

IL-2 依存性リンパ球増殖に関与するチロシンキナーゼの同定と解析

Identification and Characterization of tyrosine kinases involved in the IL-2-mediated lymphocyte proliferation

代表研究者 大阪大学細胞生体工学センター助手 島山 昌 則
Res. Assoc., Inst. for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ.
Masanori HATAKEYAMA

Interleukin 2(IL-2), a cytokine secreted from activated T cells, is known to play an essential role for the proliferation of antigen-stimulated T cells. IL-2 elicits biological effects through its interaction with homologous cell membrane receptor (IL-2 receptor). The functional high-affinity IL-2 receptor is a multi-chain complex composed of at least three distinct subunits, the α chain (p55), the β chain and the γ chain (p64). Among these, the β and γ chains belong to a newly-identified cytokine receptor superfamily. Evidence accumulates that the β chain functions as a transmembrane transducer of IL-2 signal. However, hampered by the lack of any catalytic function in the receptor subunits, the nature of growth signal generated by the IL-2 receptor have remained obscure. The purpose of this work is to examine a potential involvement of tyrosine kinases in the early biochemical events signalled by the IL-2/IL-2 receptor interaction.

The present study confirmed that IL-2 stimulation results in rapid phosphorylation of several cellular proteins on tyrosine residues. Evidence is provided that a member of Src-family protein tyrosine kinase, p56^{lck}, may be involved in this IL-2 triggered tyrosine phosphorylation in T and NK cells. Furthermore, the present study demonstrates that the IL-2 receptor β chain, a signal transducing component of the IL-2 receptor, is able to form a stable physical complex with p56^{lck} in a ligand independent fashion. A particular cytoplasmic region of the β chain (previously designated as the "acidic region") is required for this interaction. The β chain interaction site on p56^{lck} is identified within the catalytic, but not the regulatory, domain. Through this molecular interaction, the β chain of IL-2 receptor is tyrosine phosphorylated on Tyr-355 and/or Tyr-358. The IL-2 signal triggered by the β chain mutant that cannot interact with p56^{lck} fails to activate *c-fos* gene, a critical immediate-early gene for cell growth.

The result indicates that p56^{lck} is a critical downstream signal transducer that directly couple to the IL-2 receptor and provides an important clue to understand the molecular mechanism of IL-2-mediated T cell growth.

研究目的

インターロイキン 2(IL-2) は、抗原刺激を受けた T リンパ球 (T 細胞) の増殖・分化に中心的役割を演ずるサイトカインとして知られる。IL-2 の生物活性は標的細胞上に存在する高親和性レセプターとの相互作用を介して発揮される。このレセプターは α 鎖 (p55), β 鎖 (p70-75) ならびに γ 鎖 (p64) から構成される分子複合体であり、このうちシグナル伝達分子としての β 鎖の機能的重要性が既に明らかにされている。しかしながらこの

IL-2 レセプター複合体にはキナーゼを含む既知の酵素活性は見いだされず、レセプター活性化に伴う増殖シグナル生成機構は全く明らかにされていない。

本研究は、IL-2 レセプターを介する T 細胞増殖シグナルの本態を分子レベルで把握することを目的とし、とくにチロシンキナーゼの関与に焦点をあて、IL-2 刺激とチロシンリン酸化の機能的関連ならびにその生理的、病理的意義を検討する。

研究経過

(1) ヒト末梢 T 細胞を含む IL-2 応答細胞において、IL-2 添加後すみやかなタンパクリン酸化の亢進が起こることを確認した。とくにチロシンリン酸化の著しい増強が認められ IL-2 刺激とチロシンキナーゼ活性化の関連が示唆された。この IL-2 依存性チロシンリン酸化に関与する分子として、Src ファミリーチロシンキナーゼを想定しリンパ系細胞におけるこれらの分子の発現の有無を検討した結果、p56^{lck} p59^{lyn} ならびに p53/p56^{lyn} の発現を確認した。次にこれら分子のキナーゼ活性を IL-2 添加前後に測定したところ p56^{lck} のチロシンキナーゼ活性が IL-2 依存性に増大することを見いだした。

