

①

胸腺細胞における *fyn* 遺伝子を中心とした
シグナル伝達系の研究

1996年3月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

生物環境科学専攻（主指導教官 能村 哲郎）

金沢 智

目次

第1章 胸腺T細胞におけるp59 fyn を中心としたシグナル伝達系の概観：序論

1. 非レセプター型チロシンキナーゼ	1
2. Fyn、p59 fyn	2
3. T細胞におけるシグナル伝達系	3
4. FAK、p125 FAK	4
図表	5
略語	8

第2章 fyn 遺伝子座への csk “ノックイン” によるCD4⁺CD8⁺胸腺細胞の欠損

1. 要旨	10
2. 序	10
3. 材料と方法	12
1) csk “ノックイン” ターゲッティングベクターの作成	
2) ES細胞相同組換え体の分離	
3) 変異マウスの作成	
4) RT-PCR法	
5) 組織染色	
6) フローサイトメトリー	
7) 増殖活性	
8) 細胞画分の分離	
9) キナーゼ活性及びウエスタンブロットティング法	
10) ZAP-70及びp120 abl のチロシンリン酸化	
4. 結果	16
1) csk “ノックイン” ターゲッティングベクター及び “ノックイン” マウスの作成	
2) csk “ノックイン” による fyn 遺伝子の欠損	

3) 胸腺細胞におけるFyn-Csk融合蛋白質	
4) <i>csk</i> “ノックイン” マウスの表現型	
5) p56 ^{lck} 及びp62 ^{yes} の自己リン酸化及びチロシンリン酸化活性	
6) ZAP-70及びp120 ^{abl} のリン酸化	
5. 考察	20
図表	22

第3章 CD4⁺CD8⁺胸腺細胞におけるp59^{fyn}とp125^{FAK}の相互作用

1. 要旨	39
2. 序	39
3. 材料と方法	41
1) 変異マウス	
2) 遺伝子型決定	
3) キナーゼ活性及びウエスタンブロットティング法	
4) 組織染色	
5) フローサイトメトリー	
4. 結果	43
1) <i>fyn</i> ^{-/-} <i>fak</i> ^{+/-} マウスの作成	
2) <i>fyn</i> ^{-/-} <i>fak</i> ^{+/-} マウスの胸腺細胞	
3) フローサイトメトリーによる胸腺細胞の分析	
4) p125 ^{FAK} のチロシンリン酸化及びそのキナーゼ活性、ならびに胸腺細胞タンパク質のチロシンリン酸化パターン	
5. 考察	45
図表	47

第4章 胸腺細胞に対するインテグリン刺激によるp125^{FAK}のチロシンリン酸化及びリン酸化活性の減少

1. 要旨	59
2. 序	59
3. 材料と方法	61
1) 細胞分離及び細胞培養	

2) 胸腺細胞におけるp125 ^{FAK} の発現	
3) フローサイトメトリー	
4) インテグリン刺激及びp125 ^{FAK} の発現、リン酸化、 自己リン酸化及びリン酸化活性分析	
5) 試薬	
4. 結果	6 3
1) 胸腺細胞のp125 ^{FAK} の発現	
2) 胸腺細胞における α 4及びLFA-1の発現	
3) 線維芽細胞に対するインテグリン刺激後のp125 ^{FAK} のリン酸化、 自己リン酸化活性及びリン酸化活性	
4) 胸腺細胞に対するインテグリン刺激後のp125 ^{FAK} のリン酸化、 自己リン酸化活性及びリン酸化活性	
5. 考察	6 5
図表	6 6

第5章 胸腺T細胞におけるp59^{fyn}を中心とした シグナル伝達系について：総括

1. まとめ	7 2
2. 論文 “概要”	7 4
図表	7 5
参考文献	7 6
謝辞	8 2

第1章 胸腺T細胞におけるp59^{fyn}を中心としたシグナル伝達系の概観：序論

1. 非レセプター型チロシンキナーゼ

src遺伝子は、がん遺伝子の1つとしてラウス肉腫ウイルスより単離同定され(Jove *et al.*, 1987)、Bishopらによるプロトオンコジーンの発見 (Bishop, 1991)、Hunterらによるキナーゼ活性の証明 (Hunter, 1991)によって、細胞の増殖、分化のメカニズムを解明するための鍵となる蛋白質であることが示された。またsrc遺伝子は、ファミリーを形成していて、現在までにSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼ (non-receptor type tyrosine kinase、NRPTK)として、Src (p60^{src})、Yes (p62^{yes})、Fyn (p59^{fyn})、Lyn (p53/56^{lyn})、Lck (p56^{lck})、Blk (p55^{blk})、Hck (p56/59^{hck})、Fgr (p59^{fgr})、Yrk (chickin)、Fyk (electricray)が知られている (Hardie *et al.*, 1995)。

その基本構造は、N-末端の膜結合性を示すミスチレイション及びパルミチレイション部位を含むユニーク領域、プロリンとの結合領域となるSH(src homology) 3領域、チロシンリン酸化部位と結合するSH2領域、チロシンリン酸化活性を持つカタリティック (触媒) 領域からなる。図1-1にこれらSrcファミリーNRPTKを含む代表的なNRPTKを示した。この中でCskは、Srcファミリーと相同性があるが、膜結合領域が無く、細胞内に局在するものと考えられる。p125^{FAK} (focal adhesion kinase, FAK)は、カタリティック領域の他は、特にNRPTKにユニークな領域を持たない。ZAP-70は、Sykファミリーに含まれるNRPTKで、2つのSH3領域を持つ。この他にJakファミリー、Tecファミリー、Fes/Fps、Abl等のNRPTKが知られている。

Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの活性制御機構は、図1-2に示すようにCskが、C-末端のチロシンをリン酸化することにより、SrcファミリーNRPTKのコンフォメーション (配座) を変化させ、最終的に不活化するが、この不活化は可逆的で、CD45等のPTPase (protein phosphatase)により脱リン酸化されると、再び活性化すると考えられている。すなわちSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼは、Cskのチロシンリン酸化活性とPTPaseの脱リン酸化活性により活性化と不活性化が制御されていて、この機構が、リガンド/レセプターを介したシグナル伝達系のオン/オフの制御機構に密接に関与しているというのである。

またこの他に、SrcファミリーNRPTKによるFAKの自己リン酸化活性の制御も知られているが、その機構についてはまだ不確定な部分が多い。この点に関して本研究 (第3章参照) から、p59^{fyn}は、胸腺細胞においてp125^{FAK}のリン酸化の制御を行うものの、自己リン酸化活性の制御は行っていない事を示した。

2. *Fyn*、*p59^{fyn}*

*fyn*遺伝子は、上述のSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼに属する遺伝子として、*v-yes*や*v-fgr*をプローブとしてヒト遺伝子ライブラリーから単離された遺伝子である。当初*syn* (*src/yes*-related novel gene)、*slk* (*src*-like kinase)と呼ばれたが、現在は*fyn* (*fgr/yes*-related novel gene)に統一されている。またm-RNAの解析からエクソン7Aを使用する脳型のFynと胸腺型のFynが存在することが知られている。その機能は、主に免疫系との関連が強く示唆されている。例えば自己疾患マウス (lymphoproliferation、lpr)のT細胞ではFynの発現が高いことや、T細胞及びB細胞の抗原レセプターに会合していることが知られている。我々を含め3つのグループにより*fyn*遺伝子ノックアウトマウスが作成されているが、その解析から*p59^{fyn}*は胸腺及び脾臓の成熟T細胞の発達に関与すること及び脳における長期増強 (long term potentiation, LTP)の減少等に強く関与していることが示された (Grant *et al.*, 1992)。この他にFynは、ミエリン形成に関与すると考えられるMAG蛋白質 (myelin-associated glycoprotein)と会合することが知られている (Umemori *et al.*, 1994)。しかしこれら*p59^{fyn}*を含むSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの表現型は、その発現量領域から予想される表現型に対し比較的軽微であることから、相互に機能的な相補性(redundancy)をもつことが予想される様になった。現在この機能的相補性をより理解するために、SorianoらはSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼノックアウトマウス間の掛け合わせによる解析を行った (Stein *et al.*, 1994; Lowell *et al.*, 1994)。しかしながらこれらマウス間の交配による解析からは、思いの外、相補性の確認の域を越えず、各遺伝子間の役割の違いを解明できなかった。そこで本研究 (第2章参照) では、“ノックイン” という新たな方法を開発し、これを利用することで、まず*fyn*遺伝子の機能解析を試みた。この新規な方法よりマウス間の交配では得られなかった新たな結果が得られた。今後本研究において用いた“ノックイン” を利用する方法は、各遺伝子の役割の解明に近づく意味において、より有効な手段として利用されていくものと期待される。

3. T細胞におけるシグナル伝達系

T細胞におけるシグナル伝達系の導入は、TCR ζ /CD3-p59^{fyn}、CD4/CD8-p56^{lck}を介した抗原認識シグナルの伝達系（第1シグナル）とLFA-1、CD28、CD5等のcostimulatorによる第2シグナル（以下costimulatory signal）を通る複合的な経路からなる。本論文の内容に準じたモデルを図1-3に示す。主要組織適合性複合体(MHC, major histocompatibility complex) IまたはIIと抗原からなる複合体と、TCR/CD4またはCD8の複合体とが会合し、シグナルが伝わる。この時、主としてDP (double positive, CD4⁺CD8⁺)細胞かSP (single positive, CD4⁺CD8⁻またはCD4⁻CD8⁺)細胞への経路において、ポジティブセレクションとネガティブセレクションが起こると考えられている。この際のTCR ζ /CD3複合体のリン酸化の程度がその後の不応答状態（抗原に対する反応性を失った状態、clonal anergy）の程度を確定すると考えられている (Lancaster *et al.*, 1994)。またこの刺激は、T細胞のクローン選択に対し不完全な刺激であり、costimulatory signalを介した系がこれを補うと推定されている。さらにこれら膜表面型のレセプターに対する刺激は、次に起こる細胞膜直下の細胞内イベントに続く事になる。ここでは、非レセプター型チロシンキナーゼ特に、p59^{fyn}、p56^{lck}とZAP-70が重要な働きを行うと考えられている。またこれらの機能的制御は、前述の様にCD45、SH-PTP2等のPTPase及びp50^{csk}により行われていると予想されている。さらにこれらの下流にPI3キナーゼ (PI3-K)、p120^{cbl}、p125^{FAK}等が存在し、核内へとシグナルを伝達し、Ca²⁺の上昇、IL-2産生の亢進等の細胞内のイベントを進めていくと思われる。実際のT細胞クローンの選択は、クラスII MHC拘束を受けCD4⁺CD8⁻細胞よりヘルパーT細胞へ、クラスI MHC拘束を受けCD4⁻CD8⁺細胞よりキラーT細胞へとそれぞれ分化成熟し、最終的な機能を獲得すると考えられている。またそのクローン選択は、少なくとも以下のような2つの段階を踏むことになる。

1) 自己免疫性を排除する：T細胞群より自己反応性のあるものを除くネガティブセレクション (negative selection)の過程

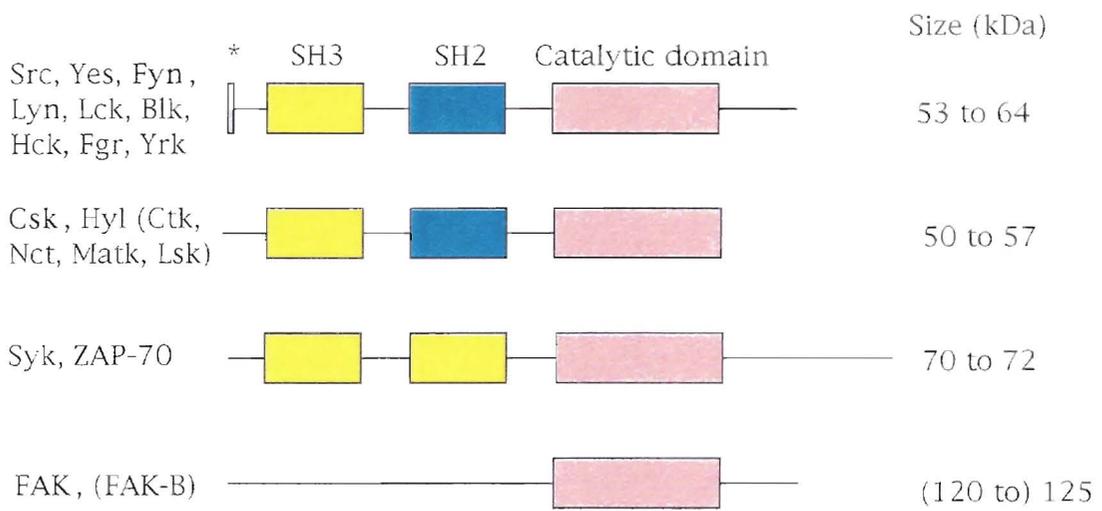
2) TCRは必ずMHC上に提示されたペプチド抗原を認識するので、自己MHCに対しある程度の結合親和性を持たなければならない：自己MHC親和性クローンの選択、ポジティブセレクション (positive selection)の過程

これらT細胞のポジティブセレクション及びネガティブセレクションに対し非レセプター型チロシンキナーゼを介したシグナル伝達系がどのように関わるのかについて、本論文第5章において議論する。

4. FAK、p125^{FAK}

p125^{FAK}は、v-srcによって形質転換した細胞で強くチロシンリン酸化される125Kdaの蛋白質として同定された。NRPTKに属するもののSH2及びSH3といった特徴的な構造を持たず、キナーゼ領域を除き他のNRPTKと全く相同性がない（図1-1参照）。p125^{FAK}は、おそらくインテグリンと結合する形で細胞接着斑(focal adhesion)に存在すると考えられている。細胞接着斑は、細胞と細胞外基質 (extra cellular matrix, ECM)との接着点に見られる構造である。細胞内ではこの領域を起点として細胞内骨格系蛋白質が集合し、細胞の極性や運動性を制御している。ECMのインテグリンへの結合とp125^{FAK}のチロシンリン酸化及び活性化の間には強い相関性があり、例えばv-srcによるp125^{FAK}のチロシンリン酸化の亢進は、細胞接着斑の喪失を伴う。FAK欠損細胞は、非極性な細胞形態を示す。干渉顕微鏡 (Interference refraction microscopy)により細胞接着斑の形成を確認し、パキシリン、ビンキュリン、タリンの細胞内分布について調べたところ、FAK欠損細胞では、予想に反し細胞接着斑の形成よりは、そのターンオーバーに働く事が分かった。FAK欠損中胚葉細胞は、この細胞接着斑のターンオーバーの低下から非極性な細胞形態にとどまり、運動能が低下すると考えられる。

p59^{lyn}との相互作用については、これまでのところ線維芽様細胞における免疫沈降物複合体でのデータが知られているのみで全く解明されていなかった。しかし本論文では胸腺細胞で、Grantらによって神経細胞で、p59^{lyn}とp125^{FAK}間の相互作用が確認された(Grant et al., 1995; Kanazawa et al., in press)。またT細胞においては種々のインテグリンが発現していて、重要なものとしてLFA-1、VLA-4等が知られている。特にLFA-1は、ICAM-1,2,3と特異的に結合し、副刺激の伝達系として働くと考えられる。本論文の第3章には、p59^{lyn}とp125^{FAK}間の相互作用について、また第4章においては、インテグリンとp125^{FAK}間の相互作用について論じる。



*: myristylation and palmitylation sites

Other NRPTKs: Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2, hopscotch (Drosophila);
Itk (Tsk), Btk, Tec; Fes/Fps, Fer; Abl, Arg

図1-1 非レセプター型チロシンキナーゼの構造

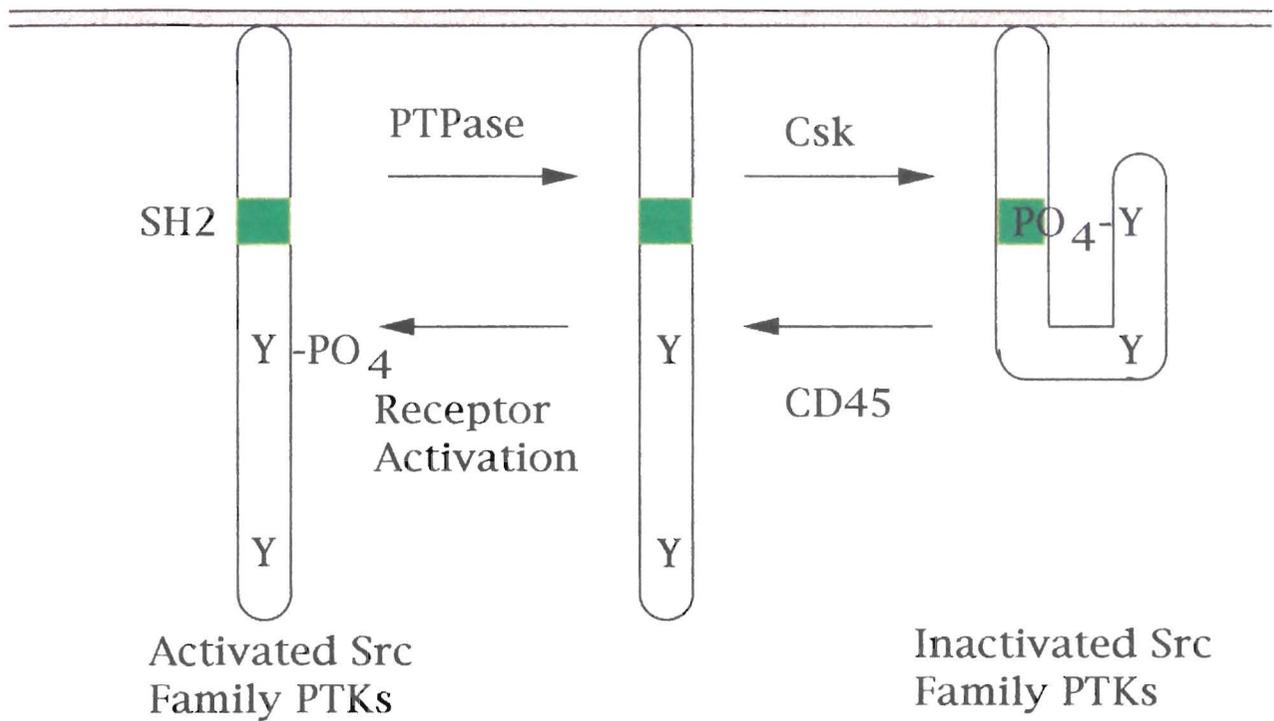


図1-2 非レセプター型チロシンキナーゼのCsk及びPTPaseによる制御

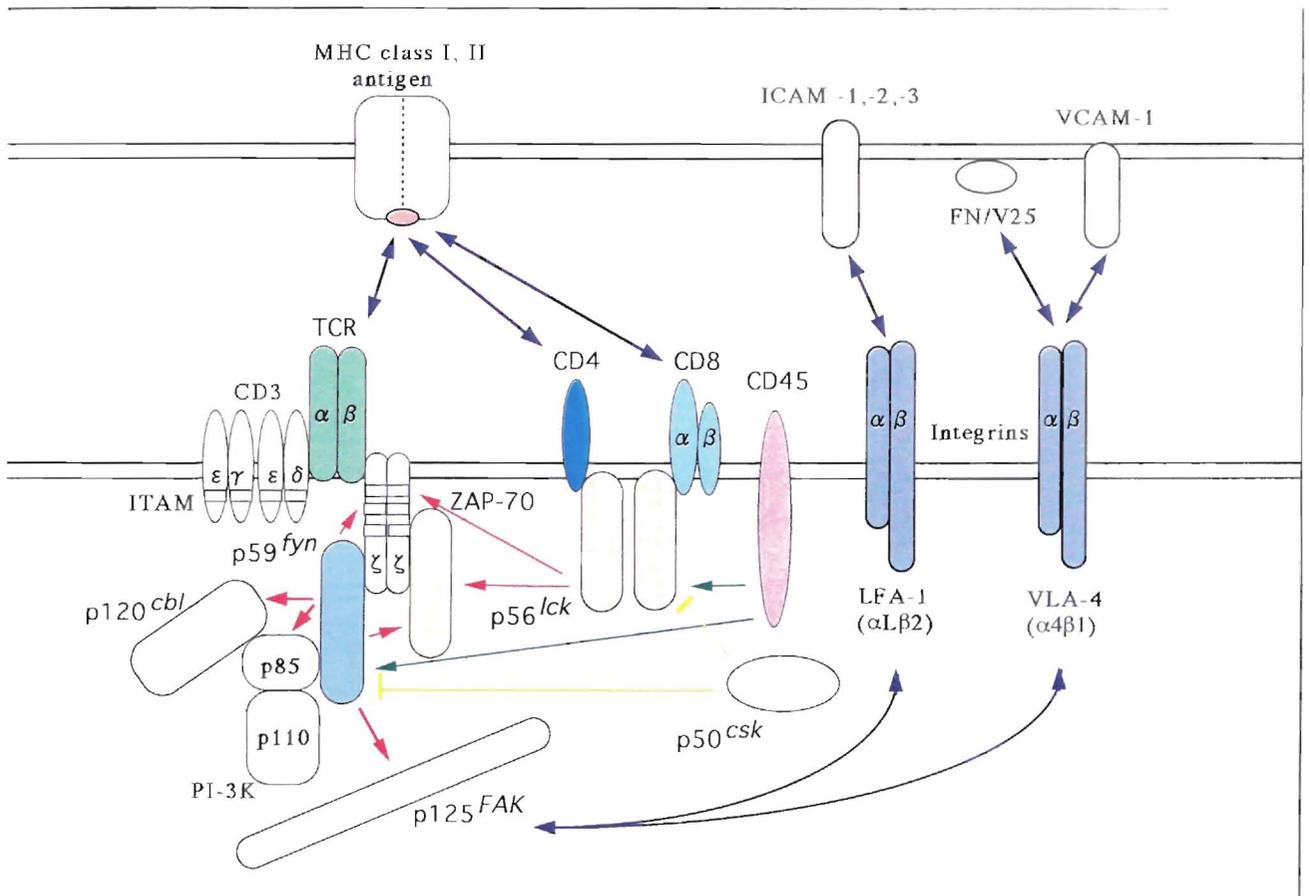


図1-3 T細胞におけるシグナルトランスダクションのモデル

略語

APC: antigen presenting cell
CD: cluster of differentiation
DMEM: dulbecco's modified eagle's medium
DN: double negative cell (CD4⁻CD8⁻ cell)
DP: double positive cell (CD4⁺CD8⁺ cell)
DT: diphtheria toxin
ECM: extracellular matrix
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
ES: embryonic stem
FACS: fluorescence activated cell sorter
FAK: focal adhesion kinase
Fyn: *fgr/yes*-related novel gene
HEPES: N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HSA: heat stable antigen
ICAM: intercellular adhesion molecule
IL-2: Interleukin-2
LFA-1: lymphocyte function associated antigen-1, Cd11a/CD18
LPAM: lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule
lpr: lymphoproliferation
LTP: long term potentiation
MAG: myelin-associated glycoprotein
MHC: major histocompatibility complex
NRPTK: non-receptor protein tyrosine kinase
PBS: phosphate buffered saline
PI3-K: phosphatidyl inositol 3-kinase
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
PTPase: protein phosphatase
RAG: recombination-activating gene 2
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

SP: single positive cell ($CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$ cell)

SH: src homology

TCR: T cell receptor

TPA: tetradecanoyl phorbol acetate

VLA: very late antigen

ZAP-70: ζ (zeta) associated polypeptide of 70Kda

第2章 *fyn*遺伝子座への*csk* “ノックイン”によるCD4⁺CD8⁺胸腺細胞の欠損

(Impaired development of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by *csk* “knock-in” into *fyn* locus)

1. 要旨

p59^{*fyn*} is one of the Src-family kinases that has been thought to play an important role in signaling through T cell receptor. However, Fyn deficiency has had no overt defects *in vivo* on T cell development, nor has it caused any changes in the phosphorylation status of molecules which have been proposed as p59^{*fyn*} substrates. This could be explained as being due to compensation of Fyn deficiency by other Src family kinases. Here we have “knocked-in” *csk* gene, a negative regulator of Src family kinases, into *fyn* locus to challenge the problem of redundant functions among Src family kinases. The *csk*-“knock-in” mice displayed atrophy of the thymic cortex and impaired development of CD4⁺CD8⁺ thymocytes. This was concomitant with decrease in tyrosine phosphorylation of ZAP-70 and *cbl* proto-oncogene product.

