

## アダプター蛋白質 3BP2 の B 細胞における生理機能に関する研究

研究代表者： 千原 一泰 (医学部・准教授)

共同研究者： 定 清直 (医学部・教授)、竹内 健司 (医学部・学内講師)

概 要	
	我々の研究室ではこれまでに、アダプター蛋白質 3BP2 が B 細胞受容体刺激により Syk によるチロシンリン酸化を受け、転写因子 NFAT の活性化を調節する事を明らかにしている。本研究ではジーンターゲティングの手法により新たに 3BP2 欠損 B 細胞株を作成し、B 細胞受容体シグナル伝達における 3BP2 の生理機能をより詳細に明らかにする事を目的とする。現在までに得られた研究成果を以下に示す。① 3BP2 欠損 B 細胞株の樹立に成功した。② 3BP2 の欠損は B 細胞受容体刺激による細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルや、NF- $\kappa$ B の活性化に対して顕著な影響を与えなかった。③ 3BP2 の欠損は Rac1 蛋白質の活性化レベルを上昇させた。④ 3BP2 と会合する分子量約 100kDa のチロシンリン酸化蛋白質を新たに見出した。
関連キーワード	アダプター蛋白質、チロシンリン酸化、3BP2、B 細胞受容体

### 研究の背景および目的

#### 【研究の背景】

アダプター蛋白質 3BP2(c-Abl SH3-domain binding protein-2)は c-Abl の SH3 ドメインに会合する機能不明の分子として同定された。これまで我々は 3BP2 がマスト細胞の脱顆粒反応を促進すること (Sada *et al.* *Blood* 2002)、Syk によりリン酸化される部位がチロシン 174、183、446 の 3 箇所、Lyn と会合しリガンドとして活性化すること (Maeno *et al.* *J. Biol. Chem.* 2003)、これらのリン酸化が T 細胞の NFAT 活性化を促進すること (Qu *et al.* *Biochemistry* 2005)を明らかにした。その後、海外の研究グループにより、3BP2 の発現がリンパ球、マスト細胞の他、破骨細胞にも認められ、B 細胞に最も高い発現が見られることや、3BP2 欠損マウスの表現型が顕著ではなく、B 細胞の成熟や腹腔内 B1 細胞の分化に影響があることなどが明らかとなった (de la Fuente *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 2006; Chen *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 2007)。さらに、我々は B 細胞抗原受容体刺激による 3BP2 のチロシンリン酸化に Syk が不可欠であることを見だし、チロシンリン酸化を受けた 3BP2 が Vav1、PLC $\gamma$ 2、BLNK と複合体を形成し、NFAT の活性化を促進することを明らかにした (Shukla *et al.* *J. Biol. Chem.* 2009)。また、マスト細胞においては 3BP2 が抗原刺激に応じて SHP-1 と会合し、TNF- $\alpha$  の産生を促進することを明らかにした (Chihara *et al.* *Genes Cells*, 2011)。

#### 【研究の目的】

本研究では 3BP2 の生理機能を詳細に解析する事

を目的とし、ジーンターゲティングの手法により新たに樹立する 3BP2 欠損 B 細胞株や新規抗 3BP2 抗体を用いて、免疫系、特に B 細胞における 3BP2 の生理機能について分子遺伝学的解析を行う。具体的には以下の点に焦点を当て研究を進める。

#### 1) ジーンターゲティング法による 3BP2 欠損 (ノックアウト) 細胞の作成

ニトリ Pre-B 細胞株である DT40 細胞の 3BP2 ゲノム領域をジーンターゲティング法により破壊し、3BP2 欠損 B 細胞株を樹立する。この細胞を用いて B 細胞抗原受容体を介する 3BP2 会合分子のチロシンリン酸化や転写因子 NFAT、更に NF- $\kappa$ B への影響について解析を行う。

#### 2) B 細胞シグナル経路の分子解剖 (molecular dissection)

免疫系組織の分化・増殖に必要なチロシンキナーゼ (Syk、Lyn、Abl、Arg) を欠損する DT40 細胞における 3BP2 のチロシンリン酸化を解析する。また、3BP2 の各種変異体を用いて、会合分子やシグナル伝達への影響を明らかにする。

#### 3) 免疫系組織における 3BP2 の発現解析

3BP2 は臓器別では脾臓に最も強い発現が認められる。そこで、脾臓における 3BP2 の発現部位と細胞を明らかにする。また、3BP2 isoform の機能的差異を明らかにする。

