B細胞のシグナル伝達

黒崎 知博

Jpn. J. Clin. Immun., 22 (6) : 378~381, 1999.

B cell signaling

Tomohiro Kurosaki

*Department of Molecular Genetics, Institute for Liver Research,
Kansai Medical University***Key words** : B cell antigen receptor,
tyrosine kinases,
BLNK,
PLC- γ ,
MAP kinases

はじめに

B細胞は主要なリンパ球の1つであり、最終的には抗体産生を担う形質細胞（プラズマ細胞）へ分化する。B細胞の表面にはB細胞抗原レセプター（BCR）と呼ばれる抗原を認識して結合する膜型免疫グロブリン重鎖、軽鎖と、細胞内へのシグナル伝達を担うIg- α 、Ig- β から構成される複合体が発現している。Ig- α 、Ig- β の細胞内領域には、ITAM（immunoreceptor tyrosine-based activation motif）と称する26個のアミノ酸配列があり、BCR刺激により、この中のよく保存されたチロシンのリン酸化がおこり、そこへチロシンキナーゼが会合する。BCRを構成する遺伝子のノックアウトマウスの解析により、BCRからのシグナルは、B細胞の免疫機能のみならず発生分化にも必須であることが明らかになった¹⁾。

BCR刺激後、細胞内では様々な蛋白質のチロシンリン酸化がおこる。B細胞に発現しているチロシンキ

ナーゼ（PTK）には、Src-family PTKs（Lyn, Blk, Fyn, Lck, Fgr）、Syk、Btkが知られており、これらは互いに協調して活性化され、BCRからのシグナルを下流に伝える。その主な経路として、phospholipase C（PLC）- γ 、Ras、mitogen-activated protein kinase（MAPK）、PI 3-kinaseなどのエフェクター分子群が同定されてきた。このようにBCR刺激により活性化されるPTK群とエフェクター分子群との相関生は、明らかにされてきたが、そのカップリングの分子機構についてはまだ不明な点が多かった。

アダプター分子は、それ自体には何ら酵素活性を有さないが、多くの場合PTKによりリン酸化され、他のタンパク質/因子との相互作用によりシグナル伝達上重要な役割を担っている。アダプター分子は、いくつかの独立した機能を担う蛋白質モジュールが組合わさって形成されている。たとえば、リン酸化されたチロシンとの結合モジュールであるSH2ドメイン（src-homology 2 domain）、PTBドメイン（phosphotyrosine binding domain）、プロリンリッチ領域（proline rich region）との結合部位であるSH3ドメ

イン, ある種のイノシトールリン脂質との結合が示されている PH ドメイン (pleckstrin-homology domain) 等である。これらは分子内の結合によって酵素活性の調節に関与したり, シグナル伝達のステップで細胞内でのリクルートメントに使われるなど重要な機能を担っている。

本稿では主にごく最近同定され BCR シグナル伝達の中心的なアダプター分子であることが明らかになりつつある BLNK を中心に BCR シグナルを概観したい。

I. BCR シグナル伝達に必要なアダプター分子 BLNK の同定

筆者らは, Syk の細胞内基質蛋白質としてニフトリ DT 40 B 細胞から 80 kDa のリン酸化蛋白質を精製し, その遺伝子をクローニングした²⁾。BLNK は, N 末側に塩基性アミノ酸を多く含む領域, 酸性アミノ酸を多く含む領域をもち, 中央の部分にプロリンリッチ領域, C 末側には SH 2 ドメインがある。また, PTK の基質蛋白質によく見られる YxxP のモチーフが 6 回ある。分子全体としては T 細胞のアダプター分子 SLP-76 とホモロジーが高い。BLNK の発現は, 血液細胞では B 細胞特異的で, T 細胞には見られない。組織別に見ると, 非造血系組織では肝臓, 腎臓に発現している³⁻⁵⁾。BLNK は, Syk により BCR 刺激依存的にリン酸化される³⁾。B 細胞内で PLC- γ , Vav, Grb 2, Nck が BLNK と相互作用し, PLC- γ 2, Vav の SH 2 ドメイン, Grb 2 では SH 2 ドメインと SH 3 ドメインの両方が BLNK との結合に必要であった^{3,4,6,7)}。これらのことは BLNK が BCR の下流シグナルのエフェクター分子と Syk PTK をつなぐ中心的なアダプター分子であることを示唆している。

