

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	KUROSAKI TOMOHIRO					
①研究代表者氏名	黒崎 知博			②所属研究機関・部局・職	独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・グループディレクター	
③研究課題名	和文	免疫システムにおけるシグナルの量的・質的制御				
	英文	Quantitative and qualitative regulation of cellular signaling in immune system				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	19,100	19,000	19,000	19,000	19,000	95,100
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
黒崎 知博	独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・グループディレクター	免疫学	BANKの機能解析			
疋田 正喜	独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・上級研究員	免疫学	BCAPの機能発現機序の解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>免疫系の最大の特徴は、その多様性及び寛容性である。無数の外来性抗原（非自己）を認識し反応する一方、自己に対する抗原に対して不応答性を示すという（寛容性）、極めてユニークなシステムを築き上げている。この機能を担っているのはB細胞の場合B細胞レセプター（BCR）である。したがって、BCRを介する抗原認識によって引き起こされるシグナル伝達機構の解明は、B細胞の分化・増殖・細胞死の運命制御機構を解明するための中心的課題である。特に、運命制御の観点からBCRシグナルの適切な量の供給がB細胞の分化・増殖を促進する上に必須で、過小・過剰のシグナルは増殖不全・細胞死を引き起こすと考えられており、このようなシグナルの量的・質的変換の分子機序の解明は必須である。</p> <p>BCRを介するシグナルの第一段階に複数のチロシンキナーゼ（PTK）群が関与することは明らかにされてきたが、これらPTK群のみの制御では多様な運命決定を説明することはできない。すなわち、PTK群によってリン酸化されるターゲット分子群の多様性を考えると、これらターゲット分子群がエフェクター群へのアダプターとして機能し、エフェクターへの変換効率を制御することにより、シグナルの量的・質的変換を司っているのではないかと考えられる。申請者らはこの仮説検証の第一段階として、既に機能的に重要なB細胞特異的アダプター分子BLNK, BCAPを世界に先駆けて単離してきた。本研究課題では、BLNK, BCAP分子に主眼をおき、これらアダプター分子の機能発現分子機序を明らかにしていき、この仮説の妥当性を検証することを目的とする。</p>						

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

BCR シグナルに関して、アダプター分子群 BLNK, BCAP および BCAP ファミリー分子群である BANK に的を絞り、アダプター群/エフェクター群間のカップリング機構を明らかにしてきた。具体的には、主として、以下に述べる 5 点を明らかにしてきた。

1) BCAP は BLNK と異なったメカニズムを用いて PLC γ 2 活性化を positive に制御している。

申請者らは、既にアダプター分子 BLNK を介する PLC γ 2 活性化メカニズムを明らかにしていた (Kurosaki and Tsukada *Immunity* 12, 1-5, 2000)。本期間中で新たに、もう一つのアダプター分子 BCAP も PLC γ 2 の活性化を制御していること (Yamazaki et. al. *J. Exp. Med.* 195, 535-545, 2001)。およびこの活性化機序が、1) PI3K の活性化により、間接的に PLC γ 2 を活性化する機構と、2) BCAP が PLC γ 2 に結合し活性化を制御するという直接的機構が存在することを明らかにした (図 1)。

2) BCAP は c-Rel の upregulation により、B 細胞の最終分化を制御している。

BCAP の個体レベルでの機能発現機序に関しては、BCAP 欠損マウスによる B2 B 細胞の最終分化 (FO B 細胞への分化) 障害の奥底に潜むメカニズムの解明に努めた。BCAP→エフェクター群→ターゲット遺伝子の発現により最終分化の制御が説明できうるのではないかという仮説の基に、ターゲット遺伝子群の同定を行った。その結果、NF- κ B 経路のコンポーネントである c-Rel が BCAP の重要なターゲットであることが判明した。事実、BCAP 欠損骨髄 B 細胞に c-Rel を導入すると、その B2 B 細胞の最終分化が回復した (Yamazaki and Kurosaki *Nat. Immunol.* 4, 780-786, 2003)。

