

氏 名 (本籍)	いし 石	い 井	たけ 健	ひさ 久
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1942	号
学位授与年月日	昭 和 63 年 2 月 24 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭 和 58 年 3 月 早稲田大学大学院理工学研究科物理学及応用物理学専攻修士課程修了			

学位論文題目	Protein Phosphorylation Mediated by Interleukin 2 (IL-2) / IL-2 Receptor β Chain Interaction. (IL-2によるT細胞増殖シグナル伝達機構における特異的蛋白リン酸化反応)
--------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(主 査)

論文審査委員	教授 菅 村 和 夫	教授 立 木 蔚
	教授 橘 武 彦	

論文内容要旨

目 的

リンパ球で IL-2 が増殖因子として作用することは明らかである。しかし、IL-2 が IL-2 レセプター (IL-2R) に結合した後どのような機構を介して細胞が増殖へと導かれるのかは未だ不明である。いくつかの増殖因子では、そのレセプター自身がキナーゼ活性を有し、リガンド結合によって自らリン酸化される。また、増殖因子依存的に数種の細胞内蛋白のリン酸化が促進されることが知られており、細胞内蛋白リン酸化のカスケードがリガンド/レセプター結合によるシグナル伝達にかかわる可能性が示唆される。そこで、IL-2R を発現する細胞を用いて、IL-2 依存的にリン酸化が促進される蛋白を同定し、その性質について検討した。

方 法

1) IL-2 依存性リン酸化蛋白の検出：細胞をリン酸無添加培地に懸濁し、 $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸で3時間ラベルする ($1\text{mCi}/\text{ml}$)。ラベルの最終15分に IL-2 を添加し、ヌクレアーゼおよび SDS 処理により細胞全成分の溶解試料を得た。これを二次元電気泳動し、オートラジオグラフィによってリン酸化蛋白を検出した。2) IL-2R の Scatchard 解析：ヒト組換え IL-2 にクロラミンT法を用いて ^{125}I -IL-2 を各濃度で細胞に結合させ、 4°C でインキュベートする。特異的に結合した ^{125}I -IL-2 量を測定し、Scatchard 解析により IL-2R の発現量と親和性を算出した。3) ^{125}I -IL-2 cross linking： ^{125}I -IL-2 を 4°C にて細胞に結合させ、架橋剤 DSS で cross link した。IL-2 結合蛋白は、SDS-PAGE の後オートラジオグラフィによって検出した。4) 抗 IL-2R 抗体処理：抗 IL-2R 抗体の1つ、H1E1 は、IL-2R の数に影響を与えず、IL-2 に対する高親和性 IL-2R の親和性のみを約 1/10 に下げる。そこで、H1E1 抗体 $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて高親和性 IL-2R を修飾した後に IL-2 を添加して IL-2 依存性リン酸化を見た。5) プロナーゼ処理：細胞を $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ プロナーゼで30分処理し、直後の、また4.5時間後の IL-2R の発現量ならびに親和性と IL-2 依存性リン酸化の関係を調べた。

結果および考察

1) IL-2 依存性蛋白として、67 K (pp 67) 及び4つの 63 K (pp 63s) の蛋白が同定された。このリン酸化は、i) IL-2R を発現するマウス及びヒトの正常細胞、トランスフォーム細胞で広く認められ、ii) 迅速かつ一過性で、iii) IL-2 依存細胞では、各 IL-2 濃度における pp 67 リン酸化量と細胞増殖とは非常に良く相関した。iv) リン酸化部位はセリンであり、また、

pp 67 は細胞質に、pp 63s は主に核に局在していた。以上の結果は、これらの蛋白リン酸化反応の細胞増殖シグナルとしての重要性を示唆する。

2) 最近、従来の IL-2R (α 鎖, Tac 抗原) の他に、高親和性 IL-2R の構築に重要と思われる新たなサブユニット構造 (β 鎖, p 75) の存在が報告されている。Scatchard 解析と cross-linking 実験からこれを確かめ、以下の3つのタイプの細胞株を認めた。i) α 鎖のみを有する: $K_d = 10^{-8}M$, ii) β 鎖のみを有する: $K_d = 10^{-9}M$, iii) α, β 両鎖を有する: $K_{d1} = 10^{-8}M$, $K_{d2} = 10^{-11}M$ 。(2相性, K_{d1} は α 鎖単独のものを見ている)