II. PLC- γ 2 経路における BLNK の機能

PLC- γ は細胞膜に存在する phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) を基質として, 2 つのセカンドメッセンジャー, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) と diacylglycerol (DAG) を産生する。IP₃ は IP₃ レセプターを介して細胞内の Ca²⁺ 濃度の上昇 (Ca²⁺ 動員) を, DAG は protein kinase C (PKC) の活性化を引き起こす。PLC- γ 1, PLC- γ 2 の 2 つのアイソフォームがあるが, B 細胞では主に PLC- γ 2 が発現している。PLC- γ 2 は一つの SH 3 ドメインと二つの SH 2 ドメインを持つ。PLC- γ 2 活性化に

は Syk, Btk の 2 つの PTK が必須である^{8,9)}が, PLC- γ 2 のリクルート機構については, 多くの報告にも関わらず今一つはっきりしていなかった。

筆者らは, BLNK の機能を調べる目的で, DT 40 細胞を用いて BLNK 欠損細胞を樹立した²⁾。DT 40 はニフトリ B 細胞株で, 相同組換えの頻度が高く, 体細胞レベルで gene targeting が行える高等真核生物では唯一の系である。BLNK 欠損 DT 40 細胞は Ca²⁺ 動員, PLC- γ 2 のリン酸化, IP₃ の産生がみられず, PLC- γ 2 の活性化は BLNK に依存していた。更に, 筆者らは BLNK 欠損細胞では PLC- γ 2 の細胞質から膜画分への移行が抑制されることを見出した。膜発現型の PLC- γ 2 キメラ (細胞外領域として Fc γ RIIIA, 細胞内領域として PLC- γ 2 を持つ) を作製し, BLNK 欠損細胞に発現させると, BCR とキメラ分子との架橋刺激により, PLC- γ 2 の活性化が回復した。BCR 刺激による BLNK の膜移行が報告されており, 筆者らは図に示す BLNK による PLC- γ 2 活性化モデルを提唱した。

このモデルについてさらに検討を行った。PLC- γ 2 の SH 2 ドメインの変異体を作製し, PLC- γ 2 欠損 DT 40 細胞に導入すると, PLC- γ 2 のリン酸化, IP₃ の産生, PLC- γ 2 の膜移行が著しく減少した。この細胞では, BLNK/PLC- γ 2 の複合体形成が抑制されていた⁷⁾。従って, BLNK が PLC- γ 2 の SH 2 ドメインに会合することが PLC- γ 2 の活性化に必須であると結論された。また, Btk の SH 2 ドメインに結合する分子を探索したところ, その 1 つが BLNK であった。さらに検討すると, Btk による PLC- γ 2 のリン酸化には, リン酸化された BLNK が必要であった¹⁰⁾。

これらの知見を加えた図の説明は以下のようになる。BCR 刺激後, 活性化された Syk により BLNK はリン酸化され, PLC- γ 2 はその SH 2 ドメインを介して BLNK に結合し, PLC- γ 2/BLNK は膜の BCR 近傍にリクルートされる。別の機構により活性化され膜に存在する Btk は, SH 2 ドメインを介してリン酸化された BLNK に結合する。結果的に, BLNK, PLC- γ 2, Btk は Syk に近接して存在し, PLC- γ 2 は, Syk, Btk によりリン酸化され, 酵素活性を持つ。このモデルは, DT 40 細胞由来の欠損細胞では Syk, Btk, PLC- γ 2, BLNK のどれを欠失させても Ca²⁺ 動員が完全に消失する事実をうまく説明する。

図 BCR 刺激による PLC- γ 2 の活性化機構

BCR 刺激後、活性化された Syk は BLNK をリン酸化し、膜画分へ移行させる。PLC- γ 2 は BLNK に伴って膜画分へ移行し、結果として Syk の近傍にリクルートされ、リン酸化される。膜画分に存在する Btk はさらに PLC- γ 2 の別の Tyr をリン酸化し、PLC- γ 2 が酵素活性を持つように活性化され、2つのセカンドメッセンジャー、IP₃ と DAG が産生され、さらに下流にシグナルが伝えられる。

III. MAPK 経路における BLNK の役割

MAPK には、ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 MAPK の3つのサブファミリーが知られており、核内転写因子の活性調節に重要な役割をはたしている。DT 40 細胞を用いた解析などから、Ras と PLC- γ 2 による PKC の活性化が協調して ERK が活性化することが明らかとなった^{11,12)}。同様に、JNK の活性化には Rac1 と PLC- γ 2 による IP₃ レセプターを介した Ca²⁺ 濃度の上昇が、p38 MAPK 活性化には Rac1 と PLC- γ 2 による PKC の活性化が重要であることが報告された^{11,12)}。