3) BCAP ファミリー分子である BANK は BCAP と異なり B 細胞の活性化を negative に制御している。

BCAP とよく似た構造を有するアダプター分子 BANK が B 細胞で発現していることより、このノックアウトマウスを作成し、BANK の機能を検定した。予測に反して、BANK ノックアウトマウスでは TD 抗原に対する免疫応答反応の増強および胚中心の過形成 (図 3) が認められた。また、このノックアウト B 細胞では BCR, CD40 に対する増殖反応の上昇が認められ、このことが免疫応答反応上昇を引き起こしていることが推測された。これらのデータは BCAP は B 細胞を positive に制御するアダプター分子であるが、BANK は逆に negative に活性化を制御し、B リンパ球の過剰反応を防いでいる分子であることが判明した (Aiba et. al. *Immunity in press*)。

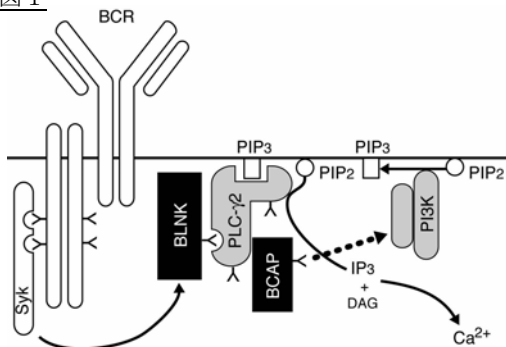
4) BLNK は PLC γ 2 のみならず他のエフェクター酵素 Vav を制御している。

PLC γ 2 とならんで Vav は BCR によって活性化され、B 細胞の分化、免疫応答に重要な役割を担っているエフェクター酵素である。Vav が *in vitro* 結合実験で、BLNK, Grb2 に結合するという申請者らのデータに基づき、実際 *in vivo* においてもこれらアダプター分子が Vav 活性化に重要な寄与をしているかどうかを、欠損 B 細胞を用いて検討した。その結果、1) 事実 Grb2, BLNK は Vav の活性化に相乗的に要求されること、2) この要求は、これらアダプター分子が Vav を細胞膜の中でも特にコレステロールの豊富な raft 分画へリクルートするためであることを明らかにした (Johmura et. al. *Immunity*, 18, 777-787, 2003) (図 2)。

5) BLNK の結合パートナー Grb2 はカルシウムを negative に制御する。

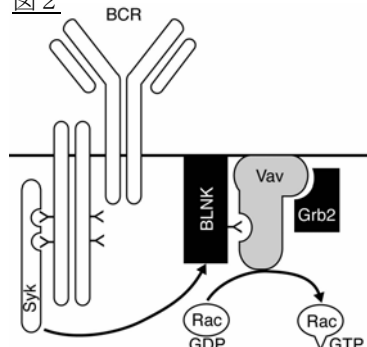
BLNK のチロシンリン酸化により PLC γ 2 カルシウム経路は positive に制御されるが、一方、BLNK の結合パートナー Grb2 はカルシウムシグナルを negative に制御し、BLNK がカルシウムシグナルの開始のみならず、シグナルの終焉にも関与していることが示された (Stork et al. *Immunity*, 21, 681-691, 2004)。

図 1



アダプター分子 BLNK, BCAP による PLC γ 2 活性化分子機構

図 2



BLNK と Grb2 はその協調作用によって、Vav を raft 分画に retention し活性化する。

図 3



BANK 欠損マウスでは、赤で染色される胚中心の過形成が見られる。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

BCR を介する細胞内シグナルネットワークは多くの細胞内・核内シグナル分子によって形成されているわけであるが、このうち、PTK, PLC γ 等のシグナル分子とは異なり、酵素活性を有しないシグナル分子群が、約半数以上占めると考えられている。これら内在性酵素活性を有しないシグナル分子群は今までブラックボックスのまま扱われており、いかに単離し、機能発現機序を解明するかが大きな課題のまま残されていた。BLNK, BCAP, BANK は、この課題を克服すべく申請者ら自身が開発してきた培養 B 細胞を用いた機能的シグナル分子単離法(Kurosaki *Ann. Rev. Immunol.*, 17, 555-592, 1999)を駆使して世界に先駆けて単離されてきたものである。