2. 序

Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの1つであるp59^{*fyn*}は、T細胞に強く発現していて、T細胞の分化増殖に関与していると考えられている (Veillette *et al.*, 1988; Levin *et al.*, 1993; Perlmutter *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1994; Rudd *et al.*, 1994)。T細胞レセプター (TCR)/CD3複合体は、1) Ti鎖 (α β 、または γ δ) : 主要組織適合抗原及び抗原複合体に対する結合部位と 2) CD3鎖 (γ 、 δ 、 ϵ)、及び 3) ζ ダイマー鎖 (または ζ 鎖及び η 鎖) からなる複合体である (図1-1参照)。Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼのなかではp59^{*fyn*}のみがこのTCR/CD3複合体の ζ ダイマー鎖と結合していることが知られている。また ζ ダイマー鎖は、特徴的なIRAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifsまたはTAM、tyrosine-based activation motif、YXXLX (6-8) YXXL) コンセンサス配列を6つ持ち (Samelson *et al.*, 1992)、T細胞への抗原刺激後、p59^{*fyn*}またはp56^{*lck*}によりこのアミノ酸配列 (YXXL)がリン酸化される。さらにこの刺激は

ZAP-70等のリン酸化を通して下流に伝達されていくと考えられている。またp59^{fyn}は、Thy-1レセプターやCD2等のT細胞表面抗原 (costimulator)の膜内部分に結合していることも知られているが、その機能については未だ明らかにされていない。さらに*in vitro*の実験系からT細胞内におけるp59^{fyn}のシグナル伝達系の下流の基質としては、ZAP-70、*cbl*プロトオンコジーン (*cbl* proto-oncogene, p120^{cbl})、CD3複合体等が知られている (Samelson *et al.*, 1990, 1992; Sarosi *et al.*, 1992; Gauen *et al.*, 1992)。しかし、リン酸化基質及びこれらに関わるシグナル伝達系におけるp59^{fyn}の役割が全て解明されているわけではない。

これまでにp59^{fyn}自身の機能を明らかにするため、ジーンターゲッティング法を用いたFyn欠損マウス (*fyn*^{z/z})が作成された (Yagi *et al.*, 1993b; 1993c)。しかしながら*fyn*^{z/z}マウスの胸腺細胞は、*in vitro*系ではT細胞の増殖の阻害、IL-2 (interleukin-2) 産生の減少、T細胞刺激後の細胞内遊離Ca²⁺濃度の減少等を示したが、*in vivo*の系では胸腺構造の異常やT細胞集団の変化等といった顕著な表現型を示さなかった。これはp59^{fyn}欠損を他のSrcファミリーリン酸化蛋白質 (T細胞においては、特にp56^{lck}及びp62^{yes}の発現が強い) が補い、結果的に顕著な機能欠損を示さないためと考えられている (Stein *et al.*, 1992; Appleby *et al.*, 1992)。

一方、Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼを阻害的に調節しているリン酸化蛋白質としてp50^{csk}が知られている。ジーンターゲッティングにより作成されたCsk欠損マウスは、初期胎仔形成時に致死性を示した (Imamoto *et al.*, 1993; Nada *et al.*, 1993)。さらにこのCskホモ欠損の胎児を用い、p60^{src}、p59^{fyn}、p53/56^{lyn}の活性を調べると全て上昇していた。さらにRAG-2 (recombinant-activating gene 2)及び*c s k* 遺伝子欠損マウス間のキメラを用いることにより初期T細胞の分化異常も示された (Gross *et al.*, 1995)。これらの異常は、*csk* 遺伝子欠損によるSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの活性化が主な原因と考えられる。

そこでFyn欠損マウスで見られたような、Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの持つ機能相補性を排除する目的で、この*csk* 遺伝子を*fyn* 遺伝子座に”ノックイン”した。“ノックイン”により導入された外来性のCsk蛋白質が、Fyn欠損を補おうとする他のSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの機能的相補性を阻害的に調節するので、胸腺細胞内におけるp59^{fyn}本来の役割を明らかにできると考えた。

3. 材料と方法

1) *csk* “ノックイン” ターゲッティングベクターの作成

csk “ノックイン” ターゲッティングベクター (*pFCNeoDT*)は、完全長のrat *csk* cDNA (*cCsk*) (Nada *et al.*, 1991)を*fyn*遺伝子座のエクソン3の*Bgl* II内にインプレームに挿入した。ターゲッティングベクターの作成は、Yagiらによる*fyn*遺伝子座のエクソン3への*LacZ*遺伝子の挿入法 (Yagi *et al.*, 1993c, 1994)に従って行った。*neo^r* (Neo)遺伝子、ポリアデニレイション シグナルを除いた*pgk-1*遺伝子のプロモーター領域、ジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子らをターゲッティングベクター3'末端側に挿入し、相同組換え時のポジティブセクション、ネガティブセクションに使用した (Yagi *et al.*, 1993c)。

2) ES細胞相同組換え体の分離

ターゲッティングベクターは、*Not* Iにより直鎖状にし、12 nM/ 1 x 10⁷ cell/ 0.5 ml, HEPES緩衝液の条件下でTT2 ES (Embryonic stem cell)細胞にエレクトロポレーションを行った (Yagi *et al.*, 1993)。G418 (150mg/ ml)による選別の後、サザンブロットリング法により相同組換え体を選別した。サザンブロットリング法には、*fyn*遺伝子イントロン3の*Ssp* I - *Sph* Iフラグメントをプローブに用い、*Eco*R I消化のゲノムDNAで行った (図2-1参照)。正常アレル (allele、対立遺伝子) より4.7 kilobase (kb)、変異アレルより3.5 kbのバンドが検出されることになる。240個のG418抵抗性クローンの内6つのクローンで3.5 kbのバンドが検出された。ランダムインテグレーションのない事は、種々の制限酵素による切断後、異なるプローブを用いサザンブロットリング法により確認した。

3) 変異マウスの作成

C57/B6マウスを用い、2系統の組換え体ES細胞 (Yagi *et al.*, 1993a)より変異マウスを独立に作成した。遺伝子型は、マウスの尾より抽出したゲノムDNAを用いPCR法により確認した。PCR法は、AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer)を用い、次の条件で行った。ホットスタートは、95℃で7分間、75℃で10分間、50℃で2分間、72℃で15分間行い、この後に、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間のサイクルを30回行った。プライマーとして、p1 (5'-GATGACCTGAGTTTTCACAAAGGAG-3')とp2 (5'-CGTGCACACTTAAGAAGTAGGCTC-3')から正常アレルに対する260bpの断片、p2とp3 (5'-TGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG-3')から変異アレルに対する420bpの断片が得られる (図2-1参照)。

4) RT-PCR法

胸腺細胞よりオリゴ d T 結合マグネチックビーズ法 (Dynal)により胸腺細胞由来の Poly(A)⁺ RNAs を精製した。更に "SuperScript II" 逆転写酵素により cDNA を得た (Ilić *et al.*, 1995)。PCR法は、遺伝子型決定に使用したのと同条件のホットスタートの後、94℃で1分間、50℃で1分間、72℃で3分間のサイクルを35回行った。プライマーとして p4 (5'-AGTGACACCTGTTTGTGGCGCTTTA-3') と p5 (5'-CAACTTACGAGCTGTTCAA-3') から *fyn* 転写産物に対する 96bp の断片、p4 と p6 (5'-CCTTTGCAGAAGGGAAGGTCTTG-3') から *fyn-csk* 転写産物に対する 199bp の断片が得られる (図 2-1 参照)。PCR法は、半定量的に行った (Keller *et al.*, 1993)。

5) 組織染色

胸腺、脾臓、パイエル板は、ブアン固定後、アルコール脱水を行い、パラフィン (Oxford) に包埋した。5 μm の厚さに切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

6) フローサイトメトリー

胸腺細胞は、冷却した PBS 緩衝液中でピンセット等を用い胸腺組織より分離した。単一細胞となる様ピペッティングした後、孔径 100 μm のメッシュを通した。胸腺細胞懸濁液は、抗 CD32/16 (FC γ II/III レセプター) 2.4G2 抗体 (PharMingen) 0.5 mg/ 10⁶ 細胞で処理した後、fluorescein isothiocyanate 標識抗 CD4 RM4-5 抗体、ビオチン化抗 CD8 53-6.7 抗体、R-phycoerythrin 標識抗 CD3 ϵ 145.2C11 抗体 (PharMingen) で処理した。抗体処理後、FACS vantage (Becton Dickinson) を用い分析した (Okada *et al.*, 1993)。

7) 増殖活性

生後 21 日齢のマウスの胸腺細胞を用いた。この時期、*csk* "ノックイン" マウス (*fyn^{csk}/csk*) においても正常な T 細胞集団が観察される (図 2-10 参照)。胸腺細胞 (2 x 10⁶ 細胞) を 10% 牛胎児血清、非必須アミノ酸 (Flow Lab.) を含む RPMI1640 培養液、200 ml で培養した。胸腺細胞は、1 ng/ ml PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma)、20 mg/ ml 抗マウス CD3 ϵ 145.2C11 抗体、500 ng/ ml ionomycin (Calbiochem) で刺激した。66 時間後に 1 mCi の [³H] thymidine を加え、6 時間さらに培養する。その後、セルハーベスターを用い細胞をガラスフィルター上に集める。 [³H] thymidine の細胞への取り込みは、Aloka LSC-3050 液体シンチレーションカウンターで測定した。

8) 細胞画分の分離

胸腺細胞 (1×10^8 細胞) をPBS緩衝液で洗浄した後、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、10 mM NaCl、1 mM Na_3VO_4 、100 U/ml aprotininを含む低張な緩衝液で処理した。氷上で30分間静置した後、低回転遠心により核のみを除去した。次に15000 g、15分間遠心し、膜分画と細胞質分画を分離した (Black *et al.*, 1993)。最終的にペレット (膜分画) は、抽出用TNE緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、100 mM NaCl、1 mM Na_3VO_4 、1% Nonidet P-40、100 U/ml aprotinin)で溶解した。

9) キナーゼ活性及びウエスタンブロッティング法

21日齢のマウスから胸腺細胞の細胞溶解物を得た。p59^{fyn}のキナーゼ活性は、 5×10^7 の胸腺細胞から細胞溶解物を得た後、p59^{fyn}の特異的な領域に対する抗体 (Fyn301、Wako)を用い免疫沈降した。p56^{lck}及びp62^{yes}におけるキナーゼ活性にはそれぞれ、抗p56^{lck}抗体 (Upstate Biotechnology Inc. (UBI)) 及び、抗p62^{yes} 3H9抗体 (Wako)を用いた (Nada *et al.*, 1991, 1993)。Fyn-Csk融合蛋白質のCsk活性の測定は、キナーゼ活性欠損p60^{src} (p60^{R295})を用いて行った (Nada *et al.*, 1991)。またTCR ζ /CD3-p59^{fyn}、CD4/CD8-p56^{lck}をそれぞれの抗体を用い会合させた後、p56^{lck}のキナーゼ活性を検出した。 3.5×10^7 の胸腺細胞を抗CD4 GK1.5抗体 (Tamura *et al.*, 1993) 及び抗マウスCD3 ϵ 145.2C11抗体存在または非存在下で4℃、60分間処理する。さらに、プロテインGセファロース (Pharmacia) を添加し、4℃、60分間処理した後、37℃、10分間処理した。これらの胸腺細胞を抽出用TNE緩衝液に溶解後、プロテインGセファロースを遠心除去し、細胞溶解物を得た。最終的に抗p56^{lck}抗体を用い免疫沈降を行い、p56^{lck}キナーゼ活性を測定した。Fyn-Csk融合蛋白質のウエスタンブロッティング法は、以下のように行った。胸腺細胞の全分画及び抗p59^{fyn}抗体を用い免疫沈降した細胞画分 (1×10^6 細胞)を、SDS-PAGE (8%)を行った後、ニトロセルロースフィルター (Shleicher & Schuell) に転写した。フィルターは、5% スキムミルク、Tween-20/TBS緩衝液でブロッキングし、抗p50^{csk}抗体または抗アクチン抗体で処理した。Hyperfilm-ECL (enhanced chemiluminescence、高感度化学発光)、ECL detection systemTM (共にAmersham) を用い検知した。

10) ZAP-70及びp120^{abl}のチロシンリン酸化

抗CD3 ϵ 145.2C11抗体で、37℃、5分間TCR刺激した (Straus *et al.*, 1993)。

刺激した胸腺細胞及び無刺激の胸腺細胞をTNE緩衝液にて溶解した。全細胞抽出液 (1×10^8 細胞または 2.5×10^7 細胞) は、それぞれ抗ZAP-70抗体 (Chan *et al.*, 1992)及び抗p120^{cb1}R2抗体 (Black *et al.*, 1993)で免疫沈降し、SDS-PAGE (8 %)を行った後、ニトロセルロースフィルター (Shleicher & Schuell)に転写した。抗リン酸化チロシン抗体 (UBI)で処理した。さらにリプロービング後、それぞれ抗ZAP-70抗体及び抗p120^{cb1}R2抗体で処理した。チロシンリン酸化の程度は、ECL detection systemで検知した後、MCIDイメージングアナライザー (Fuji)で測定した。

4. 結果

1) *csk* “ノックイン” ターゲッティングベクター及び “ノックイン” マウスの作成

*c-Csk*遺伝子を *fyn*ターゲッティングベクターにインフレイムに導入し、TT2 ES細胞の *fyn*遺伝子座への相同組換えを行った (図2-1)。2回のエレクトロポレーションより240個のG418耐性クローンが得られた。これらの中から最終的には6つの独立した相同組換え体クローンを得た (Table 1)。相同組換え体の確認は、サザンブロットリング法により行った。正常アレルより4.7 kb、変異アレルより3.5 kbのバンドが得られた (図2-1、2)。

さらにこれらのES細胞を8細胞期の卵に注入し、2系統の *csk* “ノックイン” マウス (*fyn^{csk}/csk*) を樹立した。樹立後のマウスの遺伝子型は、正常アレルより260bp (プライマー p1, p2使用)、変異アレルより420bp (プライマー p2, p3使用) のバンドが得られるようにデザインされたPCR法により同定した (図2-1、3)。マウス交配の結果生じた子孫の遺伝子型は、全てメンデルの法則に従った。また、この2系統のマウスの間に大きな表現型の差は無かった。

2) *csk* “ノックイン” による *fyn*遺伝子の欠損

csk “ノックイン” マウスの胸腺細胞において、*fyn*遺伝子の欠損をRT-PCR法により確認した。*fyn*遺伝子m-RNAは、正常アレル、*fyn^{+/+}*からは96bp (プライマー p4, p5使用) のバンドが得られるようにデザインされており、*fyn^{z/z}*及び *fyn^{csk}/csk* においては検出されなかった (図2-1、4)。またFyn自身による自己リン酸化活性及びエノラーゼを用いたチロシンリン酸化活性は、同様に *fyn^{z/z}*及び *fyn^{csk}/csk* において検出されなかった。これらの結果から、*csk* “ノックイン” マウスにおける *fyn*遺伝子及びFyn蛋白質の機能的欠損を確認した (図2-5)。

3) 胸腺細胞におけるFyn-Csk融合蛋白質

csk “ノックイン” ベクターの構成からミリスチレイション部位及びパルミチレイション部位 (Resh, 1994) を含むp59 *fyn*ユニーク領域 (84アミノ酸残基) 及びSH3ドメインの一部 (24アミノ酸残基) を含む110アミノ酸残基のp59 *fyn*N-末部分とp50 *csk* (450アミノ酸残基) との融合蛋白質の発現が期待される (図2-6) (Yagi et al., 1993c, 1994)。また発現が、予想される融合蛋白質は、63.5Kdaである。そこで、RT-PCR法とウエスタンブロットリング法によりこの融合蛋白質の確認を行った。まず、*fyn*遺伝子エクソン3内に存在する配列部分よりなるプライマー (p4) と *c-Csk*遺伝子内の配列部分よりなるプライマー (p6) を用いRT-PCR法を行ったが、この

際、変異アレルより199bpのバンドが得られるようにデザインした。実際に *fyn^{csk/csk}* 及び *fyn^{csk/+}* においてのみ *fyn-csk* の融合m-RNAが検出された (図2-1、4)。

実際に胸腺細胞の全細胞抽出液を用い、抗p50^{csk}抗体によるウエスタンブロッティング法を行うと、*fyn^{csk/csk}* 及び *fyn^{csk/+}* において約64KdaのFyn-Csk融合蛋白質のバンドが確認できた (図2-7)。

さらにFyn-Csk融合蛋白質の細胞内局在を調べる為に胸腺細胞を膜分画及び細胞質分画に分け、抗p59^{fyn}抗体を用い免疫沈降を行った。次に、抗Csk抗体でウエスタンブロッティング法を行うと、Fyn-Csk融合蛋白質は、p59^{fyn}の局在と同様細胞質内ではなく、細胞膜上のみ存在していることが分かった (図2-8) (Samelson *et al.*, 1990; Sarosi *et al.*, 1992; Gauen *et al.*, 1992; Alland *et al.*, 1994)。

さらにこのFyn-Csk融合蛋白質のCsk蛋白部分が実際にチロシンリン酸化活性を持つかどうかを、p60^{R295}を基質として確認した。基質としたp60^{R295}は、p60^{src}の295番目のLysをArgに変換したもので、結果として自己リン酸化活性が消失し、C末のTyrのみがCskによりリン酸化されることになる (Nada *et al.*, 1991)。リン酸化活性は、対照とした *fyn^{z/z}* には見られず、*fyn^{csk/csk}* のみにおいて検出された (図2-9)。これらの結果から、*csk* “ノックイン” マウスにおいて “ノックイン” した外来性のFyn-Csk融合蛋白質の発現、細胞膜上への局在、及びこのFyn-Csk融合蛋白質は、Csk活性を持つことが同時に示された。

4) *csk* “ノックイン” マウスの表現型

csk “ノックイン” マウスは、Fyn欠損マウスに見られなかった顕著な表現型を示した。*fyn^{csk/csk}* のみにおいてその胸腺細胞数が、生後21日齢を境に急激に減少し始め、25日齢で約1/10、29日齢では約1/100程度まで減少することが見いだされた (図2-10)。さらに胸腺のヘマトキシリン/エオジン染色による組織像から、この減少は特に皮質部分の胸腺細胞の減少によるもので、髄質部分は比較的正常に維持されていることが分かった (図2-11)。

胸腺萎縮以外に、脾臓及びパイエル板においても細胞数の減少が確認された (図2-12、13)。特に脾臓においては、白脾髄 (white pulp) の形成が悪く、赤脾髄 (red pulp) 及び血管等のみからなる組織像を示し、胚中心 (germinal center) の形成異常が観察された。すなわち *csk* “ノックイン” マウスは、胸腺のみでなく末梢リンパ球系の形成異常も同時に示していることが分かった。

胸腺細胞の異常をフローサイトメトリーにより分析した (図2-14)。細胞数の減少に合わせ、CD4⁺CD8⁺胸腺細胞 (double positive cell, DP細胞) 数が、正常マウスと比較して約0.1%と顕著に減少していた。一方CD4⁺CD8⁻およびCD4⁻CD8⁺胸腺

細胞 (single positive cell, SP細胞) の減少は10-20 %程度であった。またフローサイトメトリーによる経時的なパターンの変化からこれらの SP細胞は、正常の分化経路を通り、DP細胞から分化したものと考えられる。さらに、SP細胞上におけるCD3 ϵ の発現を調べると、対照動物に比較して減少していることが見いだされた (図2-15)。

次に、これらの異常が胸腺細胞自身の異常によるものかどうかを確認するために、PMAと抗CD3 ϵ 抗体により刺激し、胸腺細胞の増殖能を調べた (図2-16)。*csk* “ノックイン” マウスの胸腺細胞は、PMAと抗CD3 ϵ 抗体による特異的な刺激に対して増殖活性を示さなかった。

5) p56^{lck}及びp62^{yes}の自己リン酸化及びチロシンリン酸化活性

csk “ノックイン” マウスの表現型が、Fyn-Csk融合蛋白質による他のSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼに対する活性の阻害によるものであるかどうかを確認するために、p56^{lck}及びp62^{yes}の自己リン酸化及びエノラーゼに対するチロシンリン酸化活性を調べた (図2-17)。p56^{lck}及びp62^{yes}も共に自己リン酸化活性およびチロシンリン酸化活性において顕著な差は見いだされなかった。Fyn-Csk融合蛋白質の細胞内局在が本来のp59^{fyn}の位置にあることを示していると推定される。すなわち

“ノックイン” されたFyn-Csk融合蛋白質は、Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼが近傍に近づいた時にのみ、Srcファミリーリン酸化蛋白質に対し活性阻害を示し、逆にそうでない場合には、非特異的な活性阻害を示さないといった理解である。そこでこの点を明らかにする目的で、TCR ζ /CD3-p59^{fyn}、CD4/CD8-p56^{lck}をそれぞれの抗体を用い会合させた後、p56^{lck}のキナーゼ活性を測定した。両者を強制的に会合させるとCD4のみの会合時に比較して、p56^{lck}のキナーゼ活性が、正常マウス (データ未表示) 及びfyn^{+/+}において、それぞれ約1.7、1.6倍上昇した。一方、*csk* “ノックイン” マウスにおいては、この様な上昇が見られなかった (図2-18)。

6) ZAP-70及びp120^{cbl}のリン酸化

さらに、5) における結果を補強するためにp59^{fyn}の細胞内基質へのリン酸化状態を調べた。もしp56^{lck}及びp62^{yes}等の機能的相補性がFyn-Csk融合蛋白質により阻害されるのであれば、p59^{fyn}の基質のリン酸化が正常マウスに比較して減少するはずである。逆にその機能的相補性が阻害されなければ、p59^{fyn}の細胞内基質のリン酸化には、変化が見られないことになる。基質としてはZAP-70及びp120^{cbl}を用いた。*csk* “ノックイン” マウス胸腺細胞のT細胞レセプター刺激後、ZAP-70のチロシンリン酸化は、正常マウスに比べて、約1/2-1/3程度しか上昇しなかった (図2-19)。また

p120^{cbl}の非刺激時のチロシンリン酸化も、同様に約1/2 - 1/3のレベルに落ちていた(図2-20)。これらのことから、Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの機能的相補性が、Fyn-Csk融合蛋白質により限られた領域において阻害され、p59^{fyn}の基質がリン酸化されなかったと考えられる。

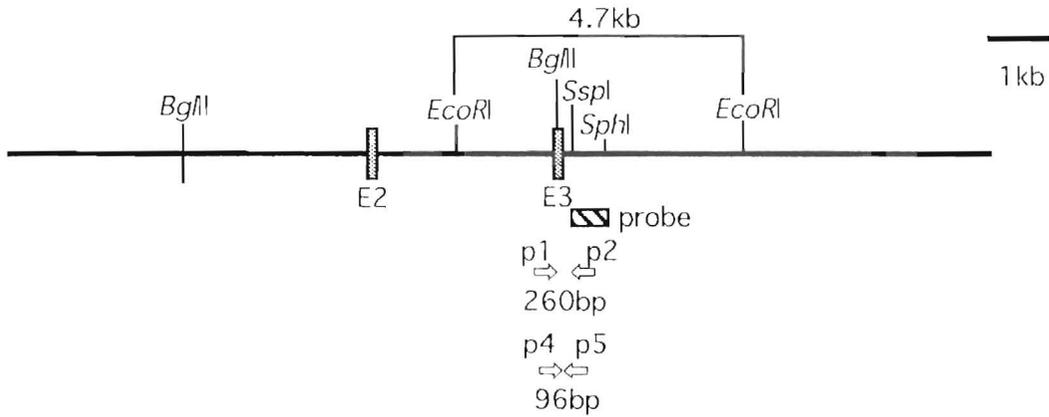
5. 考察

Fyn欠損マウスがT細胞の発達において顕著な表現型を示さなかったのに対し (Stein *et al.*, 1992; Appleby *et al.*, 1992)、*fyn*遺伝子座への*csk* “ノックイン” マウスは、DP細胞の減少を示した。“ノックイン” マウス胸腺細胞は、期待された約64KdaのFyn-Csk融合蛋白質を産生し、細胞膜結合型であった。すなわち、Fyn-Csk融合蛋白質の細胞内局在は、p59^{fyn}N-末部分による特徴的な細胞膜局在を示し、p50^{csk}の持つ細胞質局在を示さなかったことになる (図2-8) (Okada *et al.*, 1989, 1991; Chow *et al.*, 1993)。Fyn-Csk融合蛋白質は、Cskキナーゼ活性を有し、p56^{lck}のキナーゼ活性を阻害すること、さらにp59^{fyn}の基質と考えられるZAP-70及びp120^{abl}のリン酸化活性も阻害した。ZAP-70は、p59^{fyn}以外では唯一TCR/CD3複合体の ζ ダイマー鎖に結合する蛋白質として同定され、TCR刺激時にはp59^{fyn}あるいはp56^{lck}によりリン酸化されると考えられている (Chan *et al.*, 1992; Kolanus *et al.*, 1993; Fusaki *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1995)。またp120^{abl}もp59^{fyn}とSH2及びSH3を介して結合することが示されている (Donovan *et al.*, 1994)。現在までのところ、T細胞分化におけるp59^{fyn}の役割は、他のSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼにより一部相補されていると考えられている。この*csk* “ノックイン” の戦略は、Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの持つ相補的機能性の有無を明らかにすることを目的としている。

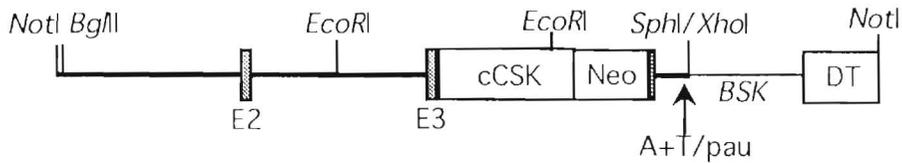
非刺激時において、p56^{lck}及びp62^{yes}の自己リン酸化及びチロシンリン酸化活性は、全く変化しなかったものの、TCR ζ /CD3、CD4/CD8-p56^{lck}両者を強制的に会合させた後、p56^{lck}のキナーゼ活性を測定すると、正常マウス及び*fyn*^{+/+}においてそれぞれ約1.7、1.6倍上昇したが、*csk* “ノックイン” マウスにおいては、この様な上昇が見られなかった。さらに “ノックイン” したCskがp59^{fyn}を相補する他のSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼを阻害するという仮説を補強するために、p59^{fyn}の基質と考えられるZAP-70及びp120^{abl}のチロシンリン酸化レベルを検討した。実際にZAP-70及びp120^{abl}のチロシンリン酸化減少は、*fyn*^{csk/csk}胸腺細胞においてのみ確認され、*fyn*^{z/z}胸腺細胞においては見られなかった。そこで考えられる仮説は、以下のようになる。“ノックイン” したCskは、本来のp59^{fyn}の位置に局在し、その機能は他のSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼが近傍に近づいたときに初めて阻害するというものである。即ち単純なFynノックアウトマウス (*fyn*^{z/z})における、Fyn-LacZ融合蛋白質は、Fyn-Csk融合蛋白質と同様の局在を示すと考えられるが、単純な位置上のブロッキングであるために、*fyn*^{csk/csk}に見られるような表現型を示さなかったと考えることができる。“ノックイン” したCskによるキナーゼの阻害は、

p56^{lck}及びp62^{yes}のマイナーなフラクシオンに含まれ、胸腺細胞全体のフラクシオンにおいては検出できないものと考えられる。我々の仮説をさらに証明するためには可能性のあるp59^{fyn}基質のリン酸化を更に検討していく必要がある。この中で最も可能性のある分子としてCD3と鎖が挙げられるが、生後21日前後のマウスにおいては、そのリン酸化が確認できなかった。さらにZAP-70及びp120^{cdl}のチロシンリン酸化の減少が、胸腺細胞の増殖異常やT細胞の発達の異常に直結するのかが、残る問題として挙げられる。またcsk “ノックイン” マウスは、Fyn欠損マウスに見られなかった胸腺皮質部分における著しい萎縮を示した。実際にその細胞数は、正常細胞数の約1/10から1/100に減少しており、フローサイトメトリーによる分析から、DP細胞数の減少がその主な原因と考えられる。加えてSP細胞上においてCD3 ϵ の発現の減少も見られた。これは更に解析を必要とするものの、csk “ノックイン” マウスのDP細胞からSP細胞への分化に対し、正常の抗原/MHC刺激が伝わらないために、T細胞のポジティブセレクションの異常が起こっていることを予想させる。この事を確認するために、今後はCD69、HSA、TCR $\alpha\beta$ 等の他のT細胞マーカーを調べていく必要がある（第3章参照）。またLck欠損マウス (*lck*^{-/-})において、CD4⁻CD8⁻胸腺細胞 (double negative cell, DN細胞) からDP細胞への分化異常が知られている (Molina et al., 1992)。fyn^{csk/csk}胸腺細胞においてp56^{lck}への影響が見られなかったわけだが、*lck*^{-/-}とfyn^{csk/csk}マウスの間にどのような違いが見られるのかについて、更に解析していく必要がある。また、なぜ生後3-4週の離乳時期にT細胞分化異常が見られるのかも合わせて考えていく必要がある。これらの疑問に答えていく上でも、またT細胞分化におけるチロシンリン酸化のシグナル伝達系を解明するためにも、本研究で作成されたfyn^{csk/csk}マウスは重要な材料である。

