生命科学複合研究教育センター
「平成２７年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

貪食細胞におけるアダプター蛋白質 3BP2 の機能解析

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）、山内翔太（医学部・特命助教）

概　　要

アダプター蛋白質 3BP2 は、Syk を介する抗原受容体シグナル伝達を調節する。3BP2 の発現はマクロファージなどのミエロイド系細胞に強く認められるが、その機能は良く分かっていない。そこで、分化に伴い 3BP2 の発現レベルの上昇が見られる HL-60 細胞を用いて、マクロファージにおける 3BP2 の機能を解析した。ゲノム編集技術により作製した 3BP2 ノックアウト細胞を解析した結果、分化に伴う約 55kDa の蛋白質のチロシンリン酸化反応を 3BP2 が促進する可能性を見出した。CSF1 受容体や Mac-1 がこの反応の始点となり、シグナル伝達の下流で Fyn あるいは Lyn の機能を 3BP2 が調節している可能性が考えられた。本研究により、3BP2 がマクロファージの増殖や接着の制御に関わる可能性を新たに見出した。

関連キーワード　貪食細胞、チロシンキナーゼ、アダプター蛋白質、シグナル伝達

研究の背景および目的

これまで我々は、B 細胞受容体や IgE 受容体シグナル伝達におけるアダプター蛋白質 3BP2 の機能を明らかにしてきた。現在さらに研究を発展させる目的で、マクロファージ様細胞に分化するミエロイド系細胞を用いて、貪食細胞における 3BP2 の機能を解析している。最近 3BP2 の発現が、HL-60 細胞の分化に伴い増強される事を見出した。分化した細胞では Src 型キナーゼのリン酸化が亢進するが、ゲノム編集技術により作製した 3BP2 ノックアウト細胞ではこの現象が見られなかった（未発表）。3BP2 の欠損は分化マーカーの発現に影響を与えない事から、上記の現象は分化異常によるものではないと考えられる。

Src 型キナーゼのリン酸化が亢進するメカニズムとして、Mac-1 を介する細胞接着が挙げられる。Mac-1 はマクロファージの代表的な分化マーカーであり、インテグリン CD11b と CD18 の複合体である。Mac-1 がリガンド ICAM-1 を認識すると、CD18 の細胞内領域が Src 型キナーゼを活性化してシグナル伝達を開始する可能性が示唆されている。

本研究の目的は、アダプター蛋白質 3BP2 が Src 型キナーゼの活性化をどのように制御し、マクロファージの細胞接着や食作用を調節するのか明らかにすることである。

これまでの遺伝学的解析から、インテグリン Mac-1 のシグナル伝達に免疫受容体構成分子 FcRγ や Syk が関与する事が示唆されている。しかし、これらの分子がどのように Mac-1 のシグナル伝達を調節しているのか、そのメカニズムは不明である。本研究では生化学的解析とゲノム編集技術を組み合わせ、マクロファージにおける 3BP2 の機能の解明を目指す。

研究の内容および成果

１）ミエロイド系細胞における 3BP2 の発現調節

3BP2 の機能解析を行うために、ミエロイド系細胞における 3BP2 の発現について解析した。すでに 3BP2 の発現を確認していた HL-60 の他に、U937 や MOLM-13、MV4-11 などのマクロファージ様細胞への分化能を持つ細胞で 3BP2 の発現が認められた。U937 においては分化誘導に関わらず、常に高いレベルで 3BP2 の発現が見られたが、HL-60 や MOLM-13、MV4-11 では分化誘導により 3BP2 の発現レベルが増強された。HL-60 は、all trans retinoic acid (ATRA)により好中球様細胞へと分化させることが知られているが、3BP2 の発現は ATRA によっても増強された。それゆえ、3BP2 はマクロファージだけではなく好中球などの貪食細胞の機能調節に関わる可能性が示唆された。

２）分化に伴う蛋白質のチロシンリン酸化反応へ 3BP2 が与える影響

HL-60 を PMA で処理すると、マクロファージ様細胞への分化に伴い細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応が増強される。そこで、3BP2 の発現が

この反応与える影響について解析した。分化誘導を行った細胞抽出液に対し、抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロットを行ったところ、3BP2 ノックアウト細胞において分子量約 55kDa の蛋白質のチロシンリン酸化レベルが著しく低下した（図１B・矢印）。