このような実績に基づき、本研究課題は平成 13 年度からはじまったものであり、BLNK, BCAP, BANK を中心的分子と位置付けて研究を展開することにより、アダプター分子群の新規かつ普遍的機能発現機序の提出につながるよう意図されたものである。

1) アダプター分子群による多重のメカニズムにより、エフェクター群の活性が **graded** (定量的) に制御されている。

4)で詳述するように、エフェクター群、例えば PLC γ 2 の活性化が、**graded** に制御されていることの生物学的重要性を明らかにしてきた。

したがって、どのようなメカニズムで PLC γ 2 の **graded** な活性化がおこなわれているのかは重要な問題である。本研究で、BCR シグナルの場合、前項の図 1 で示しているように、BLNK, BCAP が多重のメカニズムを用いて PLC γ 2 を **graded** に制御していることを明らかにすることができた。このことは、PLC γ 2 が酵素活性化部位以外に SH2, SH3 をはじめとする多くの蛋白質・蛋白質相互作用ドメインを有する必然性を説明しうるものである。また、この新規メカニズムはアダプター分子群の発現量等の定量的変異、また、アダプター分子のどの部位のリン酸化が生じるかという定性的変異、により下流のエフェクター群の活性化を **graded** に制御できる可能性を秘めるものであり、この分野の研究に重要なインパクトを与えている。事実 BCAP の機能発現機序解明の学術的インパクトは *Nat. Rev. Immunol.* 誌の Highlights (2, 224, 2002)及び *Nat. Immunol.* 誌の Roundup (3, 346, 2002)にも本成果が採りあげられたことよりも証明されている。

2) **positive** アダプター, **negative** アダプターが存在し、この組み合わせによりエフェクター群の適切な活性化が制御されている。

アダプター分子の中には、エフェクター群を **positive** に制御するものばかりではなく、**negative** に制御する分子が存在する。**Negative** アダプター分子は、**positive** アダプター分子とヘテロダイマーを形成することにより、下流のエフェクター分子への競合的阻害分子として働き、エフェクターの過剰活性化を防いでいるメカニズムが存在することを明らかにした。典型的な例として、BCAP (**positive**), BANK (**negative**)アダプター分子のノックアウトマウスを用いて証明した(Hikida and Kurosaki *Adv. Immunol.* 88, 73-96, 2005)。

3) アダプター分子群のうち、どれとどれを選ぶかという選択的組み合わせにより下流のエフェクター群の選択が決定される。

1)で述べたように、BLNK, BCAP という 2 つのアダプター分子は PLC γ 2 活性化に必須である。しかしながら、Vav の活性化をみると、この場合は BLNK, Grb2 という異なったアダプター分子群の協調的働きが必須である。このように、どのエフェクター群を選択するかというのを決定しているのは、アダプター分子群の **combination** が一つの重要なメカニズムであることを提唱した(Kurosaki *Nat. Rev. Immunol.* 2, 354-363, 2002)。

4) **graded** なエフェクター群の制御が、最終的に変化に富む生物学的反応として反映されている。

エフェクター群の **graded** な活性化が、どのような生物学的反応に変換されるかということは極めて重要な問題である。この問題は PLC γ 2 に的を絞りノックアウトマウスを駆使して検討した。すなわち、PLC γ 2 ノックアウトマウスにおいては、骨髄における B 細胞の分化は正常であるが、末梢における B 細胞の分化が著しく障害されている。この機構は B 細胞は PLC γ 2 が **dominant** に発現しているが、少量 PLC γ 1 も発現しているという事実によって説明しうる。すなわち、骨髄における B 細胞の分化には **pre-BCR** を介するシグナルが必須であるが、PLC γ 2 ノックアウトマウスにおいては、残存している PLC γ 1 により、**pre-BCR checkpoint** に必須のシグナル量が確保されている。しかしながら末梢における分化には、この残存する PLC γ 1 だけでは不十分である。このように、PLC γ の活性化は、それぞれの分化段階の B 細胞での要求量が異なるという新規の考えを提出した(Kurosaki *Curr. Opin. Immunol.* 14, 341-347, 2002)。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

(学術誌等発表論文)

