

京都大学	博士（工学）	氏名	吉田 謙太
論文題目	免疫シグナルアダプター分子 SLP-76 の複合体形成と機能： 1 分子追跡による解明		
（論文内容の要旨） 本論文は、外部抗原（外来微生物や寄生虫）が、免疫細胞の一種であるマスト細胞に作用した際に、マスト細胞が免疫反応を起こすための細胞内シグナル伝達の解明を、生物物理工学的視点から大きく進展させたものである。マスト細胞は、外部抗原を排除するための免疫反応を誘起するが、過剰に働くとアレルギー反応やアナフィラキシーショックを引き起こすことが知られており、この免疫反応の理解は医学的にも重要である。本論文は、4 章からなっている。 第 1 章は序論であり、多数の分子が関わるマスト細胞の FcεRI シグナル伝達回路を概観し、シグナルアダプター分子がシグナル回路の形成と制御に重要であることを示している。そして、本研究で注目したシグナルアダプター分子 SLP-76 について解説した上で、 1. 世界でもユニークな多色 1 分子同時観察法を用いて、生細胞内で起こる分子同士の衝突や結合・解離を直接に観察し、従来の方法では分からなかった、過渡的な分子会合体を捉えた点 2. これまでの SLP-76 研究は、T 細胞や B 細胞を用いたものが大半で、マスト細胞内の SLP-76 の機能はほとんど分かっていなかったが、本研究によって、マスト細胞の SLP-76 を中心とした新たなシグナル分子複合体（SLP-76-Gads 複合体）の形成が明らかになった点 の 2 点を挙げ、本研究の意義を述べている。 第 2 章は方法について記述している。細胞培養や蛍光標識の方法に加えて、本研究で開発し駆使した 2 つの画期的な手法について解説している。1 つ目の 3 色 1 分子同時観察法は、本研究において、世界で初めて成功した技術である。これは、3 種類の波長の異なるレーザーでそれぞれ同時に励起した場合でも、1 分子レベルで追跡できるような 3 種類の蛍光色素の選定や、3 種類の分子を同時に 1 分子レベルで観察できるよう、各分子の発現量を最適化することで、可能になったものである。もう 1 つは、2 色 1 分子同時観察で捉えられた 2 種類の分子同士の重なり（共局在）を評価するために開発された、Colocalization index である。分子間の距離に注目することにより、蛍光色素の褪色やブリンキングの影響を極力排除して、共局在を評価することを可能にしている。			

京都大学	博士（工学）	氏名	吉田 謙太
第3章は、結果を示している。Colocalization index を用いた共局在の評価と、3色1分子同時観察法によって、抗原刺激後のマスト細胞で、SLP-76、Gads、PLCγ1 の3種類の分子を同時に含む SLP-76 クラスターが形成されることを明らかにしている。また、SLP-76 クラスターの内部では、SLP-76 と Gads が安定に存在するのに対し、PLCγ1 は1秒の時間オーダーで動的に入れ替わっていることを示している。さらに、SLP-76 クラスターは、架橋された FcϵRI や LAT とも有意な共局在を示さないこと、SLP-76 クラスターには下流シグナル分子 Vav1 が結合してくるが、Vav1 によって活性化され WAVE2 を活性化する Rac1 は、細胞膜近傍を拡散していることを明らかにした。 第4章は、第3章で示した結果をもとにした考察である。まず、SLP-76 クラスターの内部での PLCγ1 の動的なリクルートについては、PLCγ1 は細胞膜上の基質に働いてシグナル分子を産生する分子であり、動的なリクルートは下流シグナルの制御に有用であると考えている。また、SLP-76 が LAT と複合体を形成するという従来の考えを否定し、SLP-76 クラスターは、架橋された FcϵRI や LAT と異なる、独立したシグナル分子複合体であるとしている。さらに、アクチン骨格の再構成からヒスタミン放出へと至る、SLP-76 の下流シグナルについては、SLP-76 がアクチンに結合しているのではなく、SLP-76 クラスター上の Vav1 シグナルが、Rac1 を介してアクチン骨格の再構成を誘起するという、新たなモデルを提唱している。 最後の総括では、本研究によって、SLP-76 クラスターがマスト細胞内の FcϵRI シグナル伝達回路において、独立なハブとして働くことが示され、アレルギー疾患の創薬に SLP-76 という新たなターゲットが提案された、と結論付けている。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、外部抗原が免疫細胞に作用した際に、細胞が免疫反応を起こすための細胞内シグナルの解明を、大きく発展させたものである。免疫細胞としては、外来微生物や寄生虫の排除を担当する細胞であり、同時にアレルギー疾患の原因ともなる反応を誘起する、マスト細胞を用いた。特に、シグナル伝達回路のアダプター分子 SLP-76 の機能を、世界でもユニークな多色同時 1 分子観察を開発して解明した。アダプター分子は、自身は酵素活性を持たず、シグナル反応に直接関与しないが、複数のシグナル分子が結合するシグナル反応の足場となる分子であり、回路形成と制御に重要だと考えられる。本研究で得られた主な結果は、以下の通りである。

1. 抗原刺激後 30 秒程度で、細胞膜近傍の SLP-76 に別のシグナル分子 Gads、PLC γ 1、Vav1 が結合してくる。特に、SLP-76、Gads、PLC γ 1 は、各分子を複数個含む分子複合体を形成する可能性が高いことが分かった。これを SLP-76 クラスターと呼ぶ。この複合体が、細胞内カルシウムシグナルを誘起し、細胞外へのヒスタミン放出につながるものと考察された。
2. SLP-76 クラスター内で、Gads は非常に安定に存在するのに対し、PLC γ 1 は 1 秒の時間オーダーで入れ替わっていた。PLC γ 1 は、細胞膜上の基質に作用してシグナル分子を産生するが、このような動的リクルートは、下流シグナルの制御に有用であると考えられる。
3. 従来、SLP-76 は、別の主要なアダプター分子である LAT 会合体と複合体を形成すると考えられてきた。しかし、本研究によって、マスト細胞では、SLP-76 は LAT 会合体とは複合体を形成しないことが示された。
4. 従来、SLP-76 は、アクチン骨格と結合し、アクチン骨格を再構成してヒスタミン放出を促進すると考えられてきたが、アクチンや、アクチン骨格再構成に関わる Rac1、WAVE2、Arp3 との相互作用は見られなかった。一方、Vav1 は SLP-76 クラスターに結合していること、Vav1 によって活性化され WAVE2 を活性化する Rac1 は、細胞膜上を拡散していること、が分かった。すなわち、SLP-76 クラスター上の Vav1 シグナルは、Rac1 を介してアクチン骨格再構成を誘起する、という新しいモデルが得られた。

これらの成果は、SLP-76 クラスターが、細胞内の免疫シグナル回路で、独立なハブとして機能することを示したものである。これは、アレルギー疾患に対する創薬に、SLP-76 という新たなターゲットを示したという意義を持ち、生物物理工学的にも、医学的にも、寄与するところが多い。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 27 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

要旨公開可能日： 平成 27 年 5 月 1 日以降