まず、BCR 刺激後の ERK の活性について BLNK 欠損 B 細胞で検討すると、ERK 活性は減少していた²⁾。膜発現型の PLC- γ 2 キメラを BLNK 欠損細胞に発現させると、ERK 活性は野生型と同程度に回復した。また、ドミナントネガティブ型の Ras を

BLNK 欠損細胞に発現させると ERK 活性は完全に消失し、野生型 DT 40 と BLNK 欠損細胞中の活性型 (GTP 結合型) Ras の活性を測定すると差が見られなかった²⁾。以上のことから、BLNK 欠損細胞で見られた ERK 活性の低下は PLC- γ 2 の不活性化によること、Ras の活性化に BLNK は影響しないことが結論づけられる。

次に、JNK, p38 MAPK 経路について検討した。BLNK 欠損細胞では、JNK, p38 のどちらの活性も失われていた。ERK 活性とは異なり、膜発現型の PLC- γ 2 キメラを BLNK 欠損細胞に発現させても、JNK, p38 活性は回復しなかった²⁾。DT 40 では、JNK, p38 の活性化に Rac1, PLC- γ 2 の2つの経路が関与しているため^{11,12)}、BLNK が PLC- γ 2 だけでなく Rac1 の活性化にも関与していると結論される。

おわりに

本稿では BCR シグナル伝達における主に BLNK の機能について紹介してみた。例えば、PLC- γ 2 活性化機構にしても、BLNK のどのチロシン残基が PLC- γ 2 との会合に必要ななど詳細はまだ不明である。また、BLNK の膜移行メカニズムについてもまだ回答を得ていない。BLNK の発生、分化に関する機能検討もノックアウトマウスなどにより進められ

ている。BCR シグナル伝達に目を転じると、Ras のように Syk の下流に位置するが、BLNK に依存しない経路がわかっており、それらを介在する新たな蛋白質の同定、機能の検索が進められてゆくのは当然であろう。

また、これらの基礎的知見をどう自己免疫疾患などの病態とむすびつけてゆくのか、BCR シグナル伝達に関わる蛋白質をターゲットとした治療薬の開発など、臨床への応用も重要な課題である。

文 献

- 1) Kurosaki, T.: Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 17: 555~592, 1999.
- 2) Ishiai, M., Kurosaki, M., Pappu, R., et al.: BLNK required for coupling Syk to PLC γ 2 and Rac 1-JNK in B cells. *Immunity*, 10: 117~125, 1999.
- 3) Fu, C., Turck, C.W., Kurosaki, T., et al.: BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity*, 9: 93~103, 1998.
- 4) Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., et al.: SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J. Exp. Med.*, 188: 791~795, 1998.
- 5) Goitsuka, R., Fujimura, Y., Mamada, H., et al.: BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J. Immunol.*, 161: 5804~5808, 1998.
- 6) Fu, C. & Chan, A.C.: Identification of two tyrosine phosphoproteins, pp 70 and pp 68, which interact with phospholipase C γ , Grb 2 and Vav after B cell antigen receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 272: 27362~27368, 1997.
- 7) Ishiai, M., Sugawara, H., Kurosaki, M. & Kurosaki, T.: Association of phospholipase C- γ 2 Src homology domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling. *J. Immunol.*, 163: 1746~1749, 1999.
- 8) Takata, M., Sabe, H., Hata, H., et al.: Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J.*, 13: 1341~1349, 1994.
- 9) Takata, M. & Kurosaki, T.: A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C- γ 2. *J. Exp. Med.*, 184: 31~40, 1996.
- 10) Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Ishiai, M., et al.: Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK: Functional significance of Btk-SH2 domain in B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood*, 94: 2357~2364, 1999.
- 11) Jiang, A., Craxton, A., Kurosaki, T., et al.: Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH₂-terminal kinase 1, and p 38 mitogen-activated protein kinase. *J. Exp. Med.*, 188: 1297~1306, 1998.
- 12) Hashimoto, A., Okada, H., Jiang, A., et al.: Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C- γ 2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH₂-terminal kinase, and p 38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *J. Exp. Med.*, 188: 1287~1295, 1998.