1. Niiro, H., Maeda, A., Kurosaki, T. and Clark, E.A. The B lymphocyte adaptor molecule of 32 kilodaltons (Bam32) regulates B cell antigen receptor signaling and cell survival. (2002) *J. Exp. Med.* 195, 143-149
2. Inabe, K. and Kurosaki, T. Tyrosine phosphorylation of B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase is required for Akt activation in response to CD19 engagement. (2002) *Blood* 99, 584-589
3. Inabe, K., Ishiai, M., Scharenberg, A.M., Freshney, N., Downward, J. and Kurosaki, T. Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. (2002) *J. Exp. Med.* 195, 189-200
4. Yamazaki, T., Takeda, K., Gotoh, K., Takeshima, H., Akira, S. and Kurosaki, T. Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function. (2002) *J. Exp. Med.* 195, 535-545
5. Kurosaki, T. Regulation of B cell fates by BCR signaling components. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14, 341-347
6. Kurosaki, T. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. (2002) *Nat. Rev. Immunol.* 2, 354-363
7. Yasuda, T., Tezuka, T., Maeda, A., Inazu, T., Yamanashi, Y., Gu, H., Kurosaki, T. and Yamamoto, T. Cbl-b positively regulates Btk-mediated activation of phospholipase C- γ 2 in B cells. (2002) *J. Exp. Med.* 196, 51-63
8. Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Ford, D.L., Hurt, K.J., Bae, S.S., Suh, P-G., Kurosaki, T., Snyder, S.H. and Gill, D.L. Phospholipase C- γ is required for agonist-induced Ca^{2+} entry. (2002) *Cell* 111, 529-541
9. Chiu, C.W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T. and Chan, A.C. BLNK: molecular scaffolding through "cis"-mediated organization of signaling proteins. (2002) *EMBO J.* 21, 6461-6472
10. Kurosaki, T. Checks and balances on developing B cells. (2003) *Nat. Immunol.* 4, 13-15
- ⑪ Johmura, S., Oh-hora, M., Inabe, K., Nishikawa, Y., Hayashi, K., Vigorito, E., Kitamura, D., Turner, M., Shingu, K., Hikida, M. and Kurosaki, T. Regulation of Vav localization in membrane rafts by adaptor molecules Grb2 and BLNK. (2003) *Immunity* 18, 777-787
- ⑫ Yamazaki, T. and Kurosaki, T. Contribution of BCAP to maintenance of mature B cells through c-Rel. (2003) *Nat. Immunol.* 4, 780-786
13. Hikida, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Takezaki, M. and Kurosaki, T. Coupling between B cell receptor and phospholipase C- γ 2 is essential for mature B cell development. (2003) *J. Exp. Med.* 198, 581-589
14. Nishida, M., Sugimoto, K., Hara, Y., Mori, E., Morii, T., Kurosaki, T. and Mori, Y. Amplification of receptor signalling by Ca^{2+} entry-dependent translocation and activation of PLC γ 2 in B lymphocytes. (2003) *EMBO J.* 22, 4677-4688
15. Oh-hora, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Hikida, M. and Kurosaki, T. Requirement for Ras Guanine Nucleotide Releasing Protein 3 in coupling PLC- γ 2 to Ras in B cell receptor signaling. (2003) *J. Exp. Med.* 198, 1841-1851
16. Stork, B., Engelke, M., Frey, J., Horejsi, V., Hamm-Baarke, A., Schraven, B., Kurosaki, T. and Wienands, J. Grb2 and the non-T cell activation linker NTAL constitute a Ca^{2+} -regulating signal circuit in B lymphocytes. (2004) *Immunity* 21, 681-691
17. Aiba, Y., Oh-hora, M., Kiyonaka, S., Kimura, Y., Hijikata, A., Mori, Y. and Kurosaki, T. Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16612-16617

- ⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

（学術誌等発表論文の続き）

18. Kurosaki, T. Vav: a newcomer in innate receptor signaling. (2005) *Blood* 106, 389-390
19. Hikida, M. and Kurosaki, T. Regulation of phospholipase C- γ 2 networks in B lymphocytes. (2005) *Adv. Immunol.* 88, 73-96
20. Shinohara, H., Yasuda, T., Aiba, Y., Sanjo, H., Hamadate, M., Watarai, H., Sakurai, H. and Kurosaki, T. PKC β regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. (2005) *J. Exp. Med.* 202, 1423-1431
21. Aiba, Y., Yamazaki, T., Okada, T., Gotoh, K., Sanjo, H., Ogata, M. and Kurosaki, T. BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. (2006) *Immunity* 24, 259-268 v

（国際会議、学会等における発表）

1. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Regulation of phospholipase C- γ 2 and phosphoinositide 3-kinase pathways by adaptor molecules in B lymphocytes. B cell Immunobiology and Disease. Keystone Symposia April 17-22, 2001, Keystone, CO
2. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） B lymphocyte signalling. 11th International Congress of Immunology July 22-28, 2001, Stockholm, Sweden
3. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Regulation of PLC- γ 2/calcium pathway in B cells. EMBO Workshop on Lymphocyte antigen receptor and coreceptor signaling. May 4-8, 2002, Siena, Italy
4. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Regulation of B cell activation by adaptor molecules. Keystone Symposium on B cells and Antibodies: Laboratory to Clinic January 13-19, 2003, Keystone, Colorado, USA
5. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Adapters in B cell activation. FASEB 2003 Summer Research Conferences Signal Transduction in the Immune System June 14-19, 2003, Snowmass Village, Colorado, USA
6. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Ca²⁺ signaling in DT40 B cells. Gordon Research Conferences on Calcium Signalling July 6-11, 2003, Mout Holyoke College, South Hadley, Massachusetts, USA
7. Kurosaki, T.: 招待講演（セミナー） Regulation of PLC- γ 2 pathway by adaptor molecules in B lymphocytes. Twinbrook Campus Seminar Series 2003-2004, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, The National Institutes of Health January 27, 2004, Rockville, Maryland, USA
8. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Regulation of B cell development by PLC- γ 2. 7th International Symposium on Predictive Oncology and Intervention Strategies (2004 ISPO Symposium) February 7-10, 2004, Nice, France
9. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Function of BCAP in B cell development and immune responses 15th International Symposium on Molecular Biology of Hematopoiesis 8月6-7日、2004年、東京
10. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Ras activation mechanism in B lymphocyte. EMBO Workshop Lymphocyte antigen receptor and coreceptor signaling. September 11-14, 2004, Siena, Italy
11. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Basis of B cell receptor signaling TuBS Symposium on B Cells in Health and Disease. November 25-26, 2004, Turuk, Finland

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

（国際会議、学会等における発表の続き）

12. 黒崎知博: 招待講演（シンポジウム） Participation of BCAP in maintenance of mature B lymphocytes through functional coupling with c-Rel. 第34回日本免疫学会総会・学術集会 12月1-3日、2004年、札幌
13. Kurosaki, T., Yamazaki, T., Hikida, M.: 招待口頭発表(ワークショップ) Participation of BCAP in Maintenance of Mature B Lymphocytes through Functional Coupling with c-Rel. Keystone Symposia Meeting : B Cell Development, Function and Disease March 28-April 3, 2005, Steamboat Springs, Colorado, USA
14. Kurosaki, T.: 招待講演（シンポジウム） Participation of BCAP in maintenance of mature B lymphocytes through functional coupling with c-Rel. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2005 Mechanism of Immune Responses in Health and Diseases June 17-19, 2005, Yokohama, Japan
15. Kurosaki, T.: (招待講演) Action mechanisms of PLC γ and PKC β in B lymphocytes. Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes, 9th Joint Meeting, Signal Transduction Society(STS) November 10-12, 2005, Weimar, German
16. 疋田正喜、饗場祐一、大洞将嗣、黒崎知博: 招待講演(シンポジウム) Regulation of B lymphocyte development and activation by ras signaling cascade. 第35回日本免疫学会総会・学術集会、12月13-15日、2005年、横浜
17. Kurosaki, T.: 招待口頭発表(シンポジウム) Role of RasGRP3 in B Lymphocyte Development and Activation. Keystone Symposia : Lymphocyte Activation and Signaling January 6-11, 2006, Steamboat Springs, Colorado, USA