Normal allele



pFCNeoDT



Targeted allele

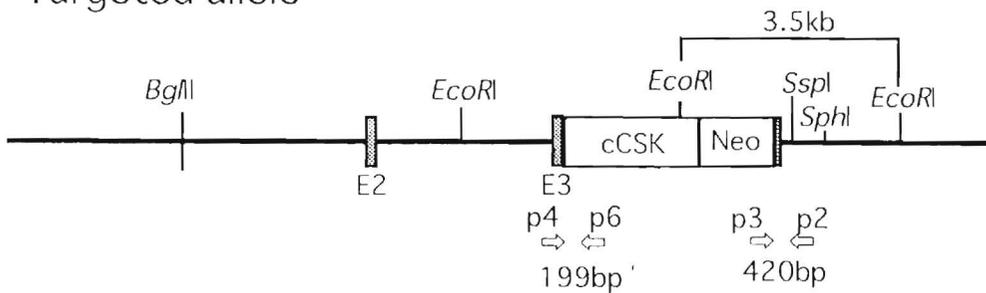


図2-1 “ノックイン” ターゲッティングの手順

pFCNeoDT、*csk* “ノックイン” ベクター；*Neo*、*pgk-1* 遺伝子プロモータを持つ *neo^r* 遺伝子でポリアデニレシオンシグナルは着いていない。；*DT*、ジフテリア毒素 A 遺伝子の一部；*E2* と *E3*、*fyn* 遺伝子のエクソン；*BSK*、Bluescript ベクター 遺伝子；*A+T/pau*、mRNA の非安定化配列とポージング配列。p1 より p6 は、PCR 法及び RT-PCR 法におけるプライマーで、各サイズは、それぞれから予想される大きさを示している。

Table 1 “ノックイン” ターゲッティングのマウス作製までの頻度

Exp. number	No. of neo resistant colonies	No. of homologous recombinants	mixed ES colonies	Chimera mice	Hetero mice	Homo mice
Exp.1	144	(#16)	+++	-		
		#32		+ (Death)		
		#48				
		#107				
Exp.2	96	#112				
		#19	+	-		
		#93	+	+	+	+

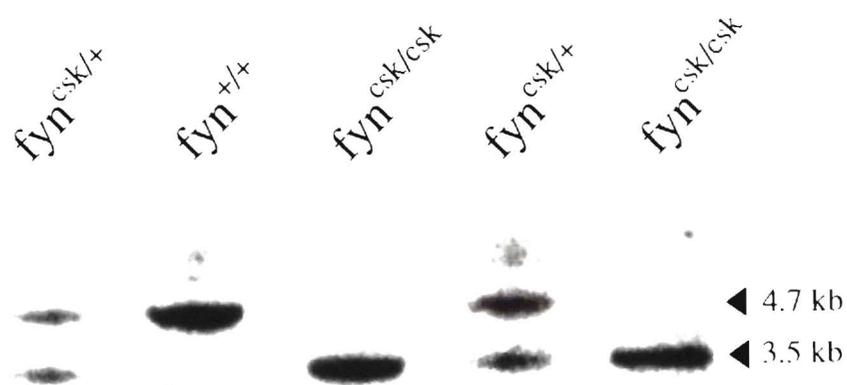


図 2-2 サザンブロッティング法による遺伝子型の決定

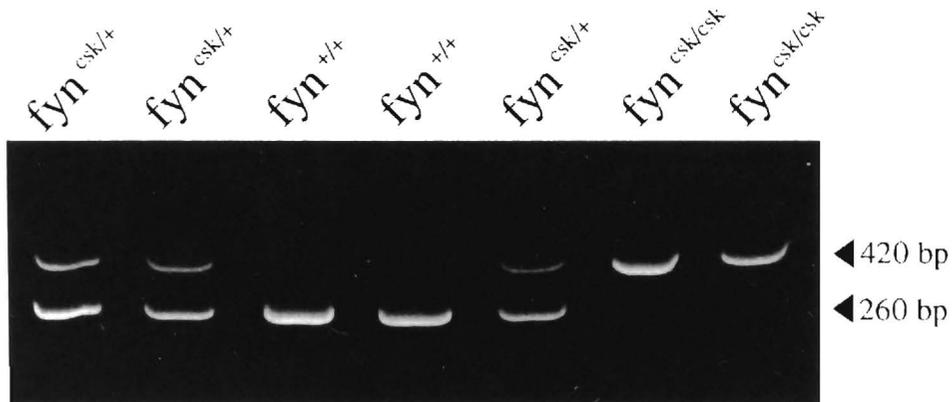


図 2 - 3 PCR法による遺伝子型の決定

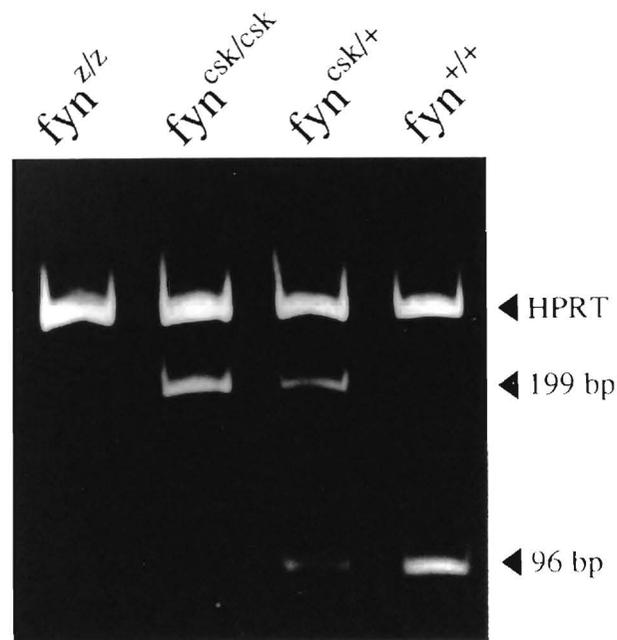


図 2 - 4 RT-PCR法による *fyn* 遺伝子の欠損と *fyn-csk* 融合転写物の検出
 胸腺細胞を用いRT-PCR法を行った。正常の *fyn* 遺伝子からは、96bp、*fyn-csk* 融合
 遺伝子からは、199bpの転写物が、それぞれ得られる。
 HPRTは、RT-PCRのインターナルコントロールである。

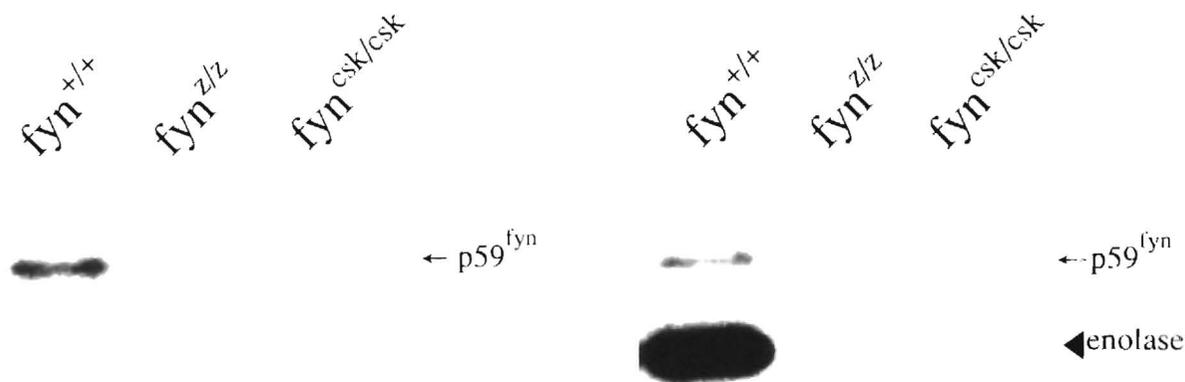
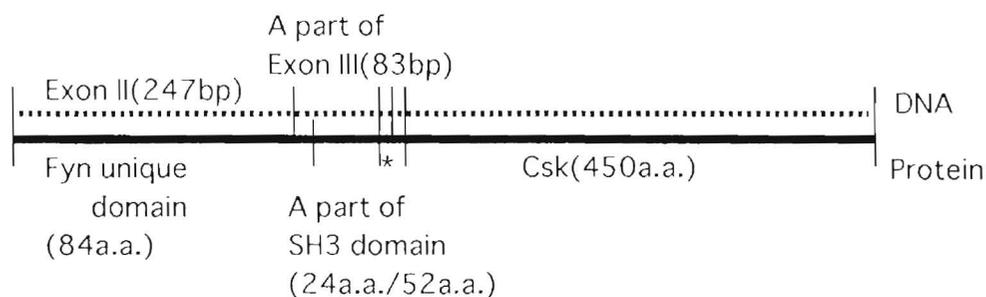


図2-5 *fyn*遺伝子欠損によるFynリン酸化活性の胸腺細胞における欠損

左のパネルは、自己リン酸化活性を示し、右側のパネルは、酸処理のエノラーゼを用いたリン酸化活性を示す。矢印は、自己リン酸化したp59^{fyn}を示し、矢は、リン酸化したエノラーゼを示す。



Fyn-Csk fusion protein
567a.a.(110a.a.+7a.a.+450a.a.)/63.7Kda

* 3 a.a.(linker) and 4 a.a.(Csk non-coding region)

図2-6 予想されるFyn-Csk融合蛋白質の構造

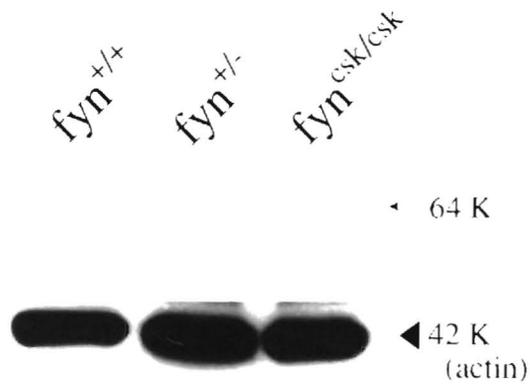


図 2-7 $fyn^{csk/csk}$ 及び $fyn^{+/-}$ ($fyn^{csk/+}$)胸腺細胞における
Fyn-Csk融合蛋白質の発現

胸腺細胞破砕物 ($10\mu\text{g}$ / レーン) を抗p50^{csk}抗体でウエスタンブロッティングを行った。Fyn-Csk融合蛋白質の分子量は、約64Kdaである。下側のパネルは、リブロット後、抗アクチン抗体で各レーンの蛋白質が等量であることを示す。

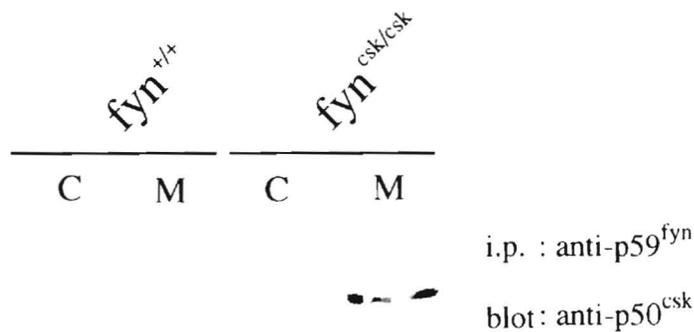


図 2-8 Fyn-Csk融合蛋白質の局在

細胞質画分及び膜画分を用い、Fynのユニークな領域に対する抗p59^{fyn}抗体による免疫沈降物を得る。抗p50^{csk}抗体によるウエスタンブロッティングを行うと $fyn^{csk/csk}$ マウス胸腺細胞の膜画分においてFyn-Csk融合蛋白質を検出した。

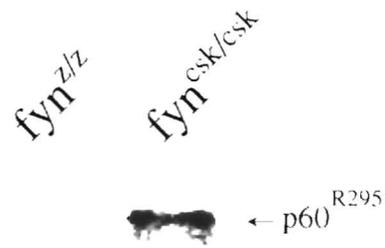


図 2 - 9 Fyn-Csk融合蛋白質のCsk活性

Fyn-Csk融合蛋白質のCsk部分によるリン酸化活性は、p60^{R295}を基質として行った。fyn^{csk/csk}マウス胸腺細胞から、活性が得られた。

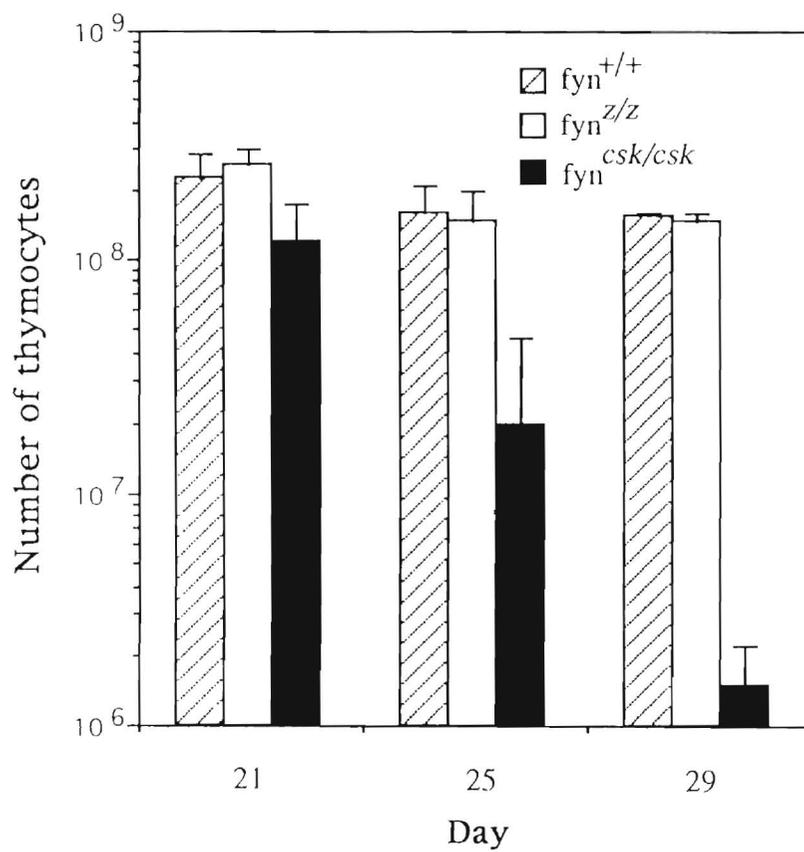


図 2-10 生後 3-4 週齢における胸腺細胞数の変化
 生後 21、25、29 日齢のマウスにおける総胸腺細胞数の比較をおこなった。

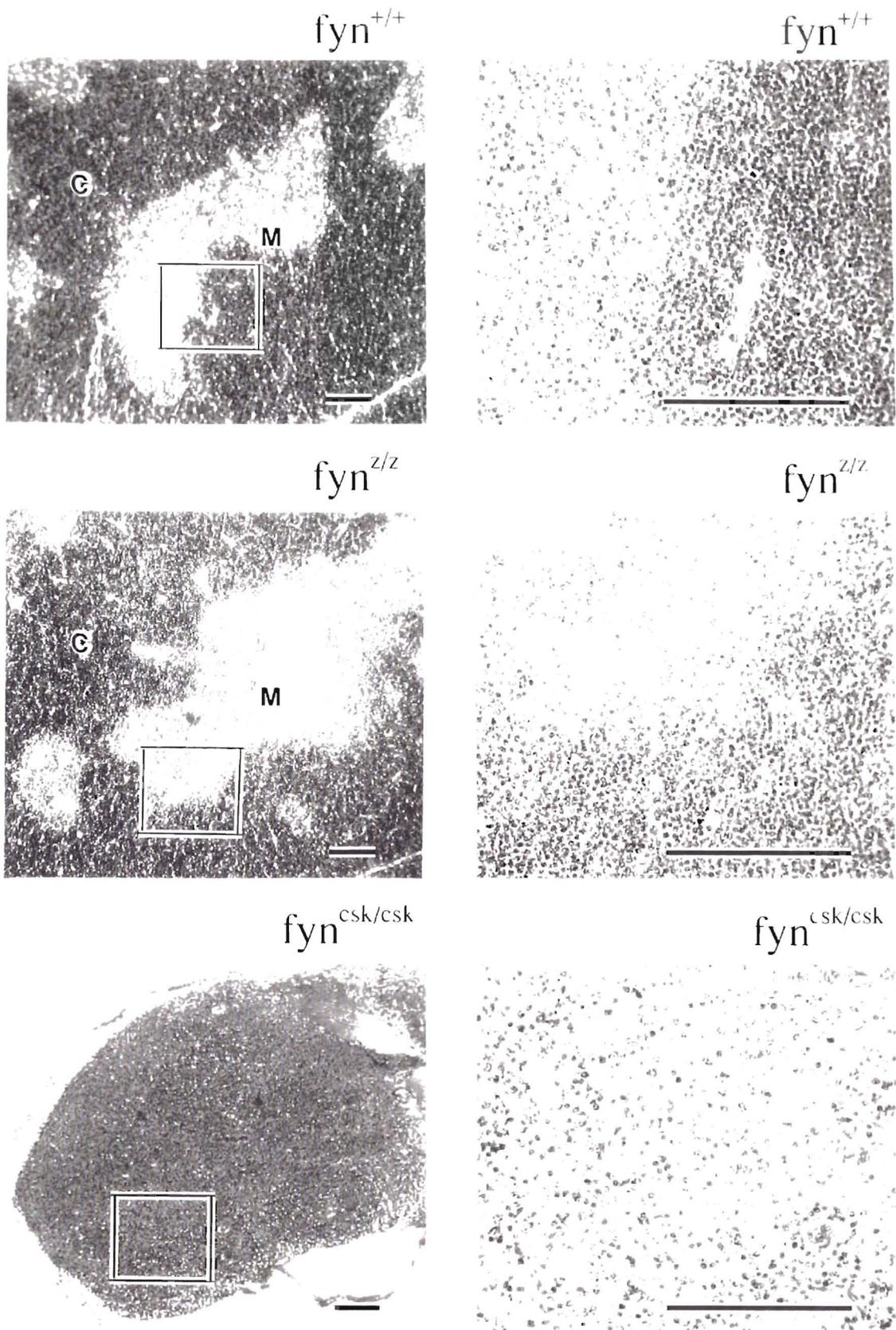
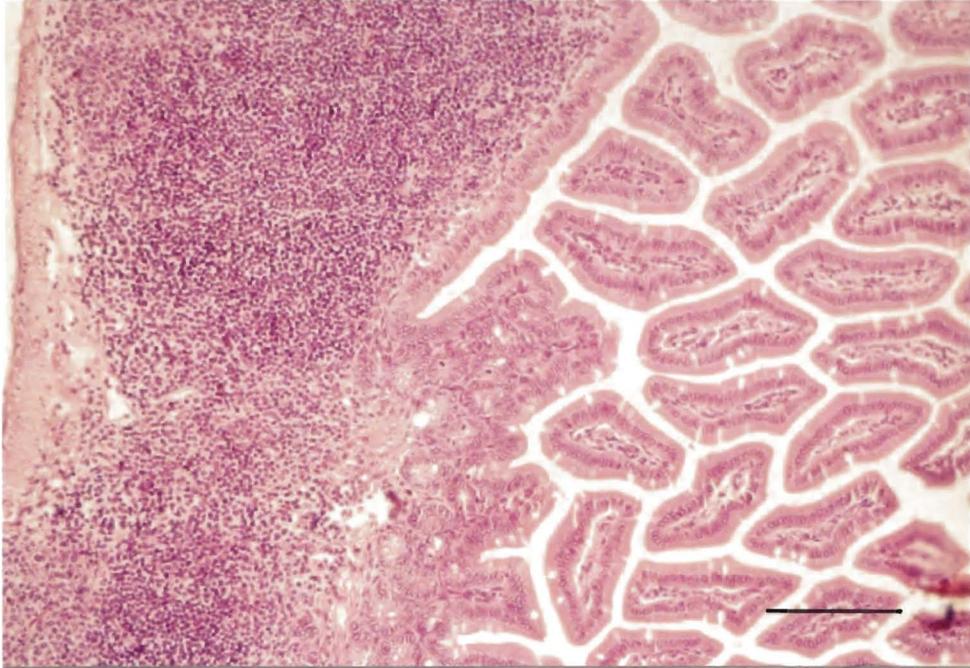


図2-11 胸腺の萎縮生後29日目のマウスの胸腺組織像
 右側のパネルは、左側のパネルの拡大部分を示している。*fyn*^{csk/csk}マウスにおいて胸腺皮質層の萎縮が見られる。M, 髄質; C, 皮質。バーは、25 μ mを示す。

fyn^{+/+}



fyn^{csk/csk}

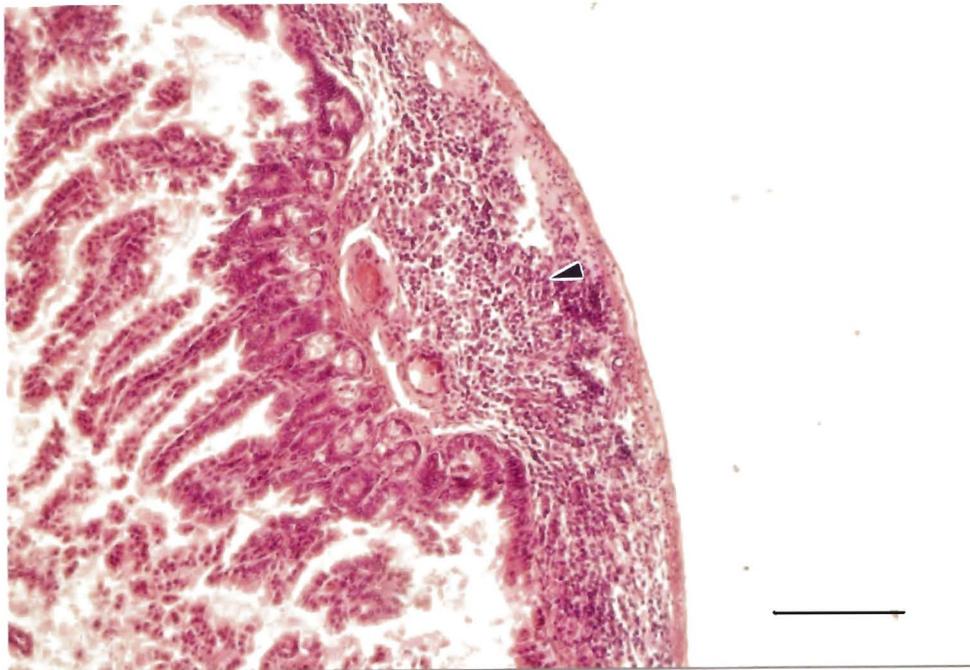
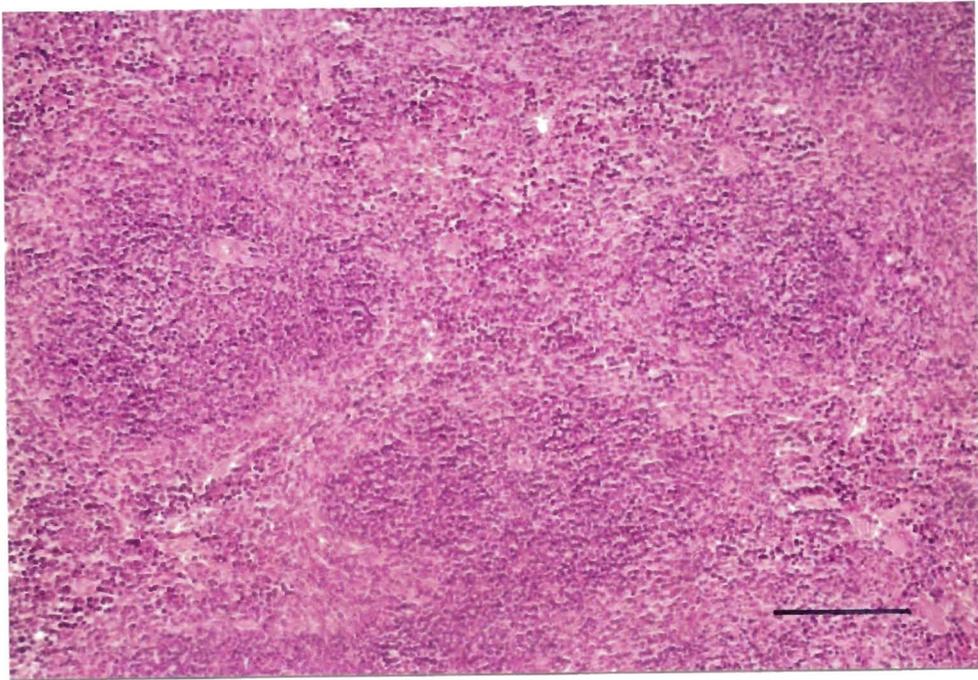


