

学 位 論 文 題 名

Functional coupling of the *src*-family protein tyrosine kinases, p59^{fyn} and p53/56^{lyn} with the interleukin-2 receptor ; Implications for redundancy and pleiotropism in cytokine signal transduction

（*src*-family protein tyrosine kinases, p59^{fyn}及び p53/56^{lyn}と interleukin-2 受容体との機能的役割 ; そのサイトカインシグナル伝達機構における 関与の重複性及び多様性の暗示）

学位論文内容の要旨

目 的

interleukin-2 (IL-2) は、標的細胞表面に発現する IL-2 受容体 (IL-2R) との相互作用を介しその生理活性を発揮する。IL-2 刺激後、速やかに細胞内蛋白チロシン残基のリン酸化が亢進することから IL-2 の細胞内シグナル伝達においてチロシンキナーゼ (PTK) の関与が示唆されているが、3つの IL-2 Rサブユニット α , β , γ 鎖には PTK 活性は認められない。一方、T細胞、NK 細胞においては *src*-family PTK(*src*-PTK) に属する p56^{lck} (*lck*) が IL-2 R β 鎖 (IL-2 R β) と物理的に会合し、IL-2 刺激により活性化されることが先に報告されているが、IL-2 は *lck* の発現の認められない B細胞、単球などの血液系細胞においてもその生理活性を発揮する。

そこで、*lck* の触媒部位が IL-2 R β との物理的会合に重要であり、その一次構造が他の *src*-PTKs の触媒部位と相同性が極めて高いことから他の *src*-PTKs の IL-2 シグナル伝達における役割について検討した。

材料及び方法

1) 細胞培養

サル腎臓由来 COS 細胞株は10%ウシ胎児血清(FCS)加 IMEM にて、マウス interleukin

- 3 (IL-3) 依存性 pro-B 細胞株 BAF-B03, BAF-B03 由来 ヒト IL-2 R β transfectant 14B (IL-2, IL-3 依存性) 及び ヒト gp130 transfectant BAFh130 (IL-6, IL-3 依存性) は 20% WEHI 培養上清及び 10% FCS 加 RPMI にて培養した。

サイトカイン刺激は、各細胞を 10% FCS 加 RPMI 中で洗浄後、同 medium 中で 12 時間 factor-starvation を行った後、施行した。

2) 抗体及びサイトカイン

以下の抗体を使用した。抗ヒト IL-2 R β 抗体; Mik- β 1 及び Tu-27, 抗 *lck* 抗体; 195.7, 抗 *fyn* 抗体; α -FYN N, 抗 *lyn* 抗体; Lyn-8, 抗 *yes* 抗体; 3H9, 抗 *fgr* 抗体; FGA12, 抗 *v-src* 抗体; 327, 抗 CD45 抗体; M1/9, 抗フォスフォチロシン抗体 (抗 p-tyr 抗体)。

・ サイトカイン刺激には, IL-2; 5 nM recombinant human IL-2, IL-3; 20% WEHI 培養上清, interleukin-6 (IL-6); 30 μ g/ml recombinant human IL-6 と 10 μ g/ml soluble IL-6 receptor を用いた。

3) COS 細胞における cDNA 発現実験

5 $\times$ 10⁶ 個の COS 細胞にリン酸カルシウム法によりヒト IL-2 R β 及び PTKcDNA を transfection し 48 時間後、細胞を回収し flowcytometry により IL-2 R β の発現を確認した。

4) cDNA

マウス *lck* の調節領域 (アミノ酸 1-233 または 144) と各 PTK の触媒部位 マウス p59^{hck} (*hck*) (228-503), マウス p59^{fyn} (*fyn*) (257-534), ヒトインスリン受容体 β 鎖 (*insR*) (947-1343) cDNA をそれぞれ ligation し, 各キメラ PTKcDNA; *lck/hck*, *lck/fyn* 及び *lck/insR* を構築し *lck*, IL-2 R β cDNA と同じく発現ベクター pdKCR に sub-cloning した。

5) 免疫沈降法及びイムノブロッティング

細胞可溶化物遠心上清より IL-2 R β を Mik- β 1 あるいは Tu-27 を用いて免疫沈降し, 沈降物を SDS-PAGE にて泳動後, エレクトロブロッティングにてゲルより PVDF フィルターへ transfer した。フィルターを各抗 *src*-PTK 抗体で処理した後, [¹²⁵I]-protein A あるいは alkaline-phosphatase conjugated anti-Ig antibody にて処理し autoradiography あるいは発色法で検討した。一方, 14B 細胞を IL-2 または IL-3 にて 1), 2) の通り 37 度 10 分間刺激後, 細胞可溶化物の遠心上清を上記の通りブロッティングし, 抗 p-tyr 抗体によって処理し検討した。

