

Title	Serine 6 of Lck Tyrosine Kinase : A Critical Site for Lck Myristoylation, Membrane Localization, and Function in T Lymphocytes
Author(s)	安田, 好文
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42615
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	安田好文
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16037 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Serine 6 of Lck Tyrosine Kinase : A Critical Site for Lck Myristoylation, Membrane Localization, and Function in T lymphocytes (Lck チロシンキナーゼの6番目のセリンはミリスチン酸化、膜局在、T細胞の機能における決定的部位である)
論文審査委員	(主査) 教授 濱岡 利之 (副査) 教授 平野 俊夫 教授 宮坂 昌之

論文内容の要旨

【目的】

Src family kinase の1つである Lck は TCR シグナル伝達において必須の分子であり、TCR 刺激後 CD3 鎖や TCR ζ 鎖をリン酸化して下流にシグナルを伝えることにより、TCR からのシグナルの起点として働いている。この際、Lck はN末端にミリスチン酸とパルミチン酸の2種類の脂質による修飾を受けて細胞膜に結合することがその働きに重要である。このうちミリスチン酸化はN末2番目のグリシンにN-myristoyl transferase (NMT) によってミリスチン酸が付加されることによって行われている。Lck 以外の src family の分子ではこのグリシン以外に7番目または9番目にはリシンがこの酵素の働きに重要であることが報告されている。しかし Lck は7、9番目にはリシンを持たないため、他に調節部位が存在する可能性が考えられる。そこで、N末のアミノ酸に点変異を入れた変異型 Lck を作成し、細胞内局在、脂質修飾に対する影響を検討し、さらにその変異の TCR シグナル伝達における影響を調べた。

【方法ならびに成績】

Lck は脂質修飾によって細胞内での局在が決まることから、まず種々の変異型 Lck 遺伝子を作成し、電気穿孔法にて COS-7 細胞に発現させてその細胞内局在について検討した。各種 Lck 発現細胞を超速心によって細胞質、細胞膜に分画し、それぞれの分画を SDS-PAGE で電気泳動後 Lck を western blot により解析したところ、wild type (WT) では細胞膜に局在していたが、直接脂質修飾を受ける2番目のグリシンをアラニンに変えた変異体 A2 では細胞質に局在が移行していた。このとき、直接の脂質修飾部位ではないと考えられる6番目のセリンをアラニンに変えた変異体 A6 でも Lck は細胞膜への局在が減少し、細胞質に存在していた。7番目のセリンをアラニンに変えた変異体 A7 ではこの局在の変化はみられなかった。また細胞内の Lck 分子を抗 Lck 抗体で染色し、共焦点顕微鏡を用いて細胞内の Lck の局在を観察したところ、膜分画の場合と同様に WT や A7 では細胞膜に局在がみられたが、A2 や A6 の変異型 Lck は細胞質に染色されていた。この局在の変化から A6 分子の脂質修飾に影響が及ぶことが示唆されたため、ミリスチン酸化を検討した。293T細胞に WT、A2、A6 分子をリン酸カルシウム法にて発現させ、 ^3H -ミリスチン酸とともに培養してラベルし、可溶性後抗 Lck 抗体で免疫沈降後 SDS-PAGE にてミリスチン酸化された Lck を検出した。その結果、WT は強い ^3H -ミリスチン酸のシグナルがみられたのに対し、直接のミリスチン酸化部位であるグリシンを変異させた A2 ではミリスチン酸化は全くみられなかった。このとき、Lck A6 は WT と比較しミリスチン酸化量が大きく減少していた。

次にこの変異のシグナル伝達に対する影響を検討するため、Jurkat 由来 Lck 欠損細胞株である JCaM1 細胞にこれらの変異型 Lck を発現させた細胞株を作成した。これらの細胞株を抗 CD3 ϵ 抗体である OKT3 で刺激し、可溶化後 SDS-PAGE にて分離して抗リン酸化チロシン抗体で western blot し、細胞内タンパクのリン酸化の変化を検討した。すると WT や A7 では強いチロシンリン酸化の回復がみられたが A2、A6 では Lck が十分発現しているにも関わらず、細胞内タンパクのリン酸化はほとんどみられなかった。さらに後期シグナル伝達への影響をみるために T 細胞活性化抗原である CD69 の発現を調べた。細胞内のリン酸化と同様に WT や A7 では CD69 の発現の回復がみられたが、A2、A6 発現細胞では CD69 の発現は誘導できないことが判明した。

【まとめ】

Lck 分子は N 末端 2 番目、3 番目及び 5 番目の脂質修飾部位以外に、6 番目のセリンが Lck の細胞膜への局在に影響を与えていることが明らかとなった。これはこの部位の変異によってミリスチン酸化が障害されているためであり、このため Lck は細胞膜に局在できず、TCR からのシグナルを伝達できないと考えられる。Lck 分子ではこの 6 番目のセリンが NMT による認識部位と考えられ、そのためミリスチン酸化に重要な配列であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Lck は TCR シグナル伝達において必須の分子であるが、この際、Lck は N 末端にミリスチン酸とパルミチン酸の 2 種類の脂質による修飾を受けて細胞膜に結合することが重要である。このうちミリスチン酸化は N 末 2 番目のグリシンに N-myristoyl transferase によってミリスチン酸が付加される。Lck 以外の src family の分子ではこのグリシン以外に 7 番目または 9 番目のリシンがこの酵素の働きに重要であることが報告されているが、Lck は 7、9 番目にはリシンを持たないため、他に調節部位が存在する可能性が考えられる。そこで本研究では、種々の変異型 Lck 遺伝子を作成し、COS-7 細胞に発現させてその細胞内局在について検討したところ、wild type (WT) では細胞膜に局在していたが、直接の脂質修飾部位である 2 番目のグリシンをアラニンに変えた変異体 A2 では細胞膜への局在がほぼ完全に抑制されていた。このとき、直接の脂質修飾部位ではない 6 番目のセリンをアラニンに変えた変異体 A6 でも Lck は細胞膜への局在が減少し、大部分が細胞質に存在していた。この局在の変化から Lck A6 の脂質修飾に影響がでていることが示唆されたため、³H-ミリスチン酸化量を検討したところ、Lck A6 は WT と比較しミリスチン酸化量が大きく減少していた。次にこの変異のシグナル伝達に対する影響を JCaM1 細胞で検討すると、細胞内タンパクのリン酸化、T 細胞活性化抗原 CD69 の発現ともに、WT では回復が見られたが Lck A2、A6 ではほとんどみられなかった。以上のことから Lck では直接の脂質修飾部位以外に 6 番目のセリンが Lck のミリスチン酸化に重要であり、この部位の変異によって Lck は細胞膜に局在できず、その結果 TCR からのシグナルを伝達できないという注目すべき事実が明らかとなった。Src family 分子の脂質修飾は細胞内局在及び細胞機能において非常に重要であると考えられ、本研究における脂質修飾の解析は T 細胞活性化機構の解明に非常に有用な知見を提供するものであり、学位の授与に値すると考えられる。