図2-12 パイエル板の組織像

fyn^{csk/csk}マウス（29日齢）においてパイエル板の萎縮が見られる。
バーは、25 μ mを示す。矢印は、萎縮部分を示す。

fyn^{+/+}



fyn^{csk/csk}

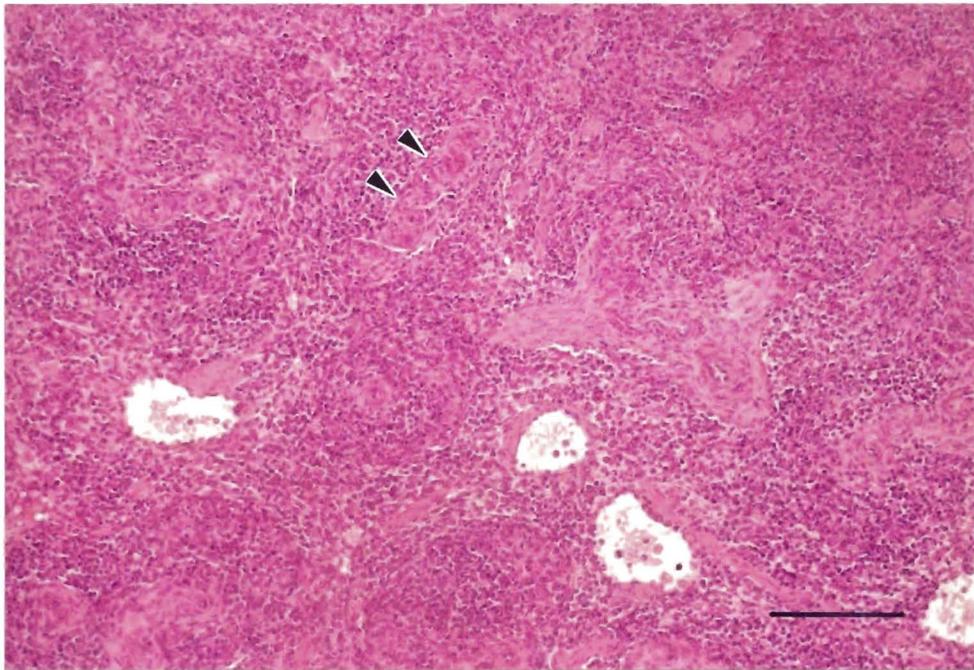


図 2 - 1 3 脾臓の組織像

*fyn^{csk/csk}*マウスにおいて白脾髄の消失

が観察される。矢印は、白脾髄萎縮部分を示す。バーは、25 μ mを示す。

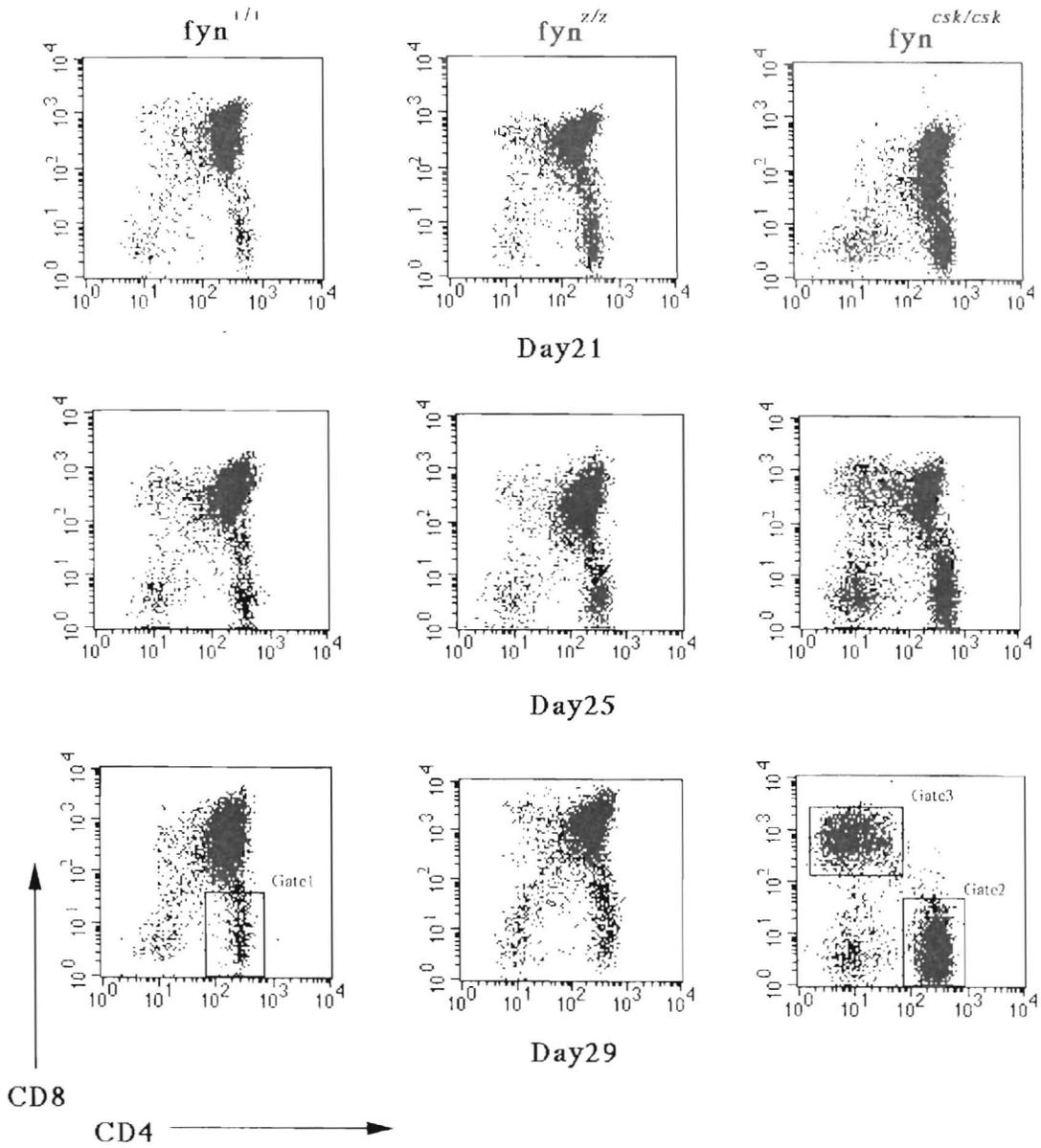


図 2-14 胸腺細胞のフローサイトメーターによる解析
 生後 21、25、29 日齢の胸腺細胞における CD4 陽性細胞及び CD8 陽性細胞を分析した。

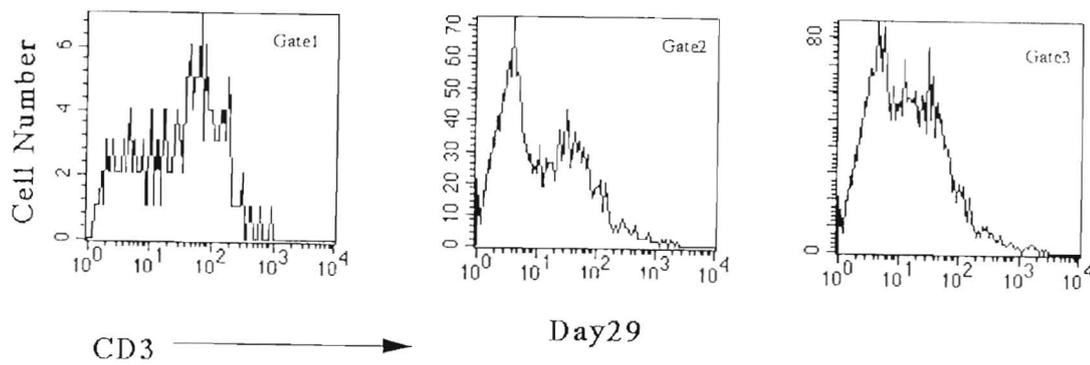


図 2-15 29日齢マウスの胸腺SP細胞におけるCD3の発現

図 2-14 のボックス領域内の細胞におけるCD3の発現を調べた。

Gate 1は、 $CD4^+CD8^-(fyn^{+/+})$ 細胞；Gate 2は、 $CD4^+CD8^-(fyn^{csk/csk})$ 細胞；

Gate 3は、 $CD4^-CD8^+(fyn^{csk/csk})$ 細胞

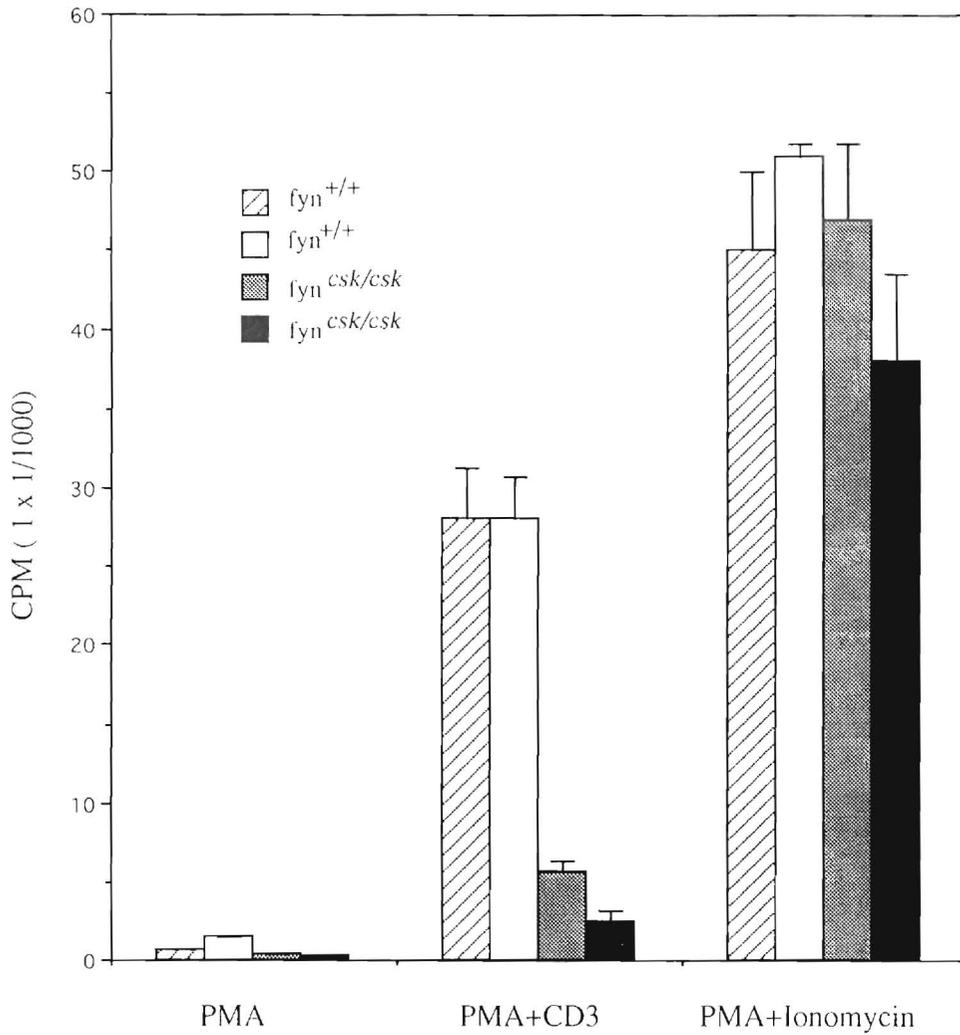


図2-16 生後21日齢の*csk* “ロックイン” マウス胸腺細胞の増殖能
 縦軸は、1分間あたりの [³H] thymidineの細胞への取り込みを表す。

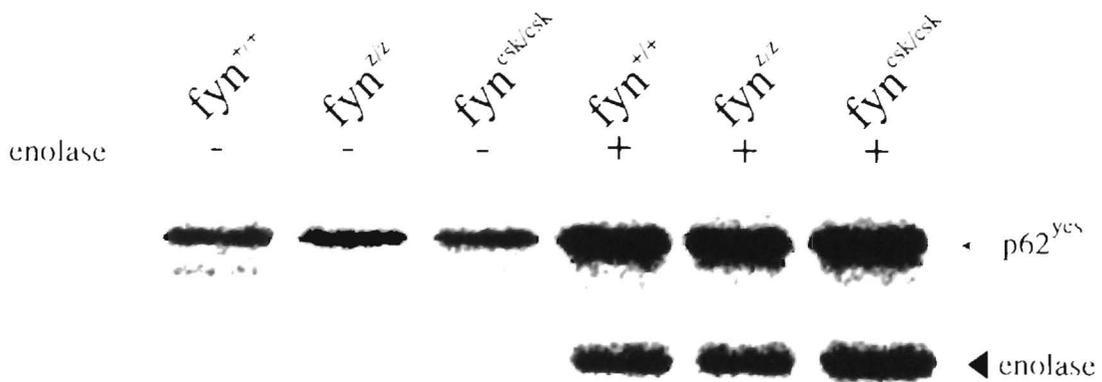
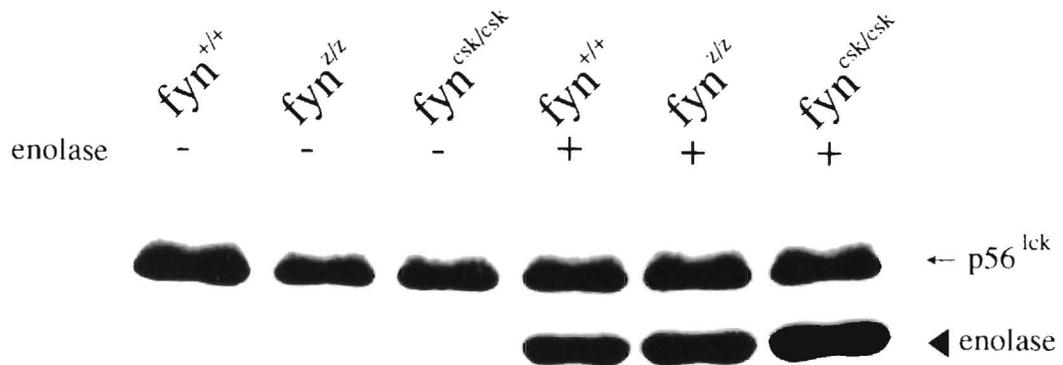


図2-17 p56^{lck}及びp62^{yes}のリン酸化活性

上段は、p56^{lck}リン酸化活性、下段は、p62^{yes}リン酸化活性を示す。(+)及び(-)は、それぞれ酸処理したエノラーゼ添加及び無添加を示す。

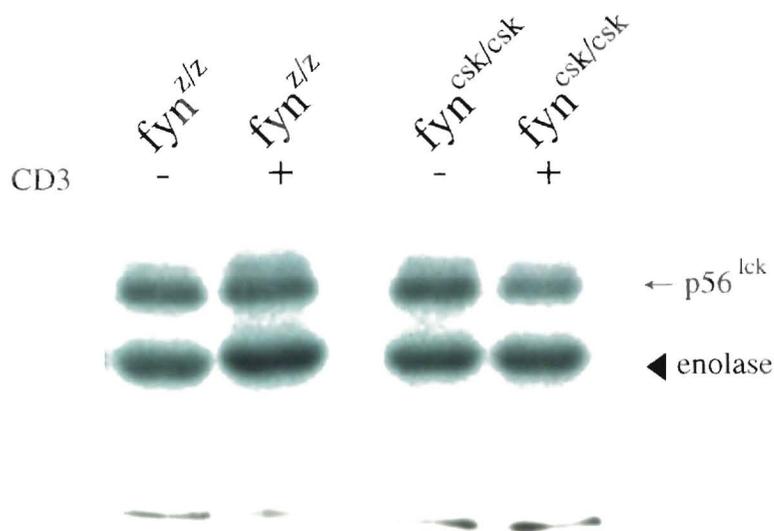


図 2 - 1 8 *fyn^{csk/csk}*及び*fyn^{Z/Z}*胸腺細胞におけるCD3-p59*fyn*、
CD4-p56^{*lck*}会合後のp56^{*lck*}のリン酸化活性の変化

上段は、p56^{*lck*}自己リン酸化活性及びエノラーゼを用いたp56^{*lck*}リン酸化活性、下段は、p56^{*lck*}の発現量を示す。(+)及び(-)は、それぞれ抗CD3抗体添加及び無添加を示す。

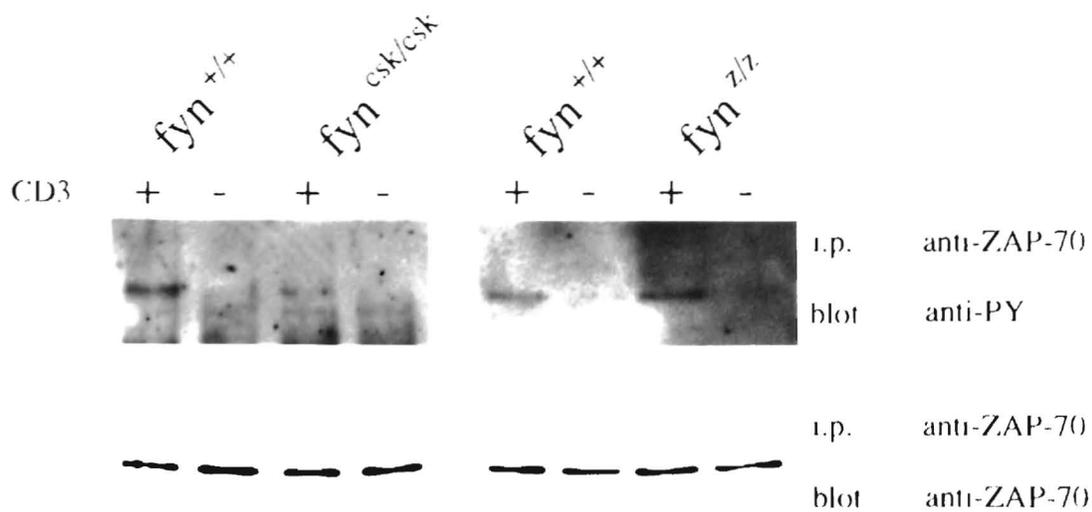


図2-19 ZAP-70のチロシンリン酸化

胸腺細胞破碎物を抗ZAP-70抗体で処理後抗リン酸化チロシン抗体（上側のパネル）または、抗ZAP-70抗体（下側のパネル）でウエスタンブロッティング法を行った。（-）は、抗CD3抗体による刺激を行わないもの、（+）は、行ったものをそれぞれ示している。

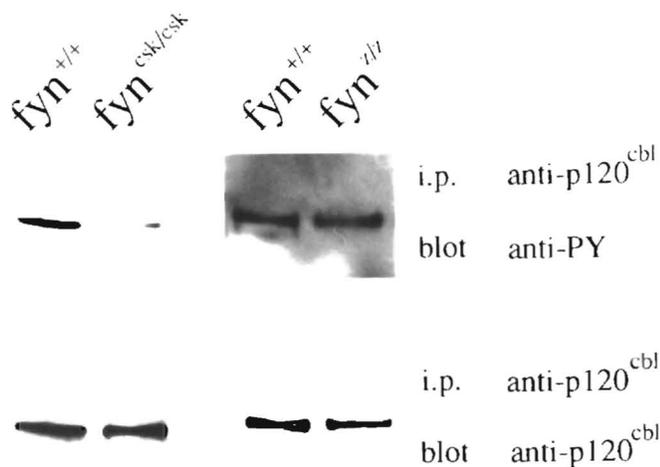


図2-20 p120^{cbl}のチロシンリン酸化

胸腺細胞破碎物を抗 p120^{cbl}抗体で処理後、抗リン酸化チロシン抗体（上側のパネル）または、抗 p120^{cbl}抗体（下側のパネル）でウエスタンブロッティング法を行った。

本章の内容は、

Satoshi Kanazawa, Duško Ilić, Motohiro Hashiyama, Tetsuo Noumura, Shinichi Aizawa, and Toshio Suda. Impaired development of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by *csk* "knock -in" into *fyn* locus.

として投稿中である。

第3章 CD4⁺CD8⁺胸腺細胞におけるp59^{fyn}とp125^{FAK}の相互作用

(p59^{fyn}-p125^{FAK} Cooperation in Development of CD4⁺CD8⁺ Thymocytes)

1. 要旨

p59^{fyn} is a Src family non-receptor tyrosine kinase that has been suggested to play important roles in T cell development and function. p125^{FAK} is a unique non-receptor tyrosine kinase and has been thought to mediate integrin-extracellular matrix interactions. To examine their roles in thymocytes, heterozygous *fak* mutation was introduced into homozygous *Fyn* deficiency. The double mutation, but neither *Fyn* deficiency nor *FAK* heterozygosity alone, displayed impaired development of CD4⁺CD8⁺ thymocytes with atrophy of the thymic cortex, suggesting an unique cooperation between p59^{fyn} and p125^{FAK} in CD4⁺CD8⁺ T cell development.

2. 序

これまでの多くの研究からTCR/CD3複合体及びThy-1を介した胸腺T細胞の形成にp59^{fyn}が関わることを示されている (Weiss *et al.*, 1994; Lancki *et al.*, 1995)。Fyn欠損マウス (*fyn*^{-/-})は、免疫系における組織学的な変異や、T細胞における細胞集団の変化等といった表現型を示さなかった (Stein *et al.*, 1992; Appleby *et al.*, 1992; Yagi *et al.*, 1993c)。これらの結果より他のSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼがFyn欠損を補っていると考えられている。また最近非リンパ球系の細胞における研究からp59^{fyn}とp125^{FAK}の間に相互作用の可能性のある事が示された (Cobb *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1995)。

p125^{FAK}は、*v-src*により形質転換したニワトリ胚線維芽細胞において強くリン酸化される蛋白質として同定された (Kanner *et al.*, 1990)。その構造は、SH2及びSH3領域、ミリスチレイション領域及びパルミチレイション領域を持たず、キナーゼ領域以外はこれまでに知られている他の非レセプター型チロシンキナーゼと全く相同性を持たない。p125^{FAK}は、胸腺細胞を含む種々の細胞に発現している (Schaller *et al.*, 1992; Hanks *et al.*, 1992; Andre *et al.*, 1993; Whitney *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1993; Ilić *et al.*, 1995; Furuta *et al.*, 1995; Kanazawa *et al.*, 1995)。しかし胸腺細胞におけるp125^{FAK}の役割についての情報は少ない (Whitney *et al.*, 1993; Kanazawa

et al., 1995)。培養線維芽様細胞において、p125^{FAK}は、細胞接着斑に存在することからECM (extracellular matrix)–インテグリンを介した伝達系において重要な働きを行っていると考えられている (Hanks *et al.*, 1992; Kanazawa *et al.*, 1995; Ilic *et al.*, 1995)。

胸腺細胞には種々のインテグリンが発現していて、T細胞の発達や機能獲得においてこのインテグリンを介したシグナル伝達系の果たす役割もまた重要であると考えられている (Shimizu *et al.*, 1990; Salomon *et al.*, 1994)。T細胞の発達や機能獲得におけるp59^{fyn}とp125^{FAK}の間の相互関与について調べる事を目的として、Fyn欠損にFAK欠損を導入し実験を行った。

3. 材料と方法

1) 変異マウス

Fyn欠損マウス ($fyn^{-/-}$)及びFAKヘテロ欠損マウス ($fak^{+/-}$)は、Yagiら及びFurutaらの方法に従い作成した (Yagi *et al.*, 1993c, 1994; Furuta *et al.*, 1995)。本研究で用いた、異なるFyn、FAK遺伝子型欠損マウスは、まず最初に $fyn^{-/-}$ と $fak^{+/-}$ マウスの間の交配の子孫から得た。

2) 遺伝子型決定

マウスの遺伝子型は、尾より抽出したDNAのPCRにより決定した。DNAの分離は、Nadaらの方法に従った (Nada *et al.*, 1993)。使用したプライマーは、p1 (5'-GATGACCTGAGTTTTTCACAAAGGAG-3')とp2 (5'-CGTGCACACTTAAGAAGTAGGCTC-3')から正常 fyn 遺伝子アレルに対する260bpの断片を検出し、p3 (5'-GA GAATCCAGCTTTGGCTGTT-3')とp4 (5'-GGCTTCTTGAAGGAAGCTTCTC-3')から正常 fak 遺伝子アレルに対する86bpの断片を検出し、p2とp5 (5'-TGATATT GCTGAAGAGCTTGGCGG-3')から変異遺伝子に対する420bpの断片を検出し、p4とp5から変異 fak 遺伝子アレルに対する170bpの断片を検出した。

分析は、AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer)を用い、ホットスタートは、95℃で7分間、75℃で10分間、50℃で2分間そして72℃で15分間行い、PCR法は、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間のサイクルを30回行った。

3) キナーゼ活性及びウエスタンブロッティング分析

胸腺細胞は、異なるFyn-FAK遺伝子型欠損のマウス ($fyn^{+/+}fak^{+/+}$; $fyn^{+/+}fak^{+/-}$; $fyn^{-/-}fak^{+/+}$; $fyn^{-/-}fak^{+/-}$) の胸腺より冷却PBS緩衝液中で、フラットなピンセットを用い組織をこすり取ることにより分離した。単細胞化した細胞は、100 μ mのメッシュを通し、細胞懸濁液とし集めた (Tsukada *et al.*, 1993)。

細胞は、TNE抽出用緩衝液で抽出した。全細胞抽出物は、Pansorbin (Chalbiochem)またはプロテインGセファロース (Pharmacia)で4℃で30分間洗浄した。ウエスタンブロッティング法およびキナーゼアッセイに用いる免疫沈降物は、抗p59^{Fyn}抗体 (Fyn301、Wako)または、抗p125^{FAK}抗体 (2A7、UBI)をそれぞれ1:10または1:100希釈で使用して、 5×10^7 胸腺細胞から得た。免疫沈降物は、プロテインGセファロースで集めた後、TNE抽出用緩衝液で1度、緩衝液A (20 mM Tris-HCl pH7.4; 1 mM EDTA; 0.1 % NP-40; 10 % グリセロール; 5 mM β -メル