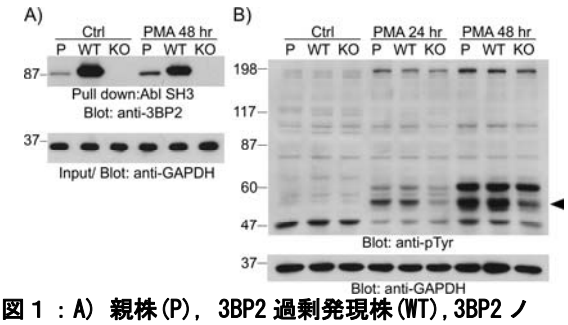

図１：A）親株(P)，3BP2 過剰発現株(WT),3BP2 ノックアウト細胞株(KO)における 3BP2 の発現。B）3BP2 の発現が PMA 処理により誘導される蛋白質のチロシンリン酸化反応に与える影響。

これまでの報告から、p52/p46 Shc や 3BP2 会合分子として同定されている HIP-55 (SH3P7/Abp1) がこの蛋白質である可能性が考えられる。今後、ゲノム編集技術を使い、分子の同定を試みる予定である。

３）3BP2 が機能調節に関わる分子の探索

3BP2 によるチロシンリン酸化反応の制御メカニズムを明らかにするために、ゲノム編集技術を用いてチロシンリン酸化反応に関わる分子の探索を試みた。HL-60 を PMA で処理すると CSF1 と CSF1 受容体の発現が誘導され、オートクラインによる CSF1 受容体の活性化が起こるとの報告がある。そこで、CSF1 ノックアウト細胞を解析したところ、PMA 処理による蛋白質のチロシンリン酸化反応は殆ど消失した。また、PMA 処理により Mac-1 を介した細胞のコロニー形成が見られるが、Mac-1 ノックアウト細胞を解析したところ、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応の減弱が見られた（図２A）。

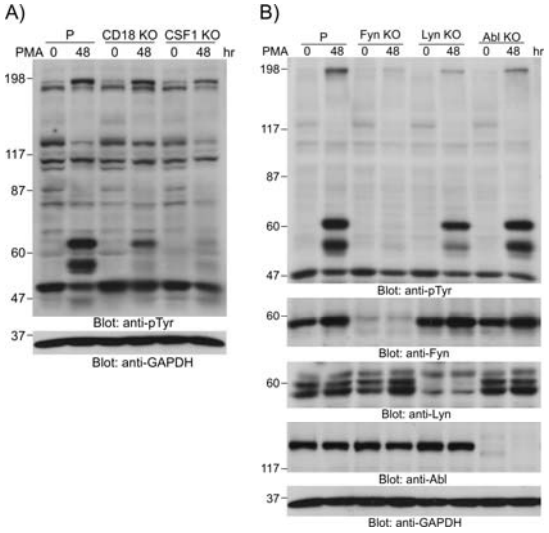

図２：A）CD18（Mac-1），CSF1 ノックアウト細胞と、B）Fyn，Lyn，Abl ノックアウト細胞における PMA 処理により誘導される蛋白質のチロシンリン酸化反応。

これらの結果から、3BP2 は CSF1 受容体あるいは Mac-1 のシグナル伝達の調節に関わる可能性が示唆された。また、Fyn,や Lyn のノックアウト細胞で PMA 処理による蛋白質のチロシンリン酸化反応が抑制されたことから（図２B）、3BP2 が CSF1 受容体や Mac-1 の下流で、これらの Src 型チロシンキナーゼの機能を調節している可能性が考えられた。

５）まとめ

本研究により 3BP2 が CSF1 受容体あるいは Mac-1 の下流で Src 型キナーゼの活性化を調節する可能性を見出した。今後の解析でそのメカニズムを明らかにしたいと考えている。また、3BP2 がマクロファージの増殖や接着、貪食能をどのように調節するのか解析を展開していきたい。

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」

Hepatitis C Virus Particle Assembly Involves Phosphorylation of NS5A by the c-Abl Tyrosine Kinase.
Yamauchi, S., Takeuchi, K., Chihara, K., Sun, X., Honjoh, C., Yoshiki, H., Hotta, H. and Sada, K.
J. Biol. Chem., 290(36), 21857-21864, 2015.

アダプター蛋白質 3BP2 は分化した AML 細胞において Src 型チロシンキナーゼの活性化を促進する。
千原一泰、吉木はつみ、加藤雄士、本定千知、山内翔太、竹内健司、定清直　2015 年 12 月　日本分子生物学会年会・発表

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会　H28 年度科学研究費補助金　基盤研究 C
「チェルビズム病原因蛋白質によるマクロファージの機能調節メカニズム」・代表・申請中