アミノ酸配列を含み、1つの膜貫通領域を有する新規膜蛋白質である。細胞外ドメインに5つのN-グリコシド型糖鎖のコンセンサス配列と5つのシステイン残基があり、細胞内ドメインにチロシンリン酸化を介するシグナル伝達に働くと考えられる複数のモチーフ構造が存在することが明らかになった。また、A74蛋白質のmRNAは血球特異的に発現していることも明らかにした。A74蛋白質に存在する細胞内ドメインのモチーフ構造として、第一に、哺乳類由来の抗原レセプターに特徴的なAntigen Recognition Activation Motif (ARAM)が、膜貫通領域のすぐあとに、2回繰り返して存在する。脊椎動物以外の免疫担当細胞におけるARAMモチーフ含有分子の存在は本研究で初めて明らかにされた。哺乳類由来のT細胞レセプター(TCR)、B細胞

レセプター(BCR)あるいはFcレセプター(FcR)において、抗原刺激のシグナル伝達にARAMが必須であることがミュータントを用いた実験などから明らかにされている。第二のモチーフ構造は、細胞内ドメインの中央部に位置するSH3ドメイン結合配列と2つのSH2ドメイン結合配列である。SH2/SH3ドメインを持つシグナル分子(チロシンキナーゼ、ホスファターゼあるいはアダプター分子)がSH2/SH3ドメイン結合配列に結合し、シグナルを下流に伝えている可能性が考えられる。第三のモチーフ構造はTTTモチーフで、C末端近傍に2つ存在する。T細胞の接着分子LFA-1と抗原提示細胞のICAM-1とが接着することにより抗原シグナルを増強するようなシグナル(costimulatory signal)を細胞内に伝えるモチーフで、インテグリンβ鎖(LFA-1)の細胞内ドメインに存在する。

A74蛋白質の機能をさぐる目的で、A74抗体を用いた免疫沈降実験を行った結果、主に分子量105K, 75Kおよび56Kの蛋白質がA74蛋白質と一緒に沈降し、A74蛋白質が細胞膜近傍で複数の蛋白質と複合体を形成していることが明らかになった。免疫沈降物を用いて抗ホスチロシン抗体によるウエスタンブロッティングを行い、分子量160K, 90Kおよび75Kの3本のバンドがチロシンリン酸化されることを明らかにした。分子量160KのバンドはA74蛋白質に由来すると考えられる。次に、血球凝集に伴う蛋白質のチロシンリン酸化の経時変化を解析した結果、凝集刺激後10分に分子量260Kおよび160Kの蛋白質がチロシンリン酸化され、30分後に分子量90Kと75Kの蛋白質がチロシンリン酸化されることが明らかになった。分子量160Kの蛋白質はA74蛋白質由来で、90Kと75Kの蛋白質はA74蛋白質と複合体を形成し、かつ、チロシンリン酸化される蛋白質と分子量が一致した。

哺乳類由来のTCRを介する抗原提示のシグナルは、SrcファミリーキナーゼによってTCRのARAMのチロシン残基がリン酸化されることで下流に伝えられる。このチロシンリン酸化されたARAMにZAP-70(分子量70Kのキナーゼ)が2つのSH2ドメインを介して結合すると、それ自身がSrcファミリーキナーゼによってリン酸化され活性型キナーゼとなり、次のターゲット蛋白質をリン酸化すると考えられている。A74蛋白質のモチーフ構造および血球凝集に伴うチロシンリン酸化の解析結果をふまえて、抗原提示のシグナル伝達機構とのアナロジーで、TCRのARAMに対してマボヤA74蛋白質のARAMが対応し、ZAP-70に対してマボヤ75K蛋白質が対応すると考えると、マボヤの血球では、凝集の刺激によってA74蛋白質のARAMのチロシン残基がリン酸化され、次に、A74蛋白質と複合体を形成する75K蛋白質が、チロシンリン酸化されたARAMに結合すると、それ自身もチロシンリン酸化され、シグナルをさらに下流に伝えるという機構が考えられる。この機構の検証が今後必要である。