カプトエタノール) で2度洗浄した。免疫沈降物及び全細胞抽出物 (60 mg/ レーン)は、8 % SDS-PAGEに流し、ウエスタンプロッティング用にニトロセルロース膜 (Scheicher & Schuell)に転写した。ニトロセルロース膜は、Tween-20/TBSまたは5 % スキムミルク、Tween-20/TBSで4 °C、一晚処理した後、適切な抗体を用い、1時間室温で処理した。ウエスタンプロッティング法に用いた抗体は：抗リン酸化チロシン 4G10抗体 (UBI)を1 : 2 0 0 0希釈で、抗p125^{FAK}JF1抗体 (東京大学、山本雅博士より供与) (Furuta *et al.*, 1995; Ilic *et al.*, 1995)を1 : 5 0 0希釈で、抗アクチン抗体 (Sigma) を1 : 1 0 0 0希釈で処理した。Tween/TBS緩衝液でニトロセルロース膜を3回洗浄した後、免疫反応物は、化学発光用基質、Hyperfilm-ECLを用いたECLシステム (Amersham)によって検出した。ニトロセルロース膜は、ECLシステムの手順に従いストリップした後、ブロッキングを行い再びプロットした。キナーゼアッセイは、Nadaらの報告に従った (Nada *et al.*, 1993; Furuta *et al.*, 1995) ; 1反応ごとに、2.5 mgの酸処理済エノラーゼ (Sigma) を用いp59^{lyn}のキナーゼ活性を検出し、また5 mgの4 : 1 Poly (Glu, Tyr) (Sigma)を用いp125^{FAK}のキナーゼ活性を検出した。分析は、BAS 2000 (Fuji)を用い行った。

4) 組織染色

胸腺は、ブアン固定後、アルコール脱水を行い、パラフィン (Oxford)に包埋した。5 μ mの厚さに切片を切り、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

5) フローサイトメトリー

胸腺細胞は、冷却したPBS緩衝液中でピンセット等を用い胸腺組織より分離した。単一細胞となる様ピペッティングした後、孔径100 μ mのメッシュを通した。胸腺細胞懸濁液は、CD32/16 (FC γ II/III レセプター)2.4G2抗体 (PharMingen) 0.5 mg/ 10⁶細胞で処理した後、fluorescein isothiocyanate標識抗CD4 RM4-5抗体、ビオチン化抗CD8 53-6.7抗体、R-phycoerythrin標識抗CD3 ϵ 145.2C11抗体、fluorescein isothiocyanate標識抗マウス α β TCR H57-597抗体、R-phycoerythrin標識抗マウスCD69 H1.2F3抗体、またはR-phycoerythrin標識抗マウスHSA M1/69抗体(PharMingen)で、それぞれOkadaらに従い処理した (Okada *et al.*, 1993)。抗体処理後、FACS vantage (Becton Dickinson)を用い分析した。

4. 結果

1) $fyn^{-/-}fak^{+/-}$ マウスの作成

本章の研究において使用したp59 fyn とp125 FAK 欠損マウスは、Yagiら及Ilicらにより既に報告されている (Yagi *et al.*, 1994; Ilic *et al.*, 1995)。簡単にその概要を述べると fyn 変異マウス ($fyn^{-/-}$)は、p59 fyn の代わりにp59 fyn のN-末端と β -ガラクトシダーゼとの間の融合蛋白質を発現し、正常マウスに成長した (Yagi *et al.*, 1993c, 1994)。 fak 変異マウス ($fak^{-/-}$)は、中胚葉性細胞の異常により、初期胚の発達時に致死性であった (Ilic *et al.*, 1995; Furuta *et al.*, 1995)。変異マウスは、最初に $fyn^{+/-}fak^{+/-}$ マウスを作成し、次にこれらのマウス間での交配を行った (図3-1)。全ての型の変異マウスは、メンデル法則に従った割合で得られた。これらのマウスの胸腺細胞におけるp59 fyn の活性の欠損は、自己リン酸化活性及びエノラーゼを用いたリン酸化活性によって確認した (図3-2)。またp125 FAK の発現量は、期待通り正常マウスの約1/2であった (図3-3)。

2) $fyn^{-/-}fak^{+/-}$ マウスの胸腺細胞

$fyn^{-/-}fak^{+/-}$ マウスの胸腺は、生後約3週齢まで正常の発達を示した。その後約2/3のマウスにおいて胸腺細胞の数が減少し始め、4週齢から5週齢にかけて正常マウスに比較して、約1/100になる (図3-4)。この細胞数の減少は、胸腺皮質の萎縮に一致する (図3-5)。この表現型にはばらつきがあり、約1/3の $fyn^{-/-}fak^{+/-}$ マウスにおいては、正常マウスに比較して数十分の一程度の胸腺細胞数の減少が見られたが、その胸腺組織像においては、なんら異常も観察されなかった。 $fyn^{-/-}$ (0/40匹)、 $fak^{+/-}$ (0/40匹)、 $fyn^{+/-}fak^{+/-}$ (0/60匹)のいずれのマウスにおいても胸腺細胞数の減少及び胸腺萎縮を示すものはなかった。

3) フローサイトメトリーによる胸腺細胞の分析

胸腺萎縮を示す個体の胸腺細胞の状態は、T細胞分化マーカー：CD4、CD8、CD3、CD69、HSA、TCR $\alpha\beta$ に対する抗体を用いフローサイトメトリーにより分析した。DP胸腺細胞において顕著な減少がみられた。この現象は、ほぼ全てのDP細胞が皮質に存在することから考えて、胸腺皮質部分の萎縮の結果と一致すると言える (図3-6、7)。CD3、CD69及びTCR $\alpha\beta$ の発現は、DP細胞からSP細胞への胸腺細胞の分化に従って正常に増加し、またHSAの発現は、逆に減少した (図3-8、-10)。このことから、 $fyn^{-/-}fak^{+/-}$ マウスにおけるSP細胞は、DP細胞を経由する正常の分化を示していると思われる (Guidos *et al.*, 1990; Bendelac *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 1993; Salomon *et al.*, 1994)。

4) p125^{FAK}のチロシンリン酸化及びそのキナーゼ活性、ならびに胸腺細胞タンパク質のチロシンリン酸化パターン

胸腺における異常を分子レベルで解明するため、その初期段階として予想される、p125^{FAK}のキナーゼ活性におけるFyn欠損の効果調べた。Fyn欠損は、胸腺細胞におけるp125^{FAK}のチロシンリン酸化正常レベルの約20%にまで劇的に減少させた。しかしながらこのチロシンリン酸化の減少は、p125^{FAK}のキナーゼ活性、すなわちPoly(Glu、Tyr)を基質とするキナーゼ活性及び自己リン酸化のレベルに対し、なんら影響を与えなかった(図3-11)。p59^{fyn}とp125^{FAK}は、共にチロシンキナーゼ活性を持つ。そこでfyn^{-/-}fak^{+/+}胸腺細胞において特異的に減少しているリン酸化蛋白質を調べる目的で、全胸腺細胞抽出液のチロシンリン酸化パターンを調べた(図3-12)。しかしfyn^{-/-}fak^{+/+}胸腺細胞におけるチロシンリン酸化パターンにユニークな変化は、特に見られなかった。

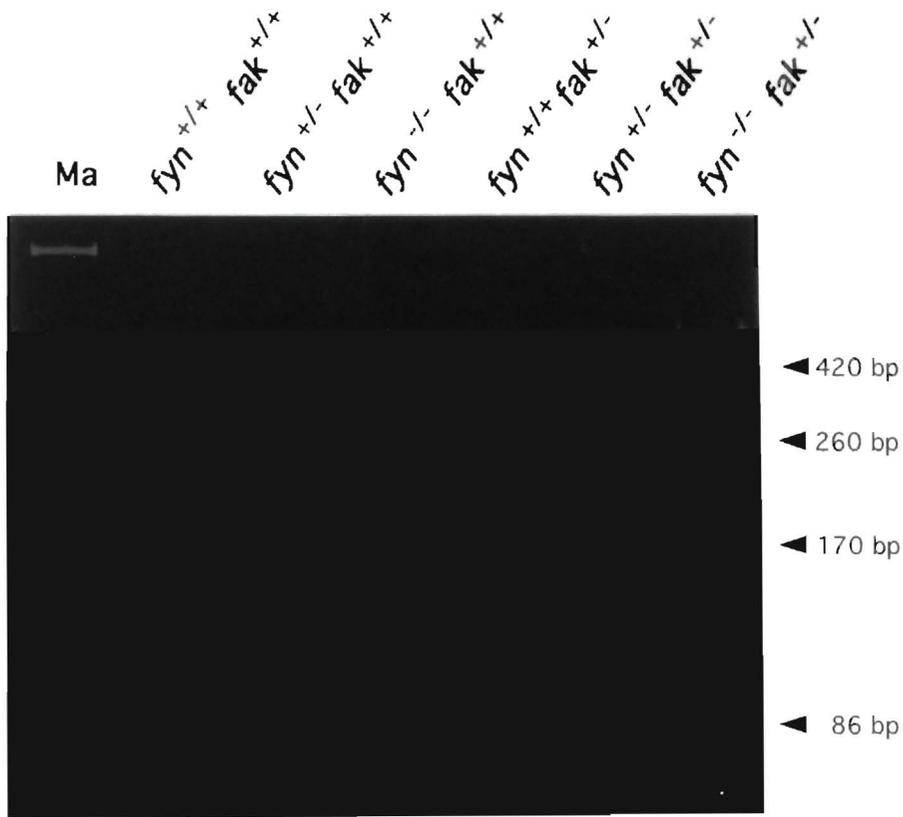
5. 考察

ダブルミュータントマウスにみられる表現型は、Fyn欠損マウス及びFAKヘテロ欠損マウスのそれぞれにおいては見られない。この表現型は、T細胞において、p59^{fyn}とp125^{FAK}を介したシグナル伝達に協調性があるという最初の仮説を示すものである。ただし表現型の不完全な浸透度 (penetration) は *fak* 遺伝子の欠損が、片方の対立遺伝子に対してのみ起こっていて、ホモ欠損でないことによるものと推定される (FAKホモ欠損マウスは、胚性致死を示す)。

fyn 遺伝子のN-末端部分を融合させる形で *csk* cDNA を *fyn* 遺伝子座に入れた *csk* “ノックイン” マウス胸腺細胞においてもダブルミュータントマウスと同様な CD4⁺CD8⁺細胞の減少が、フローサイトメトリーによるデータから明らかにされた (第4章参照)。p50^{csk} は、Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼの負の制御蛋白質であり、“ノックイン” ミュータントマウスにおいては、他のSrcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼによるFyn欠損の相補をこのCskが抑制すると説明できる。2つの変異マウス間の表現型における類似性は、CD4⁺CD8⁺細胞発達におけるSrcファミリーキナーゼとp125^{FAK}の間におけるユニークな相互作用も示していると推定される。DP細胞からSP細胞への分化は、MHCを介したTCR/CD3レセプターの刺激によるもので、CD3、TCR $\alpha\beta$ 、CD69の発現が上昇し、HSAの発現が減少する事が知られている。そこでこれらのマーカーの発現を、フローサイトメトリーを用い解析した。その結果、細胞数の減少が見られるものの、ダブルミュータントマウスにおけるDP細胞からSP細胞への分化過程には、特別な異常がないことが推定された。

p125^{FAK} は、アミノ酸配列で397番目における自己リン酸化部位を含め少なくとも5つのチロシンリン酸化部位をもつ (Clark *et al.*, 1995; Calab *et al.*, 1995)。自己リン酸化部位は、p125^{FAK} 自身によりリン酸化されることが知られていて、この自己リン酸化されたチロシン部位は、p60^{src} と p59^{fyn} の結合部位と考えられる (Cobb *et al.*, 1994)。このチロシン部位へのp60^{src} の結合は、p125^{FAK} のアミノ酸配列で407番目、576番及び577番目におけるチロシンリン酸化部位で、チロシンリン酸化後、p125^{FAK} のキナーゼ活性の上昇が報告されている (Calab *et al.*, 1995)。ここで次の様な可能性が生じる。即ち、Fyn欠損マウス又はFAKヘテロ欠損マウスのどちらにおいても見られない様な、ダブルミュータントマウスのみにおける表現型は、p59^{fyn} によるp125^{FAK} 活性の制御を反映しているということである。実際にp125^{FAK} のチロシンリン酸化は、Fyn欠損により大きく減少したが、p125^{FAK} のキナーゼ活性には、変化が見られなかった。それ故、ダブルミュータントにおける表現型は、p59^{fyn} によるp125^{FAK} 活性の制御によっては説明できない事になる。次に、Fyn

欠損におけるp125^{FAK}のチロシンリン酸化の減少を考えると、p125^{FAK}を介してのシグナル伝達に関する機能が推察される。例えば、p125^{FAK}におけるチロシンリン酸化は、種々のシグナル伝達系分子群のアンカー蛋白質として機能し、p125^{FAK}が持つ細胞接着機能の制御と共にもう一つの生物学的活性に関与する可能性がある (Clark et al., 1995)。Fyn欠損とp125^{FAK}の片方の対立遺伝子のみの欠損とが同時に存在するとき (*fyn*^{-/-}/*fak*^{+/-})、その調節機能作用の臨界点に近づくと推定すると、この臨界点を若干でも越えたときに初めて、表現型に対し影響が生じると考えられる。しかしながら、より可能性のある仮説として、ダブルミュータント胸腺細胞において、p59^{fyn}とp125^{FAK}の共通の標的蛋白質のリン酸化が、やはり臨界点に近い状態となり、以降のシグナル伝達系に影響を与える、という事が推定される。現在までのところ、このような分子をウエスタンブロッティング等によるリン酸化蛋白質の分析からは見つけられていないが、PI3-キナーゼ、ZAP-70、p120^{cbl}またp56^{lck}、p62^{yes}及びFAK-B等がその候補として予想される分子であると考えている。今後は、これらの分子群のリン酸化の程度をウエスタンブロッティング法等を用い調べる必要がある。



	wild type	recombinant
<i>fyn</i>	260 bp (p1, p2)	420 bp (p2, p5)
<i>fak</i>	86 bp (p3, p4)	170 bp (p4, p5)

図3-1 遺伝子型の確認

PCR法による遺伝子型の決定の例を示している。p1-p5は、マウスの遺伝子型を決める際のプライマーを示す。

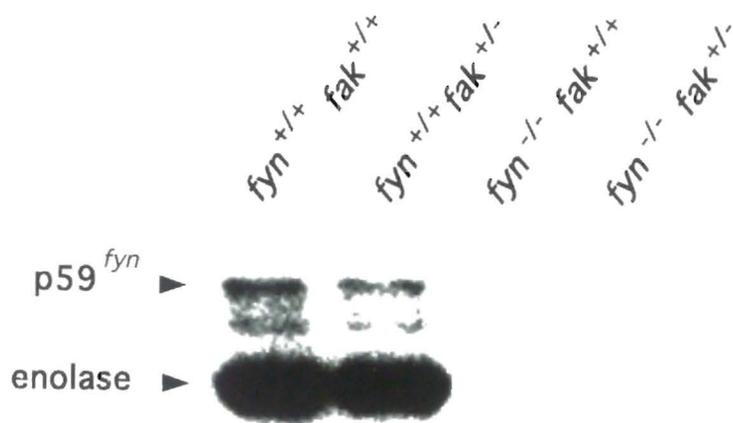


図3-2 胸腺細胞におけるp59^{fyn}の自己リン酸化及びキナーゼ活性

上のバンドは、p59^{fyn}の自己リン酸化活性を、下のバンドは、酸処理したエノラーゼを基質としたキナーゼ活性を示す。

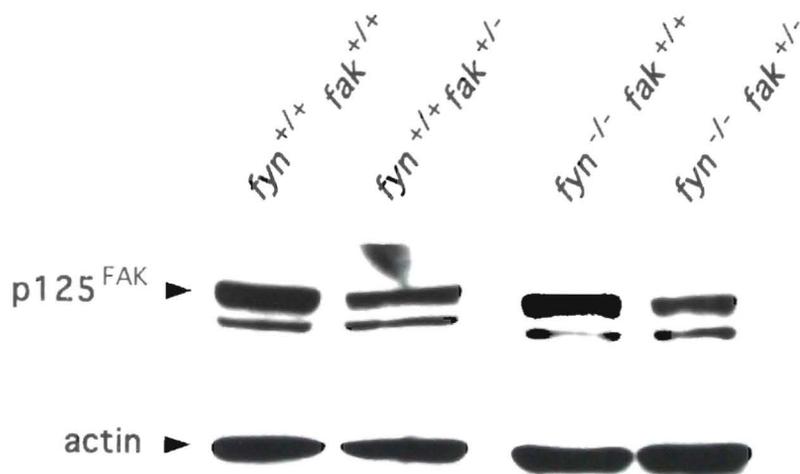


図3-3 胸腺細胞におけるp125^{FAK}の発現

50 mg/ml抽出物/レーンを8% SDS-PAGEで流した。プロットは、p125^{FAK}のC-末端に対する抗p125^{FAK} JF1抗体を用いた。p125^{FAK}の蛋白質量は、変異*fak*遺伝子アレル(*fyn*^{+/+} *fak*^{+/-}と*fyn*^{-/-} *fak*^{+/-})の為に半分に減少することが期待される。下段のパネルは、それぞれのレーンに同量の蛋白質があることをアクチンに対する抗体で示している。

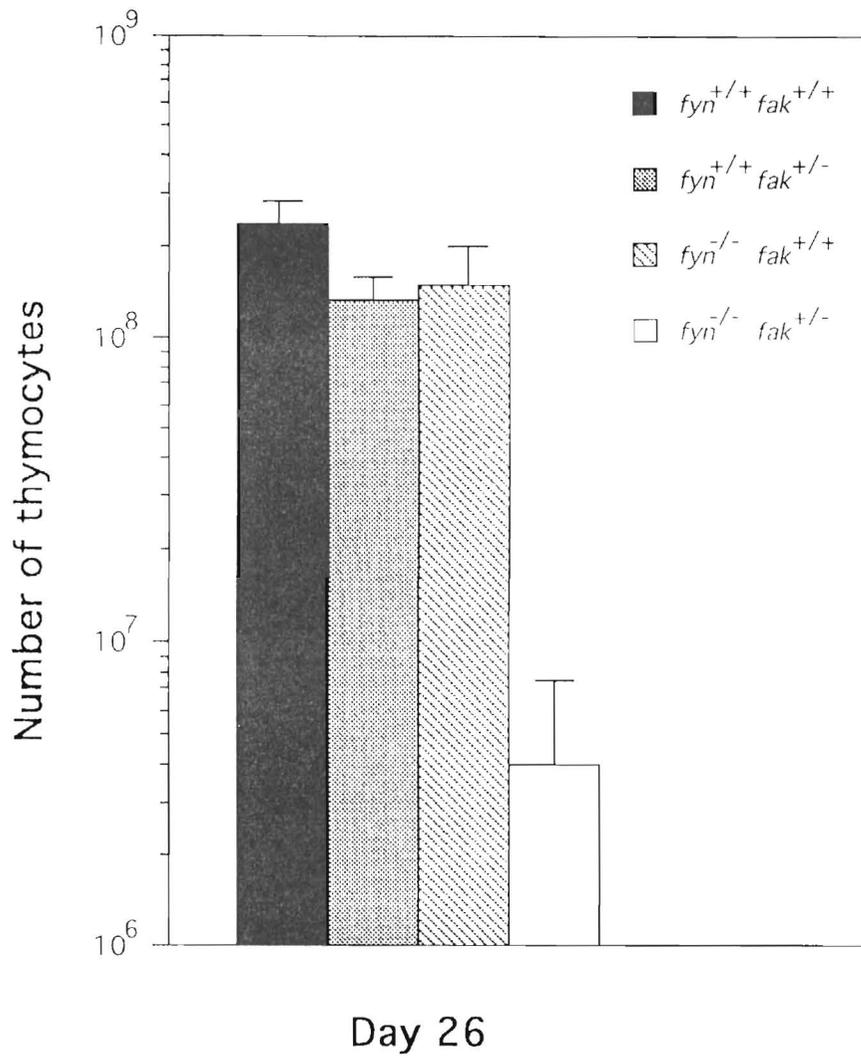


図3-4 胸腺細胞の総細胞数

胸腺細胞は、生後26日齢のマウスより分離し、総細胞数を計測した。

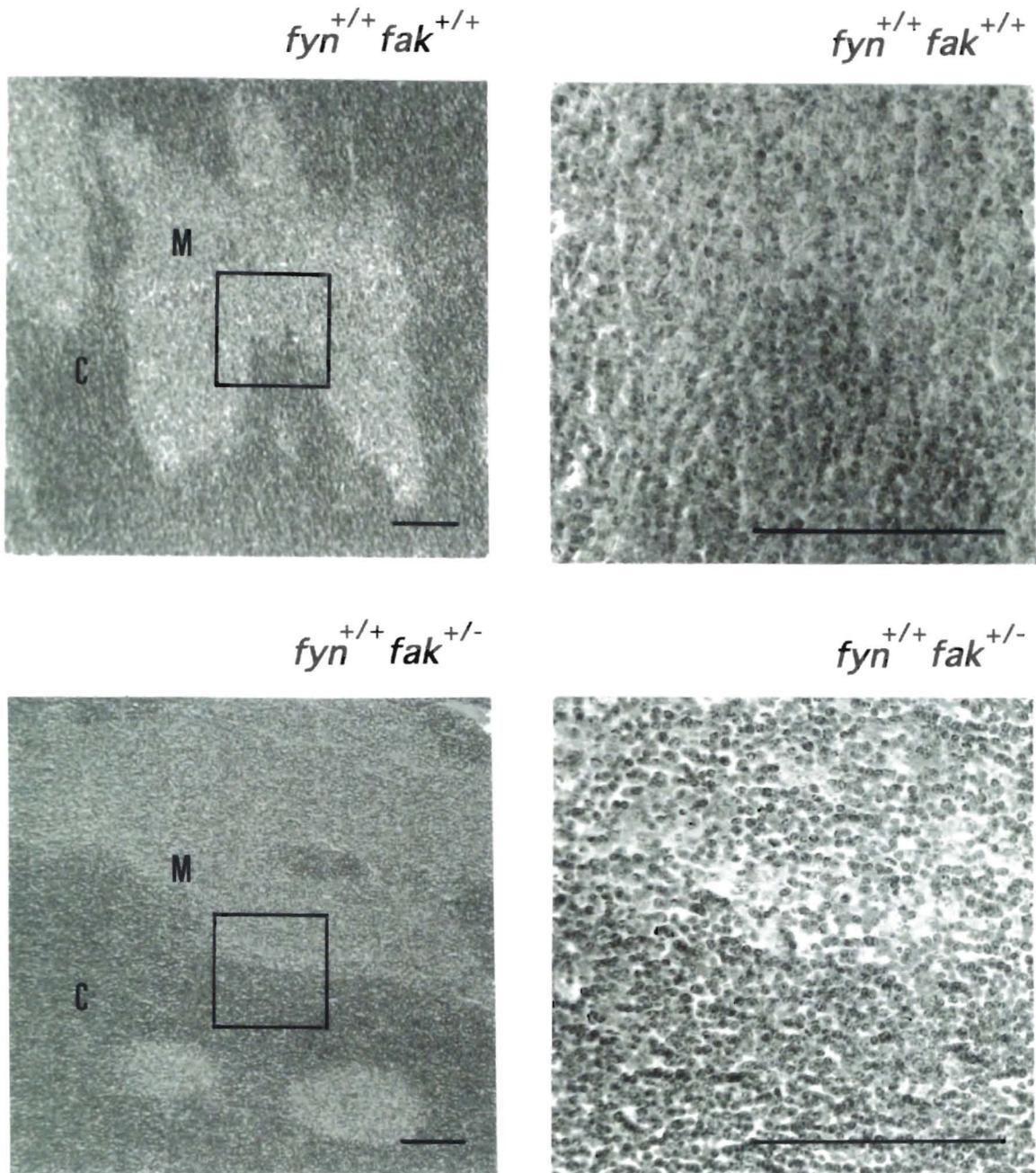
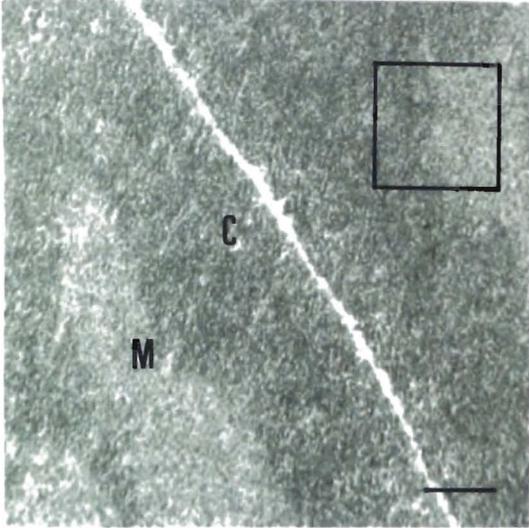


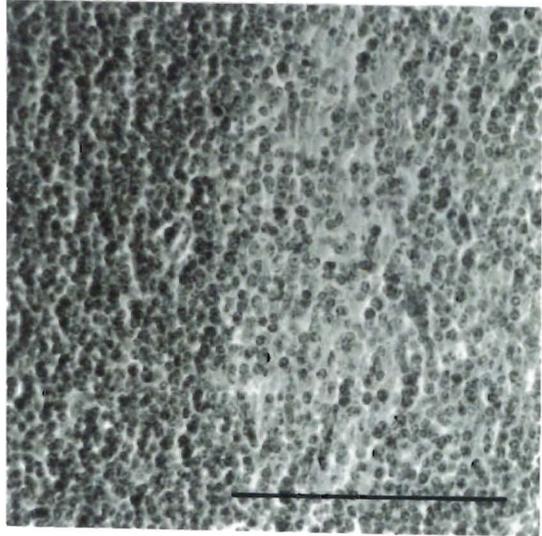
図3-5 $fyn^{-/-} fak^{+/-}$ マウスにおける胸腺の萎縮

生後26日齢のマウス胸腺の組織像。右側のパネルは、左側のパネルのボックス領域の拡大図である。 $fyn^{-/-} fak^{+/-}$ マウスは胸腺が萎縮を示している。M、髄質；C、皮質。バーは、25 μm を示す。