3) IL-2R α 鎖, β 鎖とリン酸化の関係を検討したところ、i) α, β 両鎖を有する細胞では IL-2 濃度依存的にリン酸化が促進されたのに対して、 α 鎖のみを有する2つの細胞株では、いかなる濃度の IL-2 においてもリン酸化は促進されなかった。ii) β 鎖のみを有する細胞株ではリン酸化が促進された。iii) α, β 両鎖を発現する細胞をプロナーゼ処理することによって、高親和性 IL-2R に影響を与えずに低親和性 IL-2R (α 鎖) を95%以上消失させることが可能であったが、そのような状態でも IL-2 依存的リン酸化反応は何ら影響を受けなかった。

iv) H1E1 抗体で高親和性 IL-2R の親和性を予め約 1/8 に下げると、リン酸化に必要な IL-2 濃度は約8倍となった。これらの結果は、IL-2 依存性リン酸化が高親和性 IL-2R を構築する β サブユニット分子から伝達されることを強く示唆している。

4) リン酸化に関与するキナーゼを検討したところ、phorbol ester や tumor promoter など14種の化合物のうち、C-キナーゼ活性化作用のある誘導体のみが例外なく pp 67 と pp 63s のリン酸化を IL-2 同様に促進した。また、phorbol ester PMA と PDD では、C-キナーゼに対する親和性が前者で約8倍強いが、リン酸化に必要な濃度も前者が約1/8であった。

以上の結果を総合すると、i) IL-2 が IL-2R β 鎖に結合することによってキナーゼが活性化され、pp 67, pp 63s といった特定の蛋白がセリン特異的に速やかにリン酸化される。ii) この反応に直接または間接にC-キナーゼが関与する。iii) これらのリン酸化反応が IL-2R からの細胞増殖シグナル伝達の初期に重要な役割を果たす可能性が示唆される。

審査結果の要旨

インターロイキン2 (IL-2)はT細胞の最も重要な増殖因子の1つであるが、IL-2がそのレセプター (IL-2R)に結合後、いかなるシグナル伝達系を経て細胞が増殖へと導かれるのかは不明である。一方、多くの癌遺伝子産物や増殖因子レセプターはキナーゼ活性を有し、また細胞内情報伝達系に様々なキナーゼが密接に関与していることが知られている。そこで、IL-2/IL-2R増殖に付随する特定の蛋白リン酸化反応を同定し、解析を試みたのが本研究の骨子である。

本研究において、IL-2の増殖シグナルに伴ってリン酸化される67K (pp 67)及び4つの63K (pp 63s)の蛋白が同定された。このリン酸化反応はIL-2添加後5分以内に起り、一過性で、細胞増殖反応に非常に良く相関した。また、この反応が生理的機能を持つ高親和性IL-2Rからのみ伝達されることを示し、さらに高親和性IL-2R複合体構成分子のうち、新たに発見された β 鎖の存在がこのリン酸化を規定することが確かめられた。リン酸化を引起すキナーゼを探索したところ、C・キナーゼの関与が強く疑われた。成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I)トランスフォーム細胞株のうち、いくつかの株では、IL-2無添加で既にpp 67とpp 63sのリン酸化の亢進が見られた。これらの結果は、IL-2のIL-2R β 鎖への結合が引金となってC・キナーゼが活性化され、直接的または間接的にpp 67及びpp 63sをリン酸化する。そしてそれがIL-2/IL-2R増殖シグナル伝達系に重要な役割を果たす可能性を示唆している。

今後、pp 67とpp 63sの機能の解明が期待されるが、pp 67については、IL-2増殖シグナルに関わるのみならず、最近、IL-3及びIL-1増殖にも関わることを示され、広くリンフォカインの細胞内情報伝達を担うリン酸化蛋白として興味深い。

以上、本研究は、IL-2によるT細胞増殖機構において、C・キナーゼの関与するリン酸化反応が深く関わることを示した独創的なものであり、HTLV-Iによる癌化機構の解明にもつながる優れたものである。従って、本論文は学位論文として、学位を授与するに値するものと認める。