A74抗体による機能阻害実験から、A74蛋白質の細胞外ドメインが、血球が互いに接着する血球凝集と、血球が異物を取り込む食作用に機能していると考えられる。一方、74蛋白質の細胞内ドメインに抗原レセプターのシグナル伝達に特徴的なARAMモチーフが存在し、さらに、A74蛋白質が血球凝集に伴ってチロシンリン酸化される。A74蛋白質は、細胞外からのシグナル(血球-血球間接着あるいは血球-異物間認識)を受容する細胞外ドメインとシグナルを内部に伝える細胞内ドメインが一つの分子として合体した形をとっている。それに対して、哺乳類由来の抗原レセプターは、抗原特異性を決定するサブユニット(T細胞、B細胞の各クローンに特異的な構造を持つ)と細胞内へのシグナル伝達を行うサブユニット(クローン間で共有されるモチーフ構造を持つ)に機能分化している。両者の比較の上に、ホヤ型のプロトタイプから、哺乳類型の抗原レセプターへの進化に伴って抗原特異性と多様性を獲得したという仮説が提案できる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	横 沢 英 良
副 査	教 授	長 沢 滋 治
副 査	助教授	高 橋 和 彦
副 査	助教授	沢 田 均

学 位 論 文 題 名

原索動物マボヤの細胞性防御システムに関する 抗原レセプター様分子に関する研究

原索動物は系統発生学的に脊椎動物と無脊椎動物の中間に位置しており、免疫の進化を考える上で重要な動物である。抗体や補体を持たない原索動物の生体防御システムは血球が行う細胞性防御反応が中軸を成し、その細胞性防御システムの解明は脊椎動物の高度に発達した免疫システムのより深い理解に役立つと考えられる。そして、原索動物の血球に存在する生体防御蛋白質が進化的に保存されて脊椎動物の免疫システムで機能している可能性が考えられる。

本論文提出者は、原索動物マボヤの細胞性防御システムの中で、血球凝集に着目し、その反応に関与する分子に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) マボヤの血球凝集を定量的に測定する方法を開発し、局所的刺激に伴い血球凝集の活性化がおきること、血球凝集に金属イオン、ペプチド性物質、プロテアーゼ、チロシンキナーゼ、アクチンフィラメントおよび糖鎖が関与することを明らかにした。

(2) マボヤの血球凝集に対する阻害作用を指標にしてモノクローナル抗体 A 7 4 を作製し、その抗体がマボヤ血球による食作用をも阻害することを明らかにした。さらに、その抗原蛋白質 (A 7 4 蛋白質) をマボヤ血球膜画分から精製し、本蛋白質がシアル酸を含む分子量160Kの糖蛋白質であることを明らかにし、N末端部分アミノ酸配列を決定した。

(3) A 7 4 蛋白質の分子構造を明らかにするために、その c DNA クローニングを行い、単離された A 7 4 c DNA クローンが全長3390bpで722アミノ酸をコードしており、蛋白質から決定されたN末端アミノ酸配

列を含み、一回の膜貫通領域を有する新規膜蛋白質であることを明らかにした。さらに、細胞内ドメインにチロシンリン酸化を介するシグナル伝達に働くと考えられる複数のモチーフ構造が存在することを発見した。その第一のモチーフ構造は、哺乳類由来の抗原レセプターに特徴的な Antigen Recognition Activation Motif (ARAM) であり、脊椎動物以外の免疫担当細胞での ARAMモチーフ含有分子の存在を初めて明らかにした。第二のモチーフ構造は、一つの SH3 ドメイン結合配列と 2 つの SH2 ドメイン結合配列であり、SH2 / SH3 ドメインを持つシグナル分子がこれらの SH2 / SH3 ドメイン結合配列に結合してシグナルを下流に伝えるというスキームを提起した。第三のモチーフ構造は、接着分子間の相互作用を介するシグナル伝達に関与すると考えられる、2 つの TTTモチーフであり、接着因子として機能していると考えられる A74 蛋白質を介するシグナル伝達にこのモチーフも重要な役割をはたしているという考えを提案した。

(4) A74 抗体を用いた免疫沈降実験から、A74 蛋白質が細胞膜近傍で複数の蛋白質と複合体を形成していることを明らかにした。そして、その免疫沈降物を用いた抗ホスホチロシン抗体によるウエスタンブロット解析から、A74 蛋白質およびそれと複合体を形成する分子量 90K と 75K の蛋白質がチロシンリン酸化されることを明らかにした。さらに、血球凝集に伴う蛋白質のチロシンリン酸化を解析し、凝集刺激の初期に A74 蛋白質がチロシンリン酸化され、その後、90K 蛋白質と 75K 蛋白質がチロシンリン酸化されることを明らかにした。

(5) A74 蛋白質は、細胞外からのシグナルを受容する細胞外ドメインとシグナルを内部に伝える細胞内ドメインが一つの分子として合体した形をとっており、両者が機能分化している脊椎動物の抗原レセプターへの進化に伴って抗原特異性と多様性を獲得したという仮説を提案した。

以上の新知見およびそれを得るために用いた新研究技法は、原索動物の生体防御システムの理解にとどまらず、脊椎動物の免疫システムの進化の道筋を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。