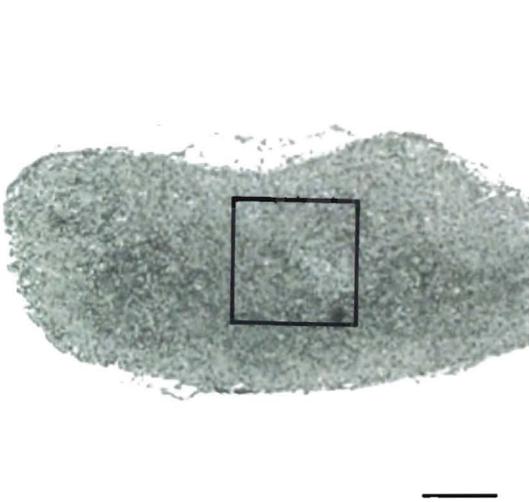
fyn^{-/-} *fak*^{+/+}



fyn^{-/-} *fak*^{+/+}



fyn^{-/-} *fak*^{+/-}



fyn^{-/-} *fak*^{+/-}

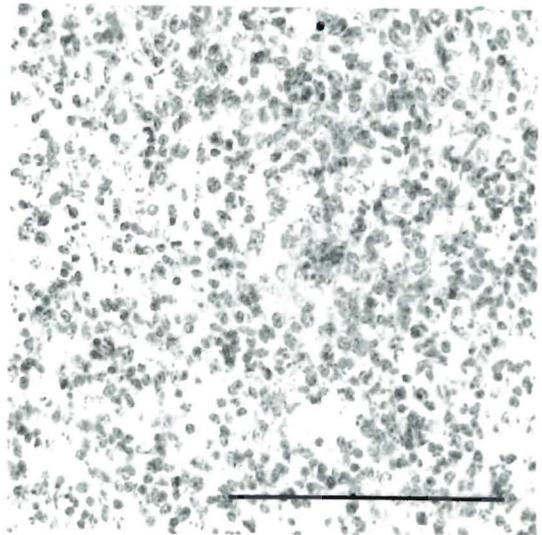


図3-5 (続き)

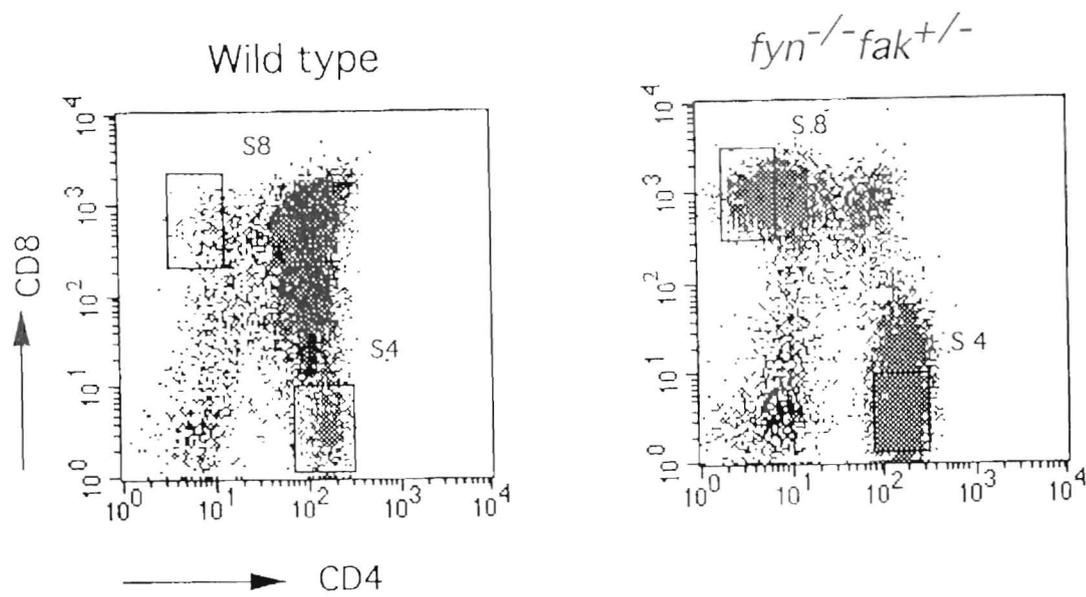


図3-6 フローサイトメーターによる分析 (CD4、CD8マーカー)
 生後26日齢のマウスの胸腺細胞のCD4、CD8による分析。長方形のゲート部分の
 CD3、CD69及びHSAによる分析は、図3の8-10にそれぞれ示す。

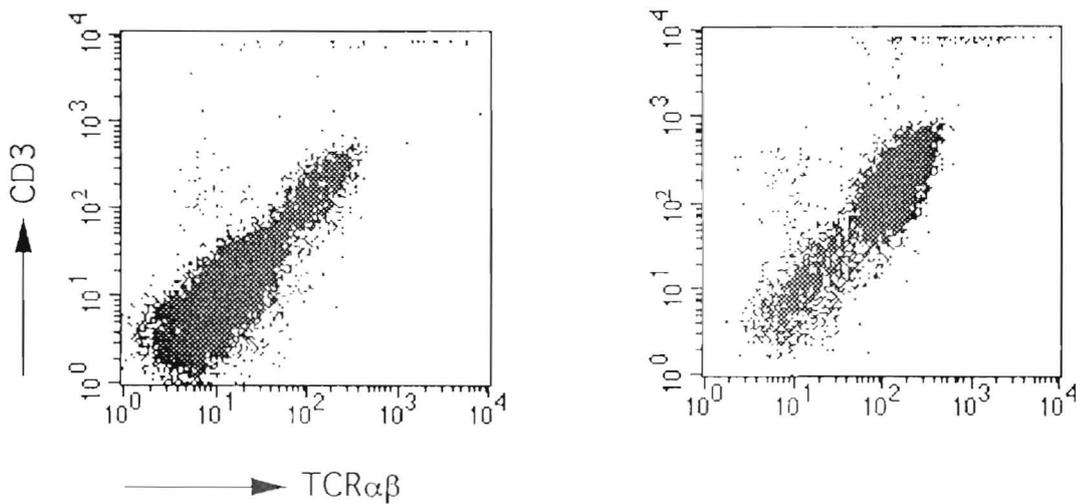


図3-7 フローサイトメーターによる分析 (CD3、TCR α β マーカー)
 左：野生型 ($fyn^{+/+} fak^{+/+}$)、右： $fyn^{-/-} fak^{+/-}$ 、それぞれのマウスの胸腺細胞を
 用いCD3、TCR α β マーカーによる分析を示す。

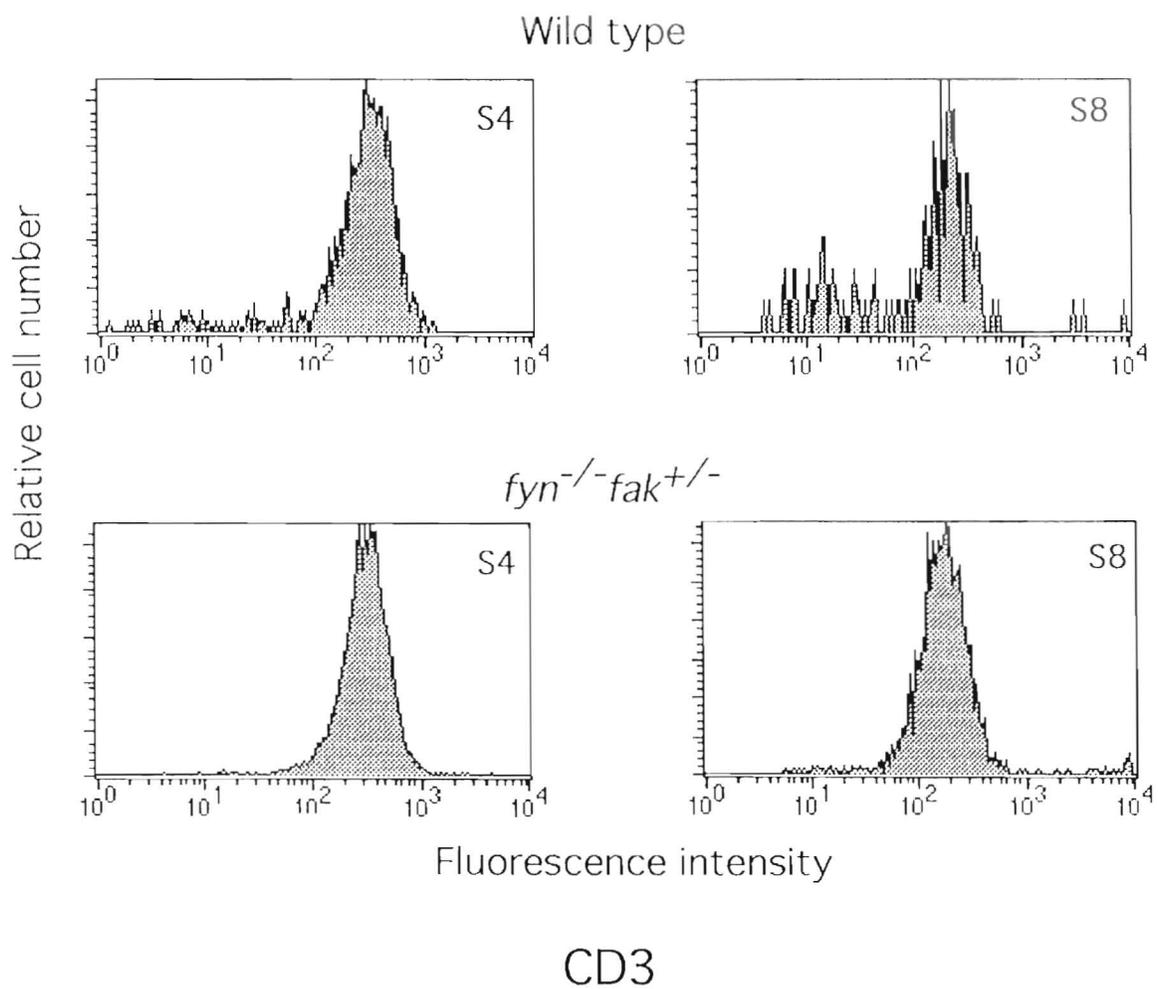


図3-8 フローサイトメーターによる分析 (CD3マーカー)
 S4は、CD4⁺CD8⁻胸腺細胞；S8は、CD4⁻CD8⁺胸腺細胞 (図3-6 参照)

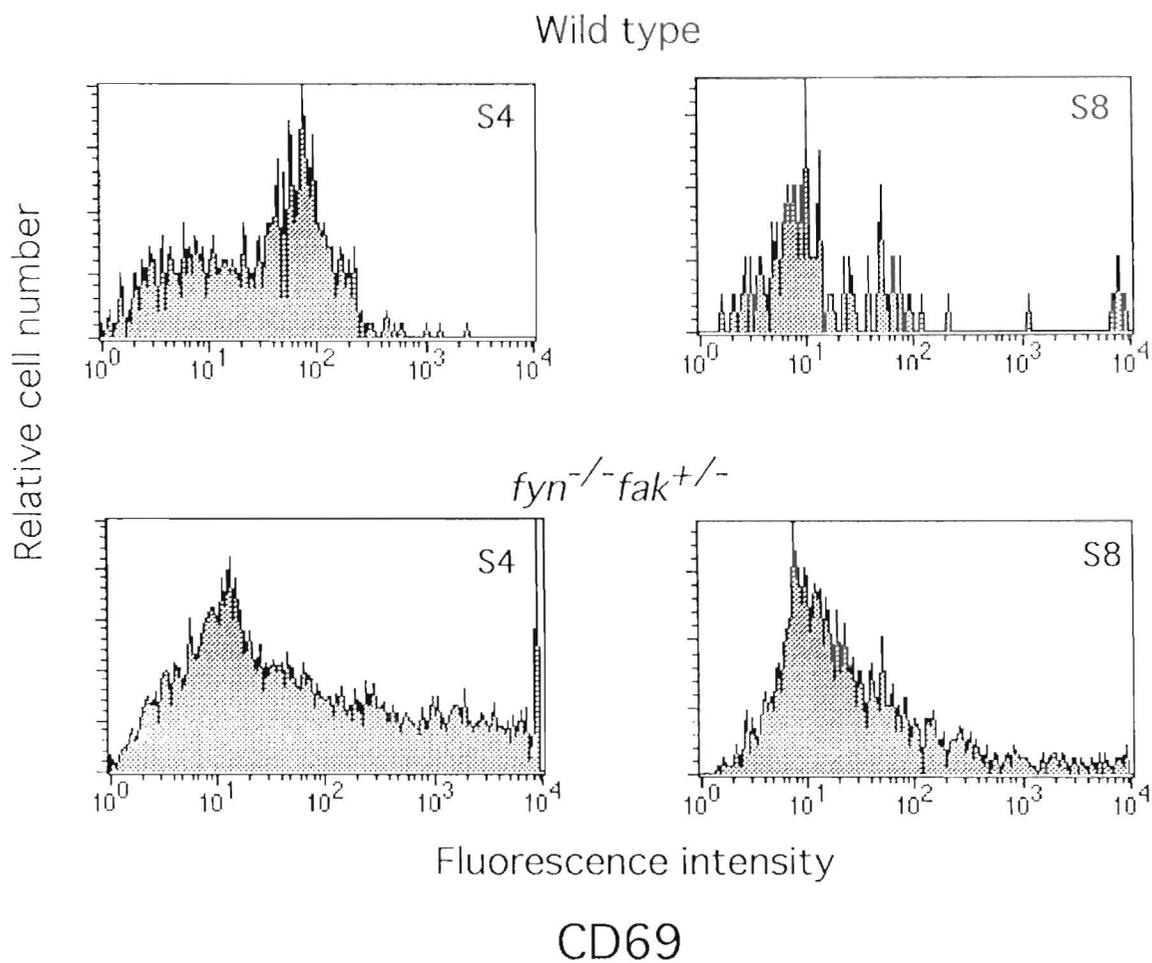


図3-9 フローサイトメーターによる分析 (CD69マーカー)
 S4は、CD4⁺CD8⁻胸腺細胞；S8は、CD4⁻CD8⁺胸腺細胞 (図3-6 参照)

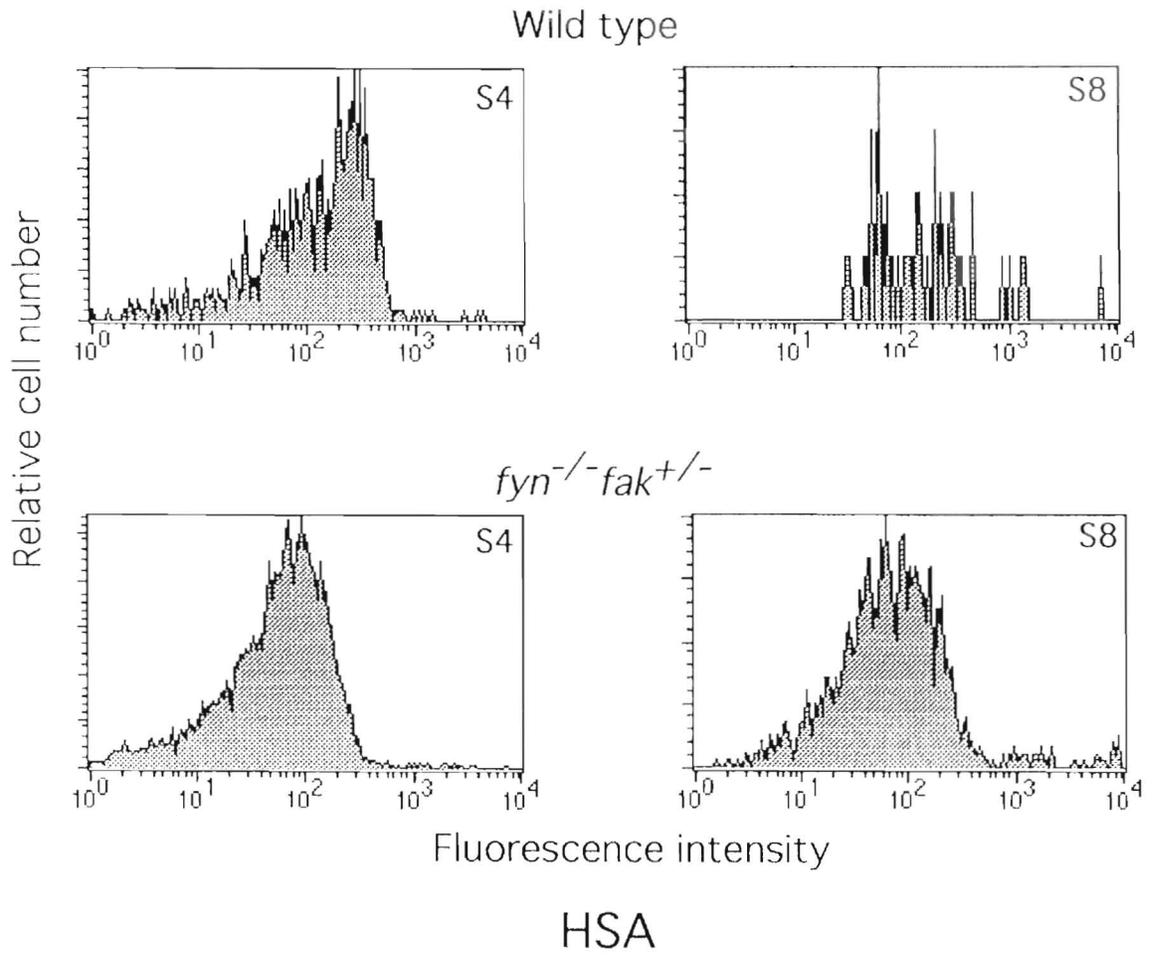


図3-10 フローサイトメーターによる分析 (HSAマーカー)
 S4は、CD4⁺CD8⁻胸腺細胞；S8は、CD4⁻CD8⁺胸腺細胞 (図3-6 参照)

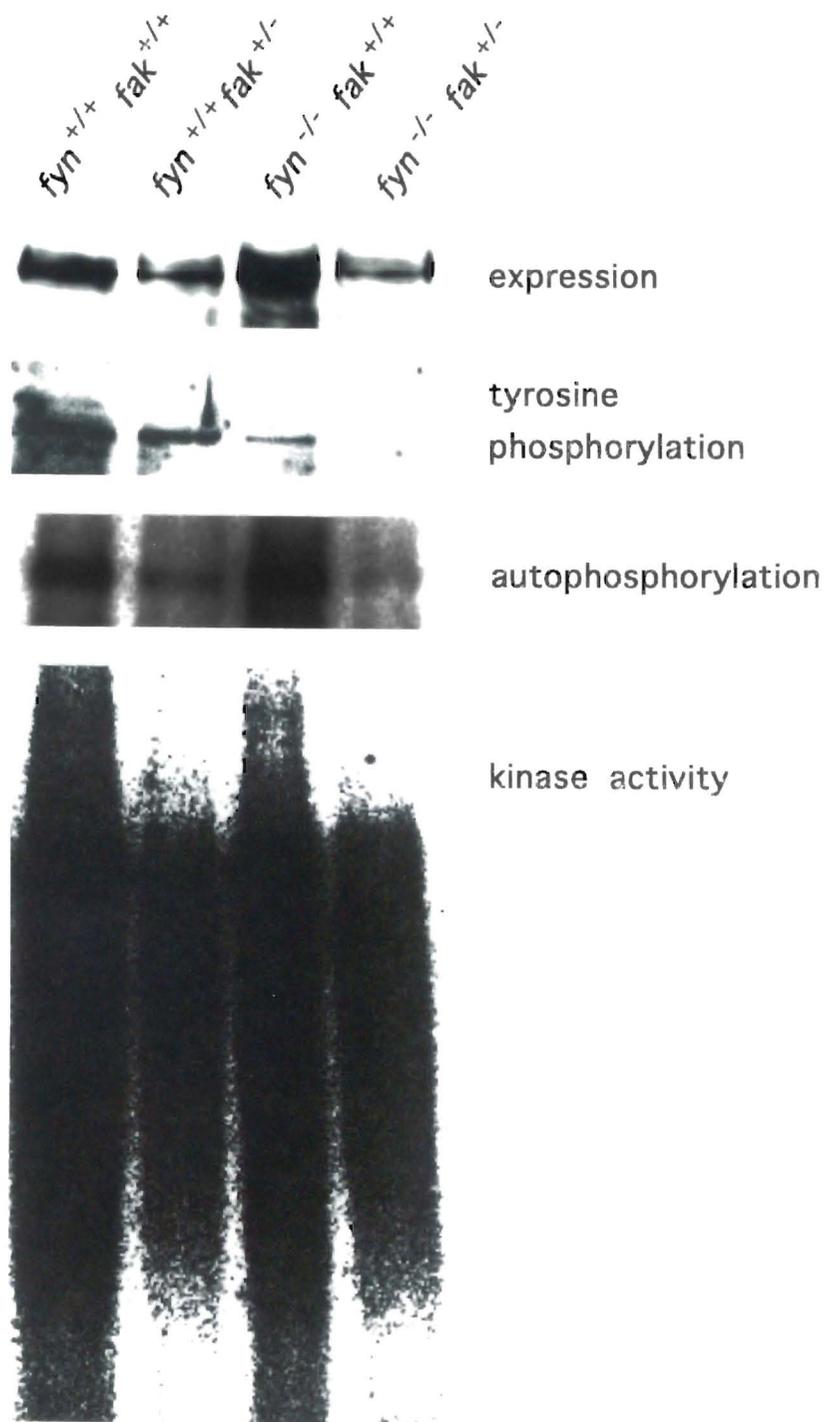


図 3-11 胸腺細胞のp125^{FAK}の発現、リン酸化、自己リン酸化及びキナーゼ活性の分析

p125^{FAK}は、600 mgの胸腺細胞破砕物より抗p125^{FAK}2A7抗体を用い免疫沈降物とした。2/3の免疫沈降物を流し、抗p125^{FAK}JF1抗体でプロットした。残りの免疫沈降物よりp125^{FAK}の自己リン酸化及びキナーゼ活性を行った。Fyn欠損においてチロシンリン酸化が減少するが、自己リン酸化又はキナーゼ活性においては、変化がなかった事が、示されている。

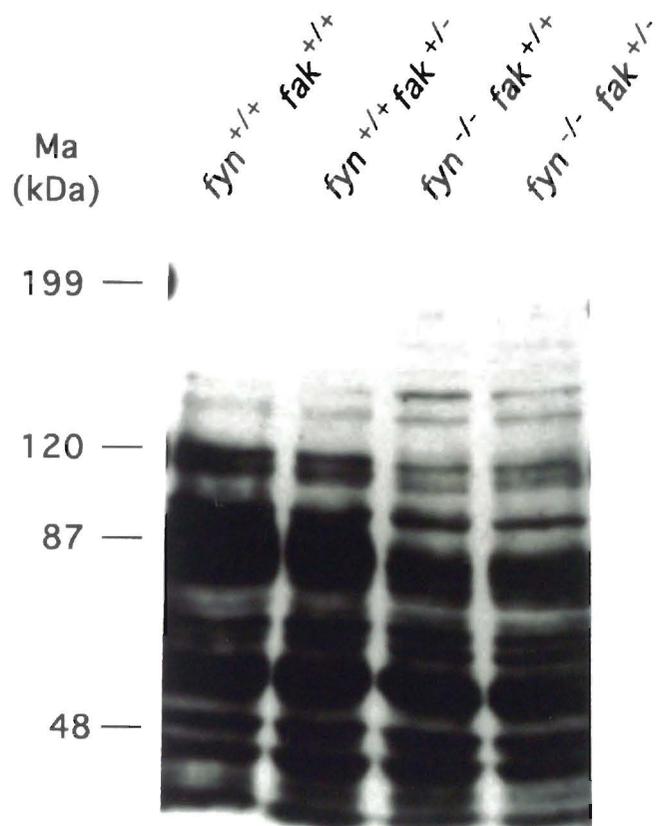


図3-12 胸腺全細胞抽出物のチロシンリン酸化
 60 mg蛋白質/レーンで、それぞれを8% SDS-PAGEで流し、ニトロセルロース膜に転写した後、抗リン酸化チロシン抗体でプロットした。

本章の内容は、

Satoshi Kanazawa, Duško Ilić, Motohiro Hashiyama, Tetsuo Noumura,
Tadashi Yamamoto, Toshio Suda, and Shinichi Aizawa. p59^{fyn}-p125^{FAK}
Cooperation in Development of CD4⁺CD8⁺ Thymocytes. *Blood* in press.

に発表した。

第4章 胸腺細胞に対するインテグリン刺激によるp125^{FAK}のチロシンリン酸化及びリン酸化活性の減少 (Integrin-Stimulation Decreases Tyrosine Phosphorylation and Activity of Focal Adhesion Kinase in Thymocytes)

1. 要旨

FAK, focal adhesion kinase, is expressed in a variety of cell types and has been suggested to transduce signals brought about by integrin-ECM interactions. Integrin stimulation increases tyrosine phosphorylation and activity of FAK in all the cells examined to date. In contrast, in thymocytes stimulation of VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$) and LFA-1 ($\alpha L \beta 2$) resulted in a marked decrease in tyrosine phosphorylation and activity of FAK.