6) in vitro kinase assay

14B細胞をIL-2またはIL-3、BAFh130細胞をIL-6またはIL-3にて1), 2)の通り刺激した後、細胞可溶化物遠心上清を抗 *lyn* または抗 *fyn* 抗体にて免疫沈降し、沈降物に基質としてエノラーゼ5 μ gを加え、室温下で5分間反応させた。反応後、SDS-PAGEにて泳動しゲルをKOH処理(55度、1時間)した後、autoradiographyにて検討した。

結 果

1) キメラ PTK と IL-2 R β の物理的会合

COS細胞においてキメラ PTK と IL-2 R β cDNA を共発現させた場合にのみ Mik- β 1 免疫沈降物中に *lck* と同様に *lck/hck*, *lck/fyn* の特異的な共沈が認められた。これに対し *lck/insR* の共沈は認められなかった。

2) IL-2 及び IL-3 刺激によるチロシン残基リン酸化の亢進

両サイトカイン刺激により14B細胞において、刺激後早期に主として分子量85kDa, 52kDaの細胞内蛋白にチロシン残基のリン酸化亢進が認められた。

3) *src*-PTKs の14B細胞における発現

14B細胞における各 *src*-PTK の発現を *in vitro* kination による自己リン酸化の有無により検討したところ p59^{lyn} (*fyn*), p53/56^{lyn} (*lyn*) の発現が認められたが、*lck* の発現は認められなかった。

4) IL-2 及び IL-3 刺激による *fyn* 及び *lyn* の活性化

14B細胞において両サイトカインによる刺激後、*fyn*, *lyn* の活性化によるエノラーゼのリン酸化亢進が認められた。一方、BAFh130細胞においてもIL-3刺激により同様の活性化が認められたが、IL-6刺激では認められなかった。

5) *fyn* と IL-2 R β との物理的会合

14B細胞において Mik- β 1 及び Tu-27免疫沈降物中に *fyn* の特異的な共沈が認められた。これに対し、*lyn* の共沈は認められなかった。共沈する *fyn* の割合は全発現量の0.6-1.2%であった。

考 察

IL-3 依然性 BAF-B03細胞は、IL-2 レセプター遺伝子の発現によりIL-2, IL-3 刺激依存性に細胞内蛋白チロシン残基リン酸化及び核酸合成の亢進が認められる。さらに、

IL-6 レセプター遺伝子の発現にても IL-6, IL-3 刺激依存性の細胞内蛋白チロシン残基リン酸化及び核酸合成の亢進が認められることが報告されている。さらに、この細胞株において *src*-PTK *fyn*, *lyn* の IL-2 刺激に共役する活性化が認められた。

一方, *fyn* と IL-2 R β が共沈することより細胞内での両者の物理的会合が示唆された。IL-3 刺激によっても同様の PTK 活性化が認められるのに対し IL-6 刺激によっては認められず、この細胞株においては IL-2, IL-3 の細胞内シグナルは共通あるいは類似したメカニズムにより伝達され、それには *src*-PTKs が密接に関与することが示唆された。

結 語

先に報告した *lck* の IL-2 による活性化とあわせて、今回の結果より *src*-PTKs は IL-2 シグナル伝達において重複して関与しうること、並びにその関与は各血液系細胞に特異的に発現される PTK (*p59^{l_yn}*, *p53/56^{l_yn}*) に応じて多様性をもつものであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	宮 崎	保
副 査	教 授	上 出	利 光
副 査	教 授	柿 沼	光 明

1 研究目的

血液系細胞は interleukin-2 受容体 (IL-2 R) を介する interleukin-2 (IL-2) による刺激後、速やかに細胞内蛋白チロシン残基のリン酸化が亢進することから IL-2 の細胞内シグナル伝達においてチロシンキナーゼ (PTK) の関与が示唆されている。T細胞, NK 細胞においては *src*-family PTK (*src*-PTK) に属する *p56^{l_{ck}}* (*lck*) が IL-2 R β 鎖 (IL-2 R β) と物理的に会合し、IL-2 刺激に共役して活性化されることが報告されているが、IL-2 は *lck* の発現の認められない B細胞, 単球などの血液系細胞においてもその生理活性を発揮する。

そこで, *lck* の触媒部位が IL-2 R β との物理的会合に重要であり、その一次構造が他の *src*-PTKs の触媒部位と相同性が極めて高いことから他の *src*-PTKs の IL-2 シグナ

ル伝達における役割について検討した。

2 材料及び方法

1) 細胞培養

サル腎臓由来 COS 細胞株は10%ウシ胎児血清(FCS)加 IMEM にて、マウス interleukin-3 (IL-3) 依存性 pro-B 細胞株 BAF-B03, BAF-B03由来ヒト IL-2 R β transfectant 14B及びヒト gpl30transfectant BAFh130は20% WEHI 培養上清及び10% FCS 加 RPMI にて培養した。