#### 4) 感染免疫応答における 3BP2 の役割についての解析

B 細胞へのウイルス感染動物モデルを用いて、脾臓やリンパ節における 3BP2 の機能について解析する。

### 研究の内容および成果

#### 1) ジーンターゲティング法による 3BP2 欠損 (ノックアウト) 細胞の作成

ニトリ 3BP2 遺伝子は第 4 染色体に存在し、そのゲノム DNA の塩基配列が明らかとなっている。

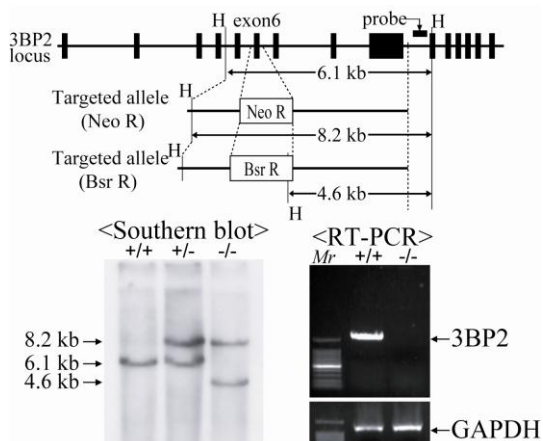


図1) 3BP2 欠損 B 細胞株の作成

そこで、エクソン 4 からエクソン 9 を含むゲノム領域を PCR で増幅し、エクソン 6 を Neo 耐性遺伝子、あるいは Blasticidin S 耐性遺伝子に置換し、ターゲティングベクターを構築した。ターゲティングベクターの導入により薬剤耐性となった細胞をスクリーニングし、得られたクローンの 3BP2 ゲノム領域にターゲティングベクター由来の DNA が組み込まれているのかサザンブロットにより解析した。その結果、3BP2 欠損細胞の樹立に成功した事を確認した。3BP2 欠損細胞では mRNA レベルで 3BP2 の発現が認められない事を RT-PCR により確認している (図 1)。

## 2) B 細胞シグナル経路の分子解剖 (molecular dissection)

A) 細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルに与える影響：野生型細胞と 3BP2 欠損細胞をそれぞれ抗 IgM 抗体で刺激し、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルを抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロットにより解析した。その結果、3BP2 の欠損は細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルに顕著な影響を与えなかった。それゆえ、3BP2 は B 細胞受容体シグナルの始点に作用するのではなく、下流に位置するシグナル分子に特異的に作用

すると考えられた。この仮説を強固にするために、今後 3BP2 が B 細胞受容体の発現レベルに与える影響をフローサイトメトリーにより解析しておく。

B) 3BP2 会合分子のチロシンリン酸化に与える影響：3BP2 の欠損は B 細胞受容体刺激による PLC $\gamma$ 2 のチロシンリン酸化に影響を与えなかった。また、B 細胞受容体刺激による細胞内カルシウムレベルの上昇にも影響は認められなかった。遺伝子導入により、3BP2 の発現量を増やすと NFAT の活性化が増強されることから、通常よりも 3BP2 の発現が増加する状態において、PLC $\gamma$ 2 の活性化が増強されると考えられた。Vav1 のチロシンリン酸化レベルに与える影響は現在入手可能な抗体が無いため、タグを付けた Vav1 遺伝子を細胞に発現させることで今後解析を進める。

C) NF- $\kappa$ B の活性化に及ぼす影響：ルシフェラーゼアッセイによる解析から、定常状態および抗 IgM 抗体で刺激した細胞において、3BP2 の欠損は NF- $\kappa$ B の活性化に影響を与えなかった。

D) 低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac1 の活性化状態に及ぼす影響：PAK1 の p21-binding domain を用いた pull-down アッセイによる解析から、3BP2 の欠損により Rac1 の活性化レベルの上昇が認められた。この現象が 3BP2 の遺伝子発現の有無に依存している事を明らかにする目的で、3BP2 欠損細胞に 3BP2 の発現を戻した revertant 細胞を作成した。現在、この細胞を用いて 3BP2 が Rac1 の活性化に抑制的に働くのか、確認を急いでいる。

E) 新たな 3BP2 会合分子の発見：HA タグを付した 3BP2 を過剰発現する DT40 細胞を抗 IgM 抗体で刺激し、3BP2 を免疫沈降したところ、3BP2 に会合する分子量約 100 kDa の蛋白質を見出した。今後、質量分析を行い、この分子の同定を行う。

【研究の目的】に示した 3) 免疫系組織における 3BP2 の発現解析および、4) 感染免疫応答における 3BP2 の役割についても今後解析を進める。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

<日本語総説>

① 中島謙治、千原一泰、竹内健司、定 清直 「次世代低分子化合物：Syk 阻害薬. 特集 関節リウマチの最新情報-寛解を目指した診断と治療の最新展開-」、最新医学 67(2), 101-106, 2012

② 千原一泰、中島謙治、竹内健司、定 清直 「Spleen tyrosine kinase (Syk) の生理的役割とその阻害薬の作用」、リウマチ科、投稿中

<学会発表>

① Sada, K., Nakashima, K., Ogi, K. and **Chihara, K.** 「Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates

BCR-mediated activation of NFAT」 Immunology 2011, 2011.

② **Chihara, K.**, Nakashima, K., Takeuchi, K. and Sada, K. 「Association of 3BP2 with SHP-1 regulates SHP-1-mediated production of TNF- $\alpha$  in RBL-2H3 cells」第 34 回日本分子生物学会年会、2011.

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金 基盤研究 (C) 2012 年度

「アダプター蛋白質 3BP2 による B 細胞活性化調節機構の分子遺伝学的解析」 代表 申請中