2. 序

p125^{FAK}は、キナーゼドメインを除いて、他の領域においてはこれまで知られている非レセプター型チロシンキナーゼに対して、重要な共通配列等を持っていない。p125^{FAK}は、種々の細胞に発現している (Schaller *et al.*, 1992; Guan *et al.*, 1992)。培養細胞において、p125^{FAK}は、細胞接着斑 (focal adhesion) に存在しており、細胞外基質 (ECM) - インテグリンを介したシグナルトランスダクションに関与すると考えられている。実際にFAK欠損マウスは、胎児期において致死性を示し、フィブロネクチン欠損マウスの表現型に非常に似ている (Furuta *et al.*, 1995; George *et al.*, 1993)。p125^{FAK}の分子レベルでの機能に関しては、未だに明らかにされていない。p125^{FAK}は、*in vitro*の系において、インテグリン $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 及び $\beta 3$ の合成ペプチド鎖に結合することができる (Schaller *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1995)。インテグリンに対するリガンドの結合は、これまでに知られている限り、全ての細胞においてp125^{FAK}のチロシンリン酸化及び活性を増加させる (Kornberg *et al.*, 1992; Haimovich *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995)。活性化したp125^{FAK}は、インテグリン-細胞骨格結合を調節していると考えられている (Clark *et al.*, 1995; Ilić *et al.*, 1995)。

これまでにインテグリンは、T細胞のmigration、homing、recirculation及びrecognition、costimulationに関わっていることが知られている (Mueller *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1990; Sawada *et al.*, 1992; Springer, 1994)。種々のイン

テグリンが、Tリンパ球に発現していて、T細胞の分化に応じてこれらのレパトアー及び発現量等は、変化していく。この中でVLA-4 ($\alpha 4 \beta 2$)とLFA-1 ($\alpha L \beta 2$)は、マウス胸腺細胞において特によく知られているインテグリンであり (Sawada *et al.*, 1992; Springer *et al.*, 1994)、p125^{FAK}もまた胸腺細胞に発現している (Whitney *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1993)。インテグリンを介した胸腺細胞内のシグナル伝達系に関するp125^{FAK}の機能及びT細胞における役割を決定するための最初のステップとして、他の細胞において行われたのと同様にインテグリン刺激によりp125^{FAK}が、活性化されるか否かを実験した。

3. 材料と方法

1) 細胞分離及び細胞培養

初代培養胎児線維芽細胞は、14日胚のC57/B6マウス胎児より分離し (Ilic *et al.*, 1995)、DMEM (GIBCO)、10%牛胎児血清、 10^{-4} M β -メルカプトエタノール (Sigma)、非必須アミノ酸類 (Flow Lab.)及びピルビン酸ナトリウム (Flow Lab.)で培養した。胸腺細胞は、生後26日齢のC57/B6マウスの胸腺より冷却したPBS緩衝液中でピンセット等を用いて分離し、単一細胞とした。

ピペッティングにより単一細胞とした後、100 μ mのメッシュを通した。

2) 胸腺細胞におけるp125^{FAK}の発現

フローサイトメーターを用いて、CD4⁻CD8⁻、CD4⁺CD8⁺、CD4⁺CD8⁻、及びCD4⁻CD8⁺細胞をそれぞれ分別採取し、これらの細胞を用いてRT-PCR法を行った。プライマーとしてA (5'-TCAACAGGTGAAGAGTGACTA 3')、B (5'-GCAGCCTTTGCTTGTCAGGTA-3')、C (5'-CCAGGGATTATGAGATTCAGA-3')、D (5'-GACACCAGAACATTCCGAGCA-3')、E (5'-CCTGCAGACAGCTACAATGAG-3') 及びF (5'-TGGCCGTGTCTGCCCTAGCAT-3') を用いた (図4-1参照)。PCR反応は、10 ngのc-DNAを用い行った (Tsukada *et al.*, 1993)。

3) フローサイトメトリー

胸腺細胞懸濁液は、抗CD32/16 (FC γ II/III レセプター)2.4G2抗体 (PharMingen) 0.5 mg/ 10⁶細胞で処理した後、R-phycoerythrin標識抗CD4 RM4-5抗体、ビオチン化抗CD8 53-6.7抗体、fluorescein isothiocyanate標識 rat 抗マウスCD49d MFR4.B 抗体(9C10) (PharMingen)及びfluorescein isothiocyanate標識抗LFA-1 FD448.1抗体 (京都大学、喜納辰夫博士より供与) で処理後、FACS vantage (Becton Dickinson) を用い分析した (Okada *et al.*, 1993)。

4) インテグリン刺激及びp125^{FAK}の発現、リン酸化、自己リン酸化 およびリン酸化活性

初代培養胎児線維芽細胞は、非酵素性細胞解離液 (Sigma)で単細胞化した。培養ディッシュを予め10 mg/ml フィブロネクチン (Sigma) で2時間処理した後、熱処理した3%ウシ血清アルブミン、PBS緩衝液で1時間ブロッキングした。懸濁した細胞は、DMEM培地で1時間培養する。抗体による刺激は、以下の様に行った。

5×10^7 細胞/0.2 ml AIMV 培養液 (GIBCO)をそれぞれの1次抗体 (50 mg/ml)で、4℃において1時間処理する。その後、冷却したPBS緩衝液にて2回洗浄し、1次抗体を洗い流した (Jewell *et al.*, 1995)。処理後、0.2 ml AIMV 培養液に再懸濁し、37℃で10分間、2次抗体 (100 mg/ml)処理し、最終的に、再度PBS緩衝液にて2回洗浄し、細胞破碎懸濁液を作製した。対照の細胞は、処理しないもの及び2次抗体のみ処理したもの等から得た。この細胞破碎懸濁液より、抗p125^{FAK}JF1抗体を用い免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティング法を行った (Nada *et al.*, 1993)。p125^{FAK}のリン酸化活性は、5 mgの4 : 1 Poly (Glu, Tyr) (Sigma) を使用し、結果は、BAS 2000 (Fuji)を用い解析した。

5) 試薬

インテグリン刺激1次抗体として、抗マウスCD29 ($\beta 1$ integrin) 9EG7抗体、抗マウスCD11a (αL) M17/4抗体 (PharMingen)、ウサギ抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体 (Scripps Institute、Dr. Y. Takadaより供与) 及び抗LFA-1 FD448.1抗体 (京都大学、喜納 辰夫博士より供与) を用いた。2次抗体として、ヒツジ抗ウサギIgG血清またはヒツジ抗ラットIgG血清 (Cappel)を用いた。p125^{FAK}免疫沈降用には、抗p125^{FAK}2A7モノクローナル抗体 (UBI)を用いた。ウエスタンブロッティング法には、ウサギ抗p125^{FAK}JF1抗体 (東京大学、山本雅博士より供与) を使用した。リン酸化チロシンは、抗リン酸化チロシン4G10モノクローナル抗体 (UBI)を使用した。

4. 結果

1) 胸腺細胞のp125^{FAK}の発現

p125^{FAK}は、胸腺細胞に発現していることが知られている。そこでさらにDN、DP、SP細胞のどの分画に発現しているかを調べるために、フローサイトメーターによる分別採取を行い、各細胞分画を得た。これらの細胞からm-RNA精製し、cDNAを作製した。この後p125^{FAK}に対する特異的なプライマー（N-末端に対してはA及びB、キナーゼ領域に対してはC及びD、C-末端に対してはE及びF）を用いPCR法で確認した。DN、DP、SP細胞すべての細胞分画でp125^{FAK}の発現は見られ、さらに半定量的なPCR法でみた時、SP細胞での発現が若干弱いことを確認している（図4-1）。

2) 胸腺細胞におけるVLA-4及びLFA-1の発現

VLA-4のDN、DP及びSP細胞における発現は、フローサイトメーターを用い、CD4、CD8、VLA-4の同時染色によって行った。その発現は、DN細胞で最も強く、DN細胞で弱く、SP細胞ではさらに弱かった。即ち胸腺細胞の成熟に伴って発現量が減少していくことが分かる。一方LFA-1の発現を見ると、VLA-4とは逆にT細胞の成熟に伴って発現量が増加していく（図4-2）。

3) 線維芽細胞に対するインテグリン刺激後のp125^{FAK}リン酸化、 自己リン酸化活性及びリン酸化活性

コントロール細胞として、線維芽細胞における、インテグリン刺激後のp125^{FAK}リン酸化、自己リン酸化活性及びPoly (Glu, Tyr)へのリン酸化活性を調べた。フィブロネクチン被膜デッシュ上の細胞（図4-3、レーン2）をディッシュからはがすと、速やかにp125^{FAK}のリン酸化、自己リン酸化活性及びリン酸化活性が減少する。この懸濁状態の細胞を更に抗インテグリン抗体で刺激すると、細胞をプレーティングした時と同様にp125^{FAK}のリン酸化、自己リン酸化活性及びリン酸化活性は、再び上昇した（図4-3、レーン3）。

4) 胸腺細胞に対するインテグリン刺激後のp125^{FAK}リン酸化、 自己リン酸化活性及びリン酸化活性

胸腺細胞のFAKは、非刺激時でもリン酸化されており、自己リン酸化及びリン酸化活性も検出される。線維芽細胞とは異なり、細胞懸濁状態すなわちECM等の接触のない状態でも、p125^{FAK}が、活性化されていることになる。さらにこの胸腺細胞を抗マウスCD29 ($\beta 1$ integrin)抗体、抗マウスCD11a (αL)抗体、抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体、抗LFA-1抗体で刺激した。いずれの抗体刺激においても、非刺激時に比較して、

p125^{FAK}のリン酸化は減少し、自己リン酸化及びリン酸化活性も同様に減少していた（図4-4）。

5. 考察

胸腺細胞におけるp125^{FAK}の発現をRT-PCR法で調べた。胸腺細胞ではDN、DP及びSP細胞のどの分画においても、*fak*遺伝子m-RNAは、発現していた。半定量的なRT-PCR法での結果と合わせると、おそらく全ての胸腺細胞において、p125^{FAK}は、蛋白質レベルでも発現しており、その発現量は若干SP細胞において低いように見える。またVLA-4及びLFA-1は、DN、DP及びSP細胞の全てに発現しており、分化、成熟の過程に応じてその発現量が変化する。

次に、初代培養のマウス胎児線維芽細胞に対して、抗体によるインテグリン刺激を行った。その結果は、培養細胞等でこれまでに報告されているものと同様、p125^{FAK}のリン酸化、自己リン酸化及びリン酸化活性は、非刺激時において低く、抗 β 1インテグリン抗体刺激によって、上昇した。一方、胸腺細胞のp125^{FAK}は、非刺激時には活性化されているが、刺激時には逆に非活性化されることが分かった。

p125^{FAK}はインテグリンと結合しているが、線維芽細胞と胸腺細胞とでは上述のように明らかに反対の様相を呈した。これはリンパ球と他の細胞との間では、インテグリンの働きに異なる点があることを予想させる。線維芽細胞においてECM-インテグリンによるp125^{FAK}の活性化は、細胞接着斑のターンオーバーを上げることにより、細胞の運動性を刺激すると考えられている (Ilić *et al.*, 1995)。胸腺細胞におけるVLA-4及びLFA-1を介した会合は、細胞の分化時の細胞間の接着に参与することが予想される (図4-5)。インテグリンを介したp125^{FAK}へのシグナルが、細胞表面の分子であるか、ECM分子であるかにより異なる可能性がある。すなわち細胞間の結合なのか、細胞-ECM分子の結合なのかにより異なる。LFA-1は細胞間の接着分子として良く知られていて、ICAM-1、-2、-3と結合する (Springer, 1994)。VLA-4は、V25/CS-1、胸腺ストローマ細胞表面のフィブロネクチンのalternatively spliced segmentと会合する。また末梢のT細胞において、VLA-4は、VCAM-1と会合するが、この会合は、細胞表面接着分子間の結合となる。今後は、胸腺細胞における細胞とECMの会合に参与するVLA-5 (α 5 β 1)、末梢T細胞における細胞同士の会合に参与するVLA-4及びLPAM-1 (α 4 β 7)等に対する抗体刺激時のp125^{FAK}の活性化を調べる必要がある。

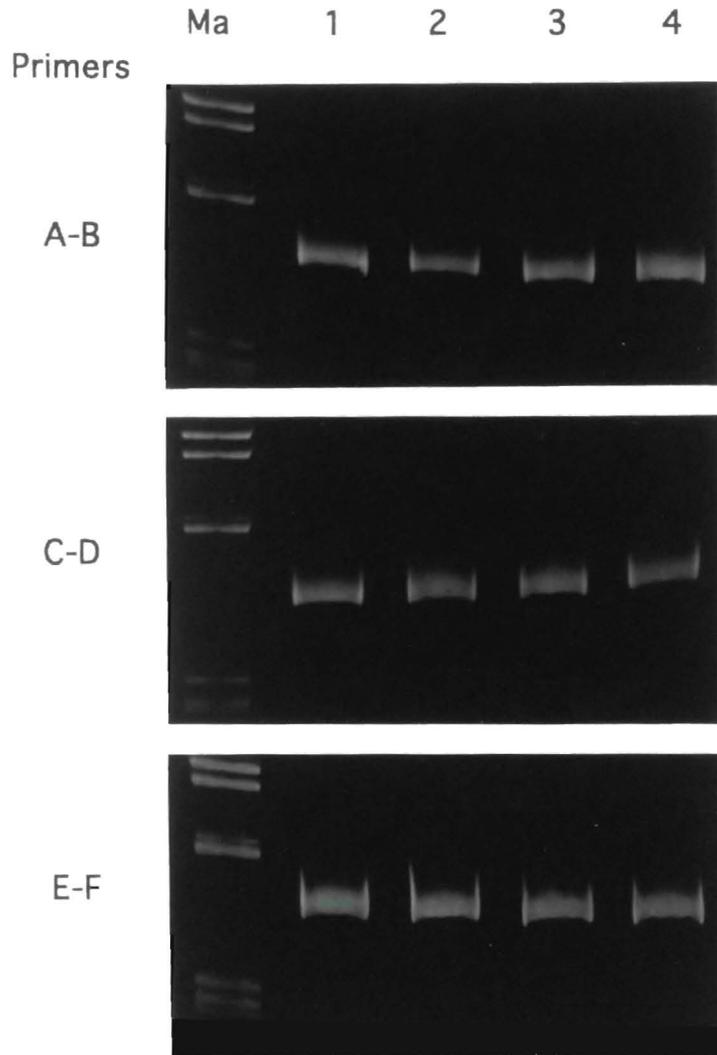


図4-1 胸腺細胞におけるp125^{FAK}発現の半定量的RT-PCR法による解析
 上段：FAK cDNAのマップ。ATGは、転写開始部；A-F、プライマーの位置；
 矢印、プライマーの方向。下段：DN胸腺細胞からのcDNAのRT-PCR法による解析
 (レーン1)、DP胸腺細胞(レーン2)、SP胸腺細胞(レーン3 (CD4⁺ CD8⁻))、レー
 ン4 (CD4⁻ CD8⁺)。DNAのサイズマーカーは、 ϕ x174-Hae III消化。

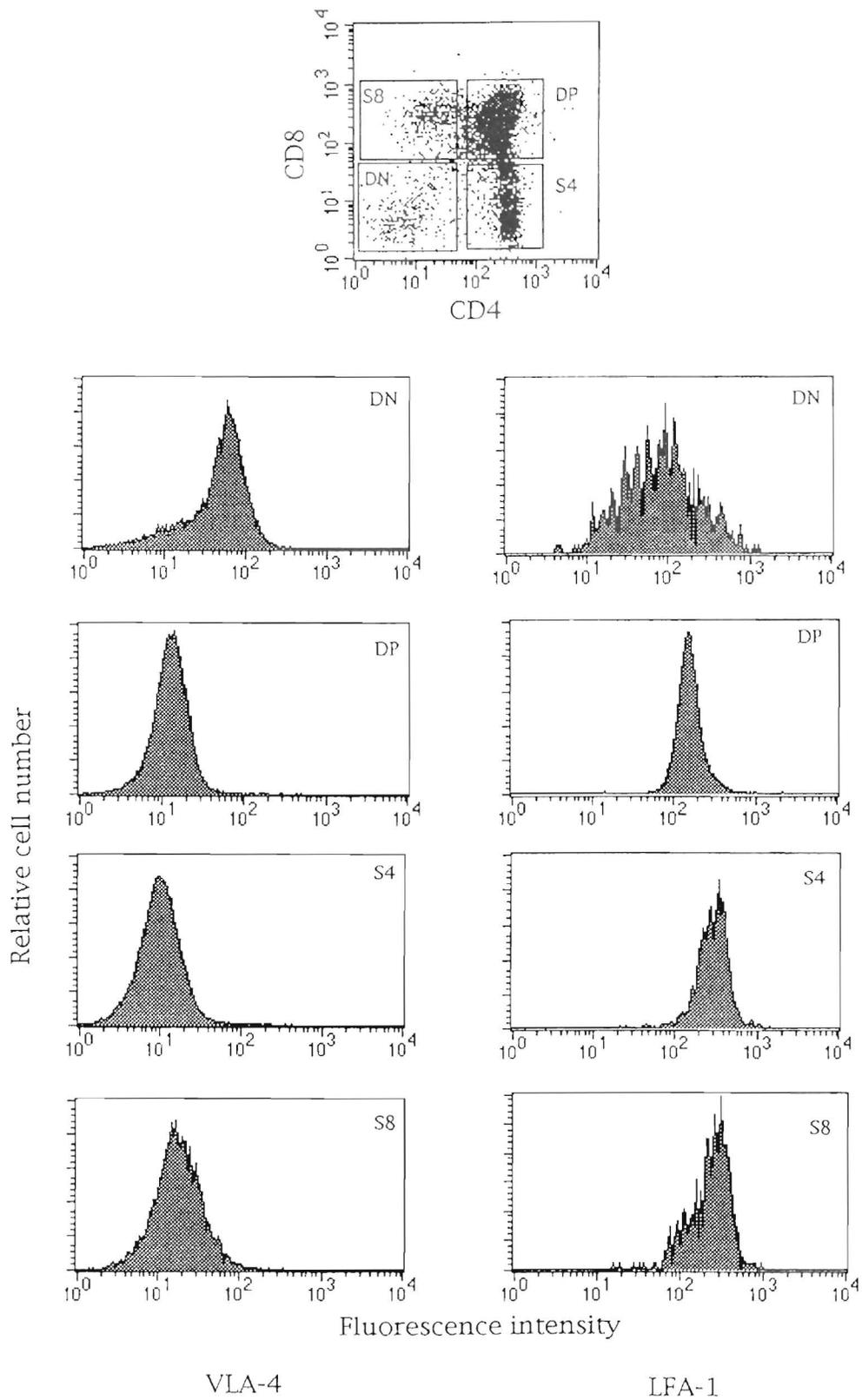


図4-2 胸腺細胞におけるVLA-4とLFA-1の発現パターン

上段のパネルは、CD4、CD8によるゲートを示す。下段左側は、CD49d (VLA-4)、右側は、LFA-1の発現を示す。それぞれDN (CD4⁻CD8⁻)細胞、DP (CD4⁺CD8⁺)細胞、S4 (CD4⁺CD8⁻)細胞、S8 (CD4⁻CD8⁺)細胞を示す。

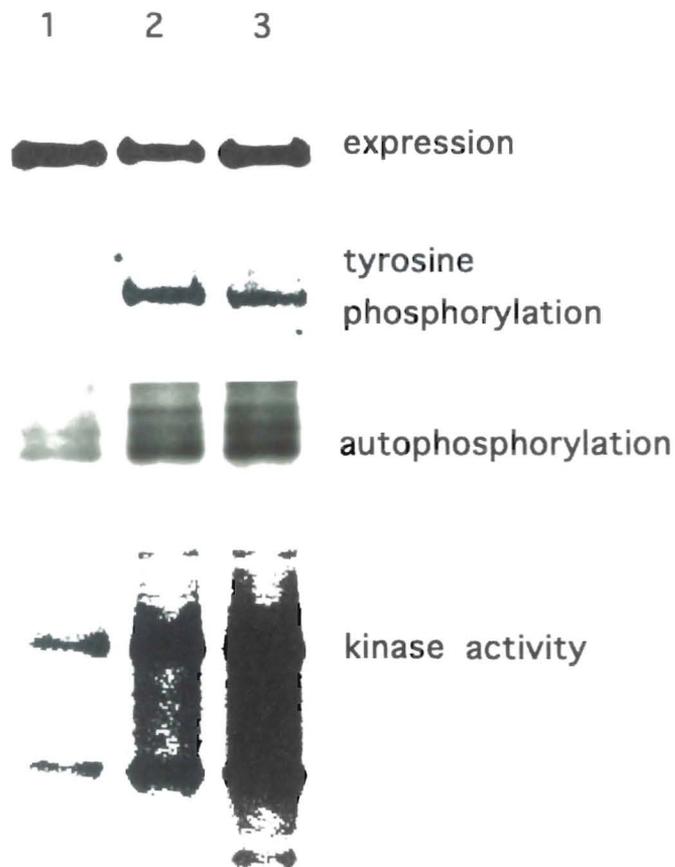


図4-3 胎児線維芽細胞における抗体刺激によるp125^{FAK}のチロシンリン酸化
 5×10^6 細胞のプライマリー胎児線維芽細胞破砕物より抗p125^{FAK}抗体を用い免疫沈降物を得た (レーン1)。フィブロネクチン被膜デッシュに定着した場合 (レーン2)、抗マウスCD29 (β 1)インテグリン抗体を用い細胞懸濁状態で刺激した場合 (レーン3)。1段目のパネルは、同じ抗p125^{FAK}抗体によりウエスタンブロットティングしたもの。ニトロセルロース膜は、ストリップ後、抗リン酸化チロシン抗体によりリプロットした (2段目)。抗p125^{FAK}抗体免疫沈降物を用い、自己リン酸化活性 (3段目) 及び Poly (Glu、Tyr) 4 : 1 を基質としてリン酸化活性を調べた (4段目)。

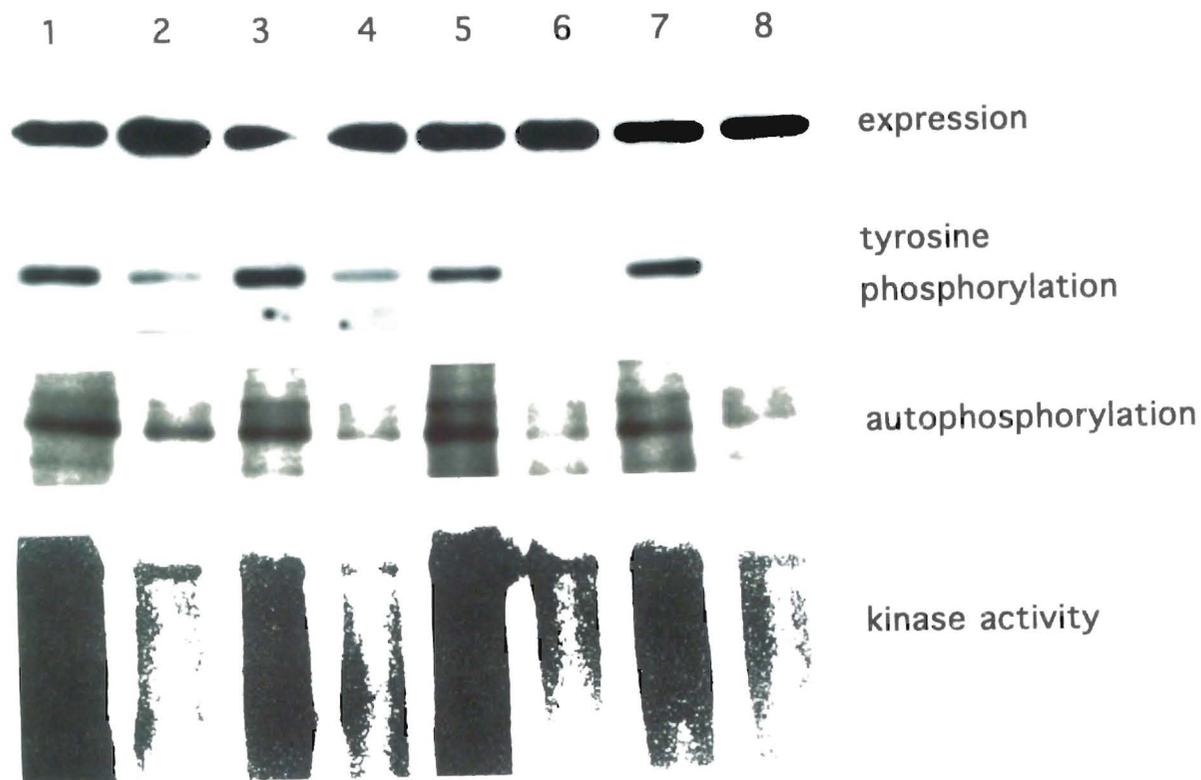
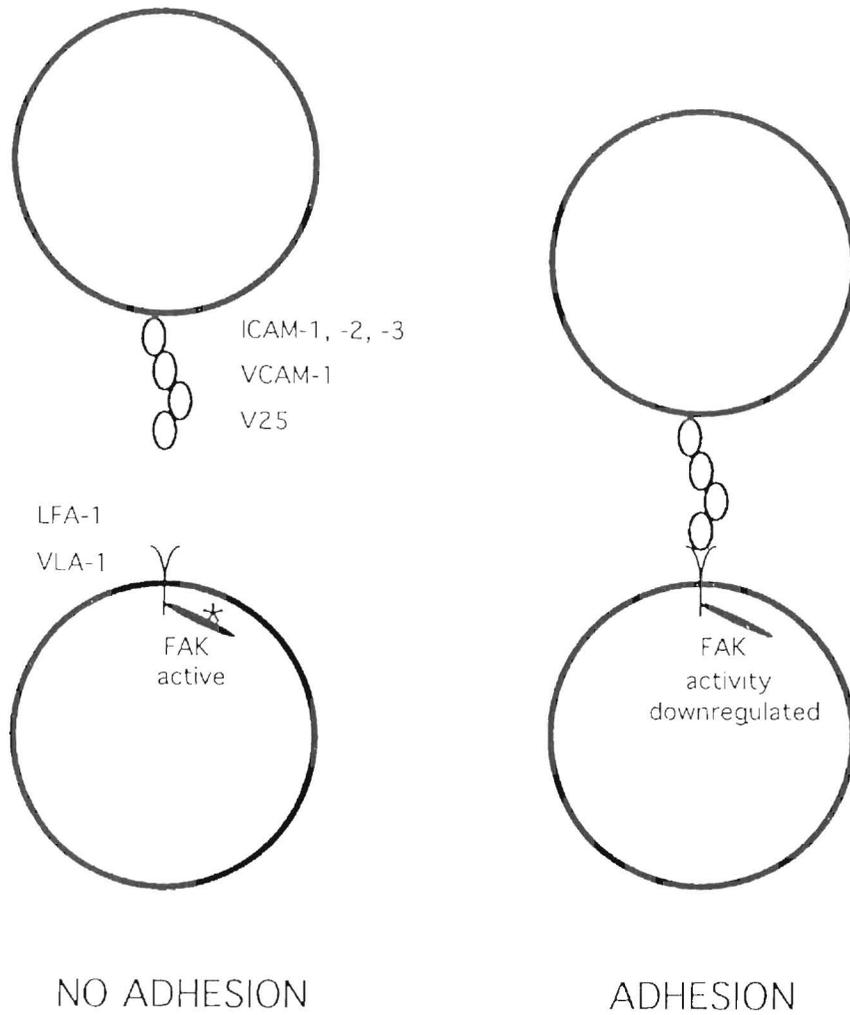