(2) 次に、IL-2 レセプターにきわめて近接した形でチロシンキナーゼ活性が検出されるという報告 (*J. Biol. Chem.*, 265, 5630-94 (1990)) を踏まえ、IL-2 レセプターと p56^{lck} の分子複合体形成の可能性を検討した。ヒト NK 様細胞株 YT を用い、抗 IL-2 レセプター抗体による免疫沈降ならびに抗 p56^{lck} によるイムノブロット解析を行った結果、IL-2 シグナル伝達分子と考えられている β 鎖と p56^{lck} の物理的複合体を検出することに成功した。

(3) IL-2 レセプター β 鎖と p56^{lck} の相互作用をより詳細に検討することを目的に、COS 細胞を用いた cDNA の一過性大量発現系を樹立した。すなわち β 鎖 cDNA および p56^{lck} cDNA を同一 COS 細胞内で共発現させることにより両分子の複合体形成を再構築することに成功した。この系を用い、 β 鎖ならびに p56^{lck} の種々の欠失変異分子の複合体形成態を検討した結果、IL-2 レセプター β 鎖においてはその細胞内ドメインほぼ中央に位置する富酸性アミノ酸領域が、また p56^{lck} においてはそのキナーゼドメイン (特に N 端側 1/2) が関与するユニークな相互作用であることを明らかにした。

(4) この物理的相互作用を介して IL-2 レセプター β 鎖はチロシンリン酸化を受ける。 β 鎖への点突然変異導入による解析から細胞内ドメインに存在する二つのチロシン残基 (Tyr-355, Tyr-358)

が p56^{lck} の標的となる可能性が示された。

(5) IL-2 刺激により早期活性化遺伝子の一つとして知られる *c-fos* の mRNA が一過性に誘導されることが知られている。p56^{lck} と相互作用できない IL-2 レセプター β 鎖ミュータントはこの *c-fos* mRNA 誘導を惹起できないことが明らかとなった。すなわち p56^{lck} は IL-2 シグナル伝達における β 鎖の下流分子として *c-fos* 活性化につながるシグナル伝達系を担うものと推察された。

研究成果

媒介活性を内在しないと考えられるサイトカインレセプタースーパーファミリー分子の一つ IL-2 レセプターの下流に位置するシグナル伝達分子として p56^{lck} チロシンキナーゼを同定した。p56^{lck} は IL-2 レセプターのシグナル伝達サブユニットである β 鎖細胞内ドメインと会合し、IL-2 刺激依存性に活性化されるものと考えられる。このような増殖因子レセプター/キナーゼ相互作用はこれまでに知られていない全く新しい形の分子複合体である。活性化された p56^{lck} は *c-fos* mRNA 誘導につながるシグナルを生成するものと推察される。

今後の課題と発展

今後の課題として IL-2 依存性に活性化される p56^{lck} の基質分子の同定、p56^{lck} と他の Src ファミリー分子間の IL-2 シグナルにおける機能的 redundancy の有無の検討ならびに p56^{lck} とは異なるタンパクキナーゼのシグナル伝達における関与の検討などが急務と考えられる。

発表論文リスト

- M. Hatakeyama, T. Kono, N. Kobayashi, A. Kawahara, S.D. Levin, R.M. Perlmutter, T. Taniguchi: Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56^{lck}: Identification of novel intermolecular association. *Science*, 252, 1523-1528 (1991).
- T. Tanaka, M. Tsudo, H. Karasuyama, N. Toyama, M. Hatakeyama, T. Taniguchi, M. Miyasaka: Signal transduction through the human IL-2 receptor β -chain expressed in IL-6-dependent mouse B cell hybridoma. *Int. Immunol.*, 3, 105-108 (1991).
- T. Miyazaki, M. Maruyama, G. Yamada, M. Hatakeyama, T. Taniguchi: The integrity of the conserved "WS motif" common to IL-2 and other

cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction. *EMBO J.*, **10**, 3191–3197 (1991).

M. Hatakeyama, A. Kawahara, H. Mori, H. Shibuya, T. Taniguchi: *c-fos* gene induction by inter-

leukin 2: Identification of the critical cytoplasmic regions within the interleukin 2 receptor β chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2022–2026 (1992).