サイトカイン刺激は、各細胞を10% FCS 加 RPMI 中にて洗浄後、同 medium 中で12時間 factor-starvation を行った後、施行した。

2) 抗体及びサイトカイン

以下の抗体を使用した。抗ヒト IL-2 R β 抗体; Mik- β 1 及び Tu-27, 抗 *lck* 抗体; 195.7, 抗 *fyn* 抗体; α -FYN N, 抗 *lyn* 抗体; Lyn-8, 抗 *yes* 抗体; 3 H 9, 抗 *fgr* 抗体; FGA12, 抗 *v-src* 抗体; 327, 抗 CD45抗体; M 1 / 9, 抗フォスフォチロシン抗体 (抗 p-tyr 抗体)。

サイトカイン刺激には、IL-2 ; 5 nM recombinant human IL-2, IL-3 ; 20% WEHI 培養上清, interleukin-6 (IL-6) ; 30 μ g/ml recombinant human IL-6 と 10 μ g/ml soluble IL-6 receptor を用いた。

3) COS 細胞における cDNA 発現実験

5 $\times$ 10⁶ 個の COS 細胞にリン酸カルシウム法によりヒト IL-2 R β 及び PTKcDNA を transfection し48時間後、細胞を回収し flowcytometry により IL-2 R β の発現を確認した。

4) cDNA

マウス *lck* の調節領域 cDNA と各 PTK (マウス p59^{hck} (*hck*), マウス p59^{fyn} (*fyn*), ヒトインスリン受容体 β 鎖 (*insR*)) の触媒部位 cDNA をそれぞれ ligation し、各キメラ PTKcDNA ; *lck/hck*, *lck/fyn*, 及び *lck/insR* を構築した。

5) 免疫沈降法およびイムノブロッティング

細胞可溶化物遠心上清より IL-2 R β を免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE にて泳動後、エレクトロブロッティングにてゲルより PVDF フィルターへ transfer し、各抗 *src*-PTK 抗体で処理して検討した。一方、14B細胞を IL-2 または IL-3 にて1), 2) の通り37℃10分間刺激後、細胞可溶化物の遠心上清を上記の通りブロッティングし、抗 p-tyr 抗体によ

て処理して検討した。

6) in vivo kinase assay

14B細胞を IL-2 または IL-3, BAFh130細胞を IL-6 または IL-3 にて 1), 2) の通り刺激した後, 細胞可溶化物の遠心上清より *lyn* または *fyn* を免疫沈降し, 基質としてエノラーゼ 5 μ g を加え, 室温下で 5 分間 *in vitro* kinnation を行った。

3 結 果

1) COS 細胞におけるキメラ PTK と IL-2 R β の物理的会合

lck と同様に IL-2 R β と *lck/hck*, *lck/fyn* との特異的な共沈が認められた。これに対し *lck/insR* の共沈は認められなかった。

2) IL-2 及び IL-3 刺激によるチロシン残基リン酸化の亢進

両サイトカイン刺激により 14B 細胞において, 主として分子量 85kDa, 52kDa の細胞内蛋白にチロシン残基のリン酸化亢進が認められた。

3) *src*-PTKs の 14B 細胞における発現

14B 細胞において p59^{*fyn*} (*fyn*), p53/56^{*lyn*} (*lyn*) の発現が認められたが, *lck* の発現は認められなかった。

4) IL-2 及び IL-3 刺激による *fyn* 及び *lyn* の活性化

14B 細胞において両サイトカインによる刺激後, *fyn*, *lyn* の活性化が認められた。一方, BAFh130細胞においても IL-3 刺激により同様の活性化が認められたが, IL-6 刺激では認められなかった。

5) 14B 細胞における *fyn* と IL-2 R β との物理的会合

IL-2 R β と *fyn* との特異的な共沈が認められたのに対し, *lyn* の共沈は認められなかった。共沈する *fyn* の割合は全発現量の 0.6-1.2% であった。

4 考案及び結語

1. *src*-PTK, *hck*, *fyn* の触媒部位も *lck* と同様に細胞内において IL-2 R β と物理的に会合しうることが示唆された。

2. 14B 細胞において, IL-2 及び IL-3 刺激に共役して, *lyn*, *fyn* の活性化がおきること, そのうち *fyn* は IL-2 R β と物理的に会合しうることが示唆された。

以上の結果より *src*-PTKs は IL-2 シグナル伝達において重複して関与しうること,

並びにその関与は各血液系細胞に特異的に発現される PTK に応じて、多様性をもつものであることが示唆された。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。