図4-4 胸腺細胞における抗体刺激によるp125^{FAK}のチロシンリン酸化
 5×10^7 胸腺細胞の抗体刺激した（奇数レーン：刺激なし；偶数レーン：刺激あり；
 抗マウスCD29抗体 ($\beta 1$)（レーン2）、抗 $\alpha 4$ 抗体（レーン4）、抗LFA-1抗体（レー
 ン6）と抗CD11a (αL)（レーン8）抗体。



1

図4-5 胸腺T細胞におけるFAKのチロシンリン酸化の役割の推定図

胸腺細胞において通常FAKは、チロシンリン酸化を受けている。この状態では、胸腺T細胞はおそらく抗原提示細胞（APC）等との細胞の接着ができない状態にある。一方FAKが、一度脱リン酸化されると細胞間の接着が可能になる。

本章の内容は、

Satoshi Kanazawa, Duško Ilić, Tetsuo Noumura, Tadashi Yamamoto, and Shinichi Aizawa. 1995. Integrin-Stimulation Decreases Tyrosine Phosphorylation and Activity of Focal Adhesion Kinases in Thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 436-445

に発表した。

第5章 胸腺T細胞におけるp59^{fyn}を中心としたシグナル伝達系について：総括

1. まとめ

これまでに胸腺T細胞の分化及びそのセレクションに関して、多くの研究が成され、大筋として、その制御は1) おそらく細胞間の相互作用を基本としている、2) その際シグナルは細胞表面のレセプターを介して細胞内に伝達されていく、3) このシグナルの一部は、プログラム細胞死と関係する、そして4) 最終的に選択されたT細胞は、免疫系全体を制御する、と考えられている。これらの制御機構の引き金は、T細胞レセプター、costimulator、インターロイキンレセプター等の受容体型膜蛋白質とこれらの直下に存在する非レセプター型チロシンキナーゼである。さらに細胞間相互作用に関わるインテグリン等の分子群もこれに準じていると推定される。これらの制御機構は複雑な階層構造を成していて、特に強い相補性 (redundancy) が存在し、お互いの機能が重複していると考えられている。これらの事実が、ノックアウトマウスによる解析を含む多くの研究により解明されてきた。

さらに本研究を含む新たな実験結果から、相補があるものの各蛋白質にはそれぞれの役割が存在すること、また完全な意味でお互いを相補することができない部分もあることが分かってきた(以下図5-1参照)。本論文第2章の“ノックイン”の結果から、実際に相補性が存在していることを示した。またFyn-FAKダブルミュータントの結果との比較から、p59^{fyn}のT細胞における真の役割が明らかになってきた。即ちp59^{fyn}の下流にp125^{FAK}が存在し、p125^{FAK}を介したシグナル伝達系は、増殖に強く関わる事、これ以外にもおそらくZAP-70を介する系でポジティブセレクションに関与するシグナル伝達系を持つ事を示した。

新たに確認した結果として、*in vivo*におけるp59^{fyn}を介したp120^{cbl}の経路が上げられる。現段階では、p120^{cbl}のリン酸化による伝達系の意味はおそらく細胞増殖に関わるものと推定されるものの、今後更にこの伝達系の真の意味が解明されていくことと思われる。最近ZAP-70のノックアウトマウスが作成され、その結果から、DP細胞よりSP細胞への分化、特にポジティブセレクション及びネガティブセレクションに関与している事が証明された (Negishi *et al.*, 1995)。このことから“ノックイン”マウスにおけるZAP-70のリン酸化の減少が、SP細胞の減少の一因であることが推定された。今後は、p59^{fyn}のネガティブセレクションへの役割についても調べていく必要がある。

また、p125^{FAK}についても、細胞接着斑の形成のターンオーバーの制御蛋白質としての役割の他に、T細胞の分化に関わるシグナル伝達系に深く関与することが本論文から示されたが、その作用機構や伝達機構については全く分かっていない。現在p59^{fyn}

及びp125^{FAK}の共通のリン酸化ターゲットを含め、今後この下流の因子について順次明らかにして行きたいと考えている。

一方インテグリン刺激後のp125^{FAK}のリン酸化の減少は、上述の細胞分化を直接制御する細胞間相互作用に関与していると考えられる。つまり細胞同士が強い結合を要求するとき、p125^{FAK}のリン酸化を低減することにより、細胞接着斑の構造の破壊を防ぎ、細胞接着が維持できるようになるという仮説に基づいている。この機構は、細胞接着の基本的な現象で、特にT細胞においては、DP細胞の教育に必須と考えられる、胸腺上皮細胞や抗原提示細胞（APC）との結合の際、重要な働きを果すものと仮定している。さらにこの結合様式は、LFA-1に関するデータから、少なくとも一部のcostimulatorにも当てはまるものと考えられる。今後は、このp125^{FAK}自身のリン酸化の減少がどのような機構によるものか、またこの系を介して実際にどのようなシグナル伝達系が働き出すのかについて明らかにして行きたいと考えている。

2. 論文 “概要”

本論文により明らかにされた内容を以下に示す。

1. *csk*遺伝子を*fyn*遺伝子座に“ノックイン”したマウスを作成することより、胸腺細胞内において、Srcファミリー非レセプター型チロシンキナーゼ間には、相補性が存在する事を示した。
2. *p59fyn*の機能は、これまでに胸腺T細胞等におけるSP細胞（single positive cell、 $CD4^+CD8^-$ 細胞および $CD4^-CD8^+$ 細胞）への分化、増殖及びネガティブセレクション (negative selection) に関与していることが示されていたが、本論文によりポジティブセレクション (positive selection)にも関与することが示唆された。
3. *p59fyn*は分化増殖の際、ZAP-70、*p120cbl*を介すシグナル伝達系に関与することがこれまで*in vitro*の実験により示唆されていた。本論文は、*in vivo*の系でも実際にこの伝達系が存在する事を示した。
4. *p125FAK*は、これまで細胞接着斑形成に必要な蛋白質と考えられていた。本論文により、さらに、胸腺細胞の分化に関与するシグナル伝達系に必要な蛋白質であることが示された。
5. 胸腺細胞における、*p59fyn*による*p125FAK*のチロシンリン酸化部位は、自己リン酸化能及び活性化能を調節しない事を示した。この部位は、むしろ*p125FAK*のアダプター蛋白質としての役割を調整する可能性があると考えられる。
6. 胸腺細胞に対して種々のインテグリン刺激を行ったところ、*p125FAK*のリン酸化は、線維芽細胞等で知られていた事実とは異なり、減少することを示した。この現象は、*p125FAK*の役割は細胞の接着のターンオーバーの調整にあるという、最も新しい仮説と良く合致する結果である。

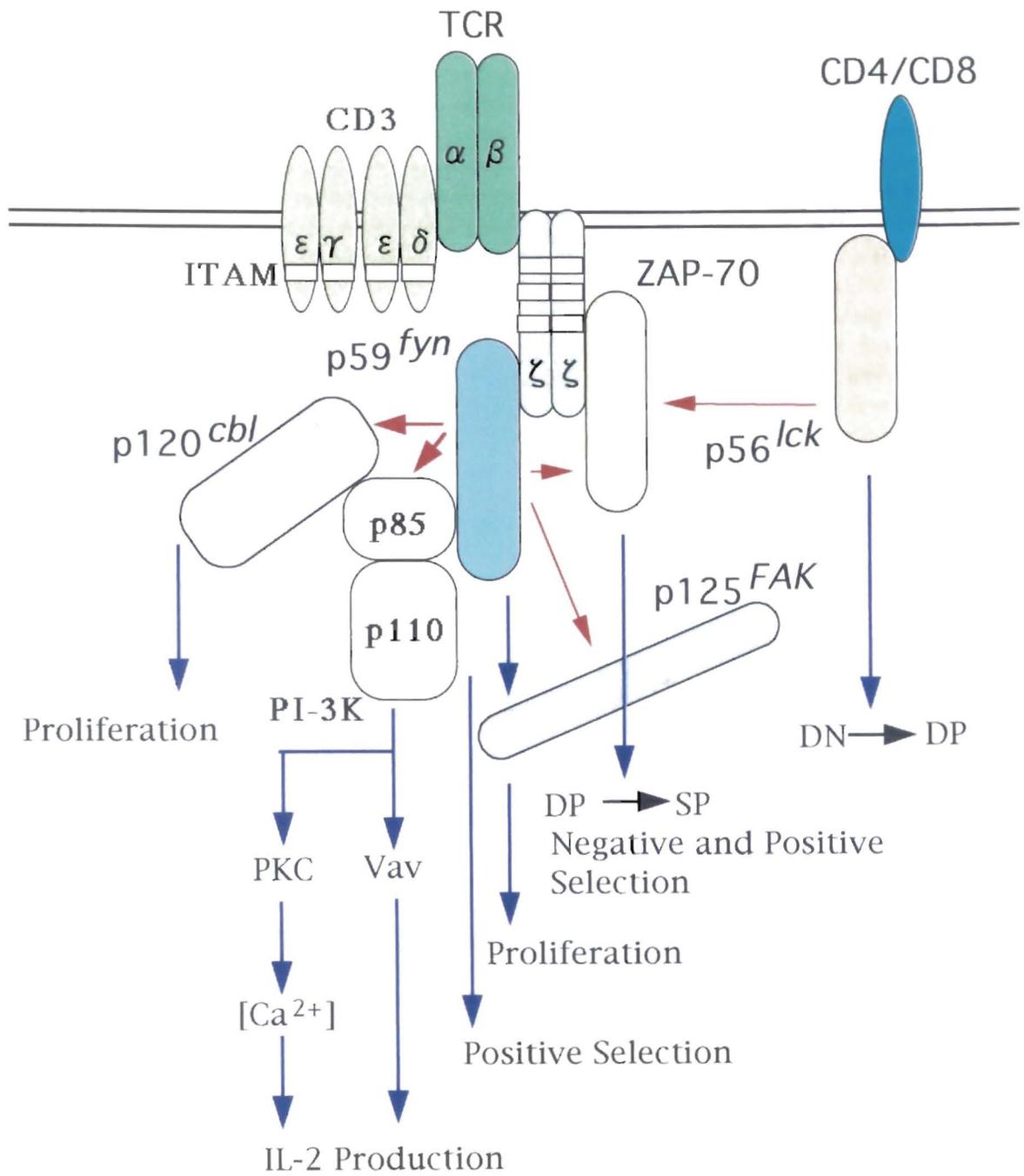


図5-1 胸腺T細胞におけるp59fynを中心としたTCRシグナル伝達系の役割

参考文献

- Alland, L., S.M. Peseckis, R.E. Atherton, L. Berthiaume, and M.D. Resh. 1994. Dual myristylation and palmitoylation of Src family member p59^{lyn} affects subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 269:16701-16705
- Andre, E., and M.B. Andre. 1993. Expression of an N-terminally truncated form of human focal adhesion kinase in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:140-147
- Appleby, M.W., J.A. Gross, M.P. Cooke, S.D. Levin, and R.M. Perlmutter. 1992. Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59^{lyn}. *Cell* 70:751-763
- Bendelac, A., P. Matzinger, R.A. Seder, W.E. Paul, and R.H. Schwartz. 1992. Activation events during thymic selection. *J. Exp. Med.* 175:731-742
- Bishop, J.M. 1991. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64:235-248
- Black, T.J., K.G. Heath, and W.L. Langdon. 1993. The truncation that generated the *v-cbl* oncogene reveals an ability for nuclear transport, DNA binding and acute transformation. *EMBO J.* 12:2017-2026
- Calalb, M.B., T.R. Polte, and S.K. Hanks. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 15:954-963
- Chan, A.C., M. Iwashima, C.W. Turck, and A. Weiss. 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinases that associates with the TCR ζ chain. *Cell* 71:649-662
- Chan, S.H., D. Cosgrove, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell* 73:225-236
- Choi, K., M. Kennedy, and G. Keller. 1993. Expression of a gene encoding a unique protein-tyrosine kinase within specific fetal- and adult-derived hematopoietic lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5747-5751
- Chow, L.M.L., M. Fournel, D. Davidson, and A. Veillette. 1993. Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50^{csk}. *Nature* 365: 156-160
- Clark, E.A., and J.S. Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road is taken. *Science* 268:233-239
- Cobb, B.S., M.D. Schaller, T.-H. Leu, and J.T. Parsons. 1994. Stable association of pp60^{src} and p59^{lyn} with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125^{FAK}. *Mol. Cell Biol.* 14:147-155
- Donovan, J.A., R.L. Wange, W.Y. Langdon, and L.E. Samelson. 1994. The protein product of the *c-cbl* protooncogene is the 120-kDa tyrosine-phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 269:22921-22924

- Furuta, Y., D. Ilić, S. Kanazawa, N. Takeda, T. Yamamoto, and S. Aizawa. 1995. Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene* 11:1989-1995
- Fusaki, N., K. Semba, T. Katagiri, G. Suzuki, S. Matsuda, and T. Yamamoto. 1994. Characterization of p59^{fyn}-mediated signal transduction on T cell activation. *Int. Immunol.* 6:1245-1255
- Gauen, L.K.T., T.A.-N. Kong, L.E. Samelson, and A.S. Shaw. 1992. p59^{fyn} tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* 12:5438-5446
- George, E.L., G.E. N. Labouesse, P.R.S. King, H. Rayburn, and R.O.Hynes. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119:1079-1091
- Guan, J.-L., and D. Shalloway. 1992. Regulation of focal adhesion associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 358:690-692
- Guidos, C.J., J.S. Danska, C.G. Fathman, and I.L. Weissman. T cell receptor-mediated negative selection of autoreactive T lymphocyte precursors occurs after commitment to the CD4 or CD8 lineages. *J. Exp. Med.* 172:835-845
- Grant, S.G.N., T. J. O'Dell, K.A. Karl, P.L. Stein, P. Soriano, and E.R. Kandel. 1992. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science* 258:1903-1910
- Grant, S.G.N., K.A. Karl, M.A. Kiebler, and E.R. Kandel. 1995. Focal adhesion kinase in the brain: novel subcellular localization and specific regulation by Fyn tyrosine kinase in mutant mice. *Genes & Dev.* 9:1909-1921
- Gross, J.A., M.W. Appleby, S. Chien, S. Nada, S.H. Bartelmez, M.Okada, S. Aizawa, and R.M. Perlmutter. 1995. Control of lymphopoiesis by p50^{csk}, a regulatory protein tyrosine kinase. *J. Exp. Med.* 181:463-473
- Haimovich, B., L. Lipfert, J.S. Brugge, and S.J. Shattil. 1993. Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal reorganization in platelets are triggered by interaction of integrin receptors with their immobilized ligands. *J. Biol. Chem.* 268:15868-15877
- Hanks, S.K., M.B. Calalb, M.C. Harper, and S.K. Patel. 1992. Focal adhesion protein-kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8487-8491
- Hardie, G., and S. Hanks. 1995. The protein kinase factsbook. Academic press.
- Hunter, T. 1991. Cooperation between oncogenes. *Cell* 64:249-270
- Ilić, D., Y. Furuta, T. Suda, T. Atsumi, J. Fujimoto, Y. Ikawa, T. Yamamoto, and S.Aizawa. 1995. Focal adhesion kinase is not essential for *in vitro* and *in vivo* differentiation of ES cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:300-309

- Ilić, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, T. Yamamoto, and S. Aizawa. 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377:539-544
- Imamoto, A., and P. Soriano. 1993. Disruption of the *esk* gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice. *Cell* 73:1117-1124
- Jove, R., and H. Hanafusa. 1987. Cell transformation by the viral *src* oncogene. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 3:31-56
- Kanazawa, S., D. Ilić, T. Noumura, T. Yamamoto, and S. Aizawa. 1995. Integrin-stimulation decreases tyrosine phosphorylation and activity of focal adhesion kinase in thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:436-445
- Kanazawa, S., D. Ilić, M. Hashiyama, T. Noumura, T. Yamamoto, T. Suda, and S. Aizawa. p59^{fyn}-p125^{FAK} Cooperation in Development of CD4⁺CD8⁺ Thymocytes. *Blood* in press.
- Kanner, S.B., A.B. Reynolds, R.R. Vines, and J.T. Parsons. 1990. Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3328-3332
- Keller, G., M. Kennedy, T. Papayannopoulou, and M.V. Wiles. 1993. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell. Biol.* 13:473-486
- Kolanus, W., C. Romeo, and B. Seed. 1993. T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 74:171-183
- Kornberg, L., H.S. Earp, J.T. Parsons, M. Schaller, and R.L. Juliano. 1992. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 267:23439-23442
- Lancaster, J.S., A.S. Shaw, J.B. Rothbard, and P.M. Allen. 1994. Partial T cell signaling: Altered phospho- ζ and lack of Zap-70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 79:913-922
- Lancki, D.W., D. Quian, P. Fields, T. Gajewski, and F.W. Fitch. 1995. Differential requirement for protein tyrosine kinase Fyn in the functional activation of antigen-specific T lymphocyte clones through the TCR or Thy-1. *J. Immunol.* 154:4363-4370
- Levin, S.D., K.M. Abraham, S.J. Anderson, K.A. Forbush, and R.M. Perlmutter. 1993. The protein tyrosine p56^{lck} regulates thymocyte development independently of its interaction with CD4 and CD8 coreceptors. *J. Exp. Med.* 178:245-255
- Lin, T.H., C. Rosales, K. Mondal, J.B. Bolen, S. Haskill, and R.L. Juliano. 1995. Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 270:16189-16197

- Lowell, C.A., P. Soriano, and H.E. Varmus. 1994. Functional overlap in the src gene family: inactivation of *hck* and *fgr* impairs natural immunity. *Genes & Dev.* 8:387-398
- Molina, T.J., K. Kishihara, D.P. Siderovski, W. van Ewijk, A. Narendran, E. Timms, A. Wakeham, D. Davidson, and T.W. Mak. 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56^{lck}. *Nature* 357:161-164
- Mueller, D.L., M.K. Jenkins, and R.H. Schwartz. 1989. An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness. *J. Immunol.* 142:2617-2628
- Nada, S., M. Okada, A. MacAuley, J.A. Cooper, and H. Nakagawa. 1991. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60^{c-src}. *Nature* 351:69-72
- Nada, S., T. Yagi, H. Takeda, T. Tokunaga, H. Nakagawa, Y. Ikawa, M. Okada, and S. Aizawa. 1993. Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell* 73:1125-1135
- Negishi, I., N. Motoyama, K. Nakayama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A.C. Chan, and D.Y. Loh. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376:435-438
- Okada, M., and H. Nakagawa. 1989. A protein tyrosine kinases involved in regulation of pp60^{c-src} function. *J. Biol. Chem.* 264:20886-20893
- Okada, M., S. Nada, Y. Yamanashi, T. Yamamoto, and H. Nakagawa. 1991. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J. Biol. Chem.* 266:24249-24252
- Okada, S., K. Nagayoshi, H. Nakauchi, S. Nishikawa, Y. Miura, and T. Suda. 1993. Sequential analysis of hematopoietic reconstitution achieved by transplantation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 81:1720-1725
- Perlmutter, R.M., S.D. Levin, M.W. Appleby, S.J. Anderson, and J. Alberola-Ila. 1993. Regulation of lymphocyte function by protein phosphorylation. *Annu. Rev. Immunol.* 11:451-499
- Resh, M.D. 1994. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76:411-413
- Rudd, C.E., O. Janssen, Y.-C. Cai, A.J. da Silva, M. Raab, and K.V.S. Prasad. 1994. Two-step TCR ζ /CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SII3 domains, protein-tyrosine and lipid kinase. *Immunol. Today.* 15:225-234
- Sarosi, G.A., P.M. Thomas, M. Egerton, A.F. Phillips, K.W. Kim, E. Bonvini, and L.E. Samelson. 1992. Characterization of the T cell antigen receptor-p60^{fyn} protein tyrosine kinase association by chemical cross-linking. *Int. Immunol.* 4:1211-1217

- Salomon, D.R., C.F. Mojcik, A.C. Chang, S. Wadsworth, D.H. Adams, J.E. Coligan, and E.M. Shevach. 1994. Constitutive activation of integrin $\alpha 4 \beta 1$ defines a unique stage of human thymocyte development. *J. Exp. Med.* 179:1573-1584
- Samelson, L.E., A.F. Phillips, E.T. Luong, and R.D. Klausner. 1990. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4358-4362
- Samelson, L.E., and R.D. Klausner. 1992. Tyrosine kinases and tyrosine-based activation motifs. *J. Biol. Chem.* 267:24913-24916
- Sawada, M., J. Nagamine, K. Takeda, K. Utsumi, A. Kosugi, Y. Tatsumi, T. Hamaoka, K. Miyake, K. Nakajima, T. Watanabe, S. Sakakibara, and H. Fujiwara. 1992. Expression of VLA-4 on thymocytes. *J. Immunol.* 149:3517-3524
- Schaller, M.D., C.A. Borgman, B.S. Cobb, R.R. Vines, A.B. Reynolds, and J.T. Parsons. 1992. pp125^{FAK}, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5192-5196
- Schaller, M.D., and J.T. Parsons. 1994. Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 6:705-710
- Shimizu, Y., G.A. van Seventer, K.J. Horgan, and S. Shaw. 1990. Roles of adhesion molecules in T-cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and costimulation. *Immunol. Rev.* 114:109-143
- Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76:301-314
- Stein, P.L., H.-M. Lee, S. Rich, and P. Soriano. 1992. pp59^{fyn} mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 70:741-750
- Stein, P.L., H. Vogel, and P. Soriano. 1994. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes & Dev.* 8:1999-2007
- Straus, D.B., and A. Weiss, 1993. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J. Exp. Med.* 178:1523-1530
- Tamura, T., T. Yanagida, and H. Nariuchi. 1993. Difference in signal transduction pathway for IL-2 and IL-4 production in T helper 1 and T helper 2 cell clones in response to anti-CD3. *J. Immunol.* 151:6051-6061
- Thomas, S.M., P. Soriano, and A. Imamoto. 1995. Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing cytoskeleton. *Nature* 376:267-271
- Tsukada, T., Y. Tomooka, S. Takai, Y. Ueda, S. Nishikawa, T. Yagi, T. Tokunaga, N. Takeda, Y. Suda, S. Abe, I. Matsuo, Y. Ikawa, and S. Aizawa. 1993. Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene* 8:3313-3322

- Umemori, H., S. Sato, T. Yagi, S. Aizawa, and T. Yamamoto. 1994. Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* 367:572-576
- Veillette, A., M.A. Bookman, E.M. Horak, and J.B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell* 55:301-308
- Weil, R., J.-F. Cloutier, M. Fournel, and A. Veillette. 1995. Regulation of Zap-70 by src family tyrosine protein kinases in an antigen-specific T-cell line. *J. Biol. Chem.* 270:2791-2799
- Weiss, A., and D.R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-274
- Whitney, G.S., P.-Y. Chan, J. Blake, W.L. Cosand, M.G. Neubauer, A. Aruffo, and S.B. Kanner. 1993. Human T and B lymphocytes express a structurally conserved focal adhesion kinase, pp125^{FAK}. *Dev. Cell Biol.* 12:823-830
- Yagi, T., T. Tokunaga, Y. Furuta, S. Nada, M. Yoshida, T. Tsukada, Y. Saga, N. Takeda, Y. Ikawa, and S. Aizawa. 1993a. A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Analyt. Biochem.* 214:70-76
- Yagi, T., S. Nada, N. Watanabe, N. Tamemoto, N. Kohmura, Y. Ikawa, and S. Aizawa. 1993b. A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Analyt. Biochem.* 214:77-86
- Yagi, T., Y. Shigetani, N. Okada, T. Tokunaga, Y. Ikawa, and S. Aizawa. 1993c. Regional localization of Fyn in adult brain; studies with mice in which fyn gene was replaced by lacZ. *Oncogene* 8:3343-3351
- Yagi, T., Y. Shigetani, Y. Furuta, S. Nada, M. Okada, Y. Ikawa, and S. Aizawa. 1994. Fyn expression during early neurogenesis in mouse embryos. *Oncogene* 9:2433-2440

謝辞

本研究は、多くの方々の御指導並びに共同研究によって完成されました。ここに、その方々の御名前を記して感謝の意を表したいと思います。

埼玉大学理学部・生体制御学科
能村 哲郎教授

熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設・形態発生部門
相沢 慎一教授
Duško Ilić博士

熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設・分化制御部門
須田 年生教授
橋山 元浩先生

大阪大学蛋白質研究所・代謝部門
岡田 雅人助教授
名田 茂之博士

東京大学医科学研究所・制癌研究部
山本 雅教授

理化学研究所・分子腫瘍学研究室
井川 洋二主任研究員
(現 東京医科歯科大学医学部・教授)

また本研究を行うにあたり、種々の実験材料の分与並びにご助言、ご協力をいただきました方々に感謝の意を表したいと思います。

埼玉大学理学部・生体制御学科

町田 武生教授

井上 弘一教授

千葉大学医学部高次機能研究センター・遺伝子情報分野

斉藤 隆教授

京都大学胸部研・分子病理

喜納 辰夫博士

Basel Institute for Immunology

武田 俊一博士

産業医科大学・第1内科

田中 良哉教授

東京大学医科学研究所・アレルギー学研究室

田村 敏生博士

熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設・形態発生部門

皆様

熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設・分化制御部門

向松 由香里さん

皆様

理化学研究所・分子腫瘍学研究室

皆様

また本研究を行うにあたり、協力をいただいたリエンタル酵母工業株式会社の皆様、特に内藤 利邦取締役に感謝したいと思います。

最後に精神的な支えとなった
妻 金沢容子
息子 慧
に心から感謝します。