

## C215

## 相互作用蛋白質ペアを用いた非天然型ヘテロダイマー受容体の構築

(東大院工) ○(学)小川 健一郎\*・(正)河原 正浩・(正)長棟 輝行

## 【緒言】

サイトカインは細胞より分泌される蛋白質であり、interleukin(IL)や interferon などに代表される。これらの物質は免疫系に大きく関わっており、細胞間の情報伝達手段として利用され、炎症反応、細胞の増殖、アポトーシス、分化などに関わっている。

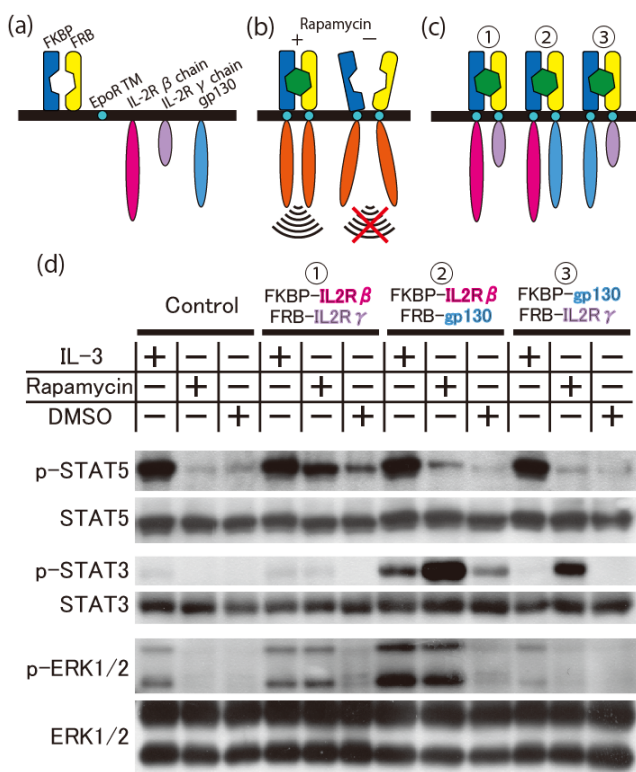
IL-2 受容体は  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖、 $\gamma$  鎖より構成されるが、 $\alpha$  鎖はシグナル伝達には関与せず、 $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖のヘテロダイマー化によりシグナルを伝達する。一方、IL-6 受容体  $\alpha$  鎖は単独では機能せず、シグナル伝達サブユニットである gp130 のホモダイマー化によりシグナルを伝達する。

これらの天然型受容体によるシグナル伝達機構については数多く報告されているが、各受容体のサブユニットを組み合わせた非天然型受容体が機能的であるか否かについては報告されていない。そこで本研究では、IL-2 受容体  $\beta$  鎖または  $\gamma$  鎖と IL-6 受容体のシグナル伝達サブユニットである gp130 を相互作用蛋白質ペアを用いることで強制的にヘテロダイマー化し、非天然型のキメラ受容体を構築した。この非天然型ヘテロダイマー受容体を細胞に発現させ、その受容体からどのようなシグナル伝達が起こるかを検証した。

## 【実験方法】

相互作用蛋白質ペアのモデルとして、FKBP (FK506-binding protein) と FRB (FKBP-rapamycin binding domain of FKBP12-rapamycin associated protein) を用いた。これらの蛋白質は Rapamycin 存在下でヘテロダイマー化する事が知られている。キメラ受容体の細胞外ドメインとして FKBP や FRB を用い、エリスロポエチン受容体(EpoR)の膜貫通ドメイン(TM)、及び IL-2 受容体  $\beta$  鎖、 $\gamma$  鎖もしくは gp130 の細胞内ドメインを連結した(図(a))。これらのキメラ受容体を、Rapamycin 存在下において強制的にヘテロダイマー化し、シグナル伝達を起こそうと考えた(図(b))。

各キメラ受容体は図(c)に示す組み合わせで EpoR 発現 IL-3 依存性マウス proB 細胞株 Ba/F3 細胞(Ba/ER 細胞)の細胞膜上に発現させた。各細胞を IL-3 添加培地で前培養し、その後 IL-3 非存在下で 5 時間培養した。これらの細胞をそれぞれ IL-3(1 ng/mL)、Rapamycin(20 ng/mL)、リガンドなし(DMSO)で刺激し、シグナル伝達分子のリン酸化を分析した。



図(a)構築したキメラ受容体の各ドメイン (b)Rapamycin 添加によるキメラ受容体活性化模式図 (c)作製したキメラ受容体の構造 (d)シグナル伝達の分析結果

## 【結果と考察】

STAT5 のリン酸化を見てみると Rapamycin の刺激により、「FKBP-IL2R $\beta$ 、FRB-IL2R $\gamma$ 」の組み合わせにおいて強いシグナルが観察された。また、「FKBP-IL2R $\beta$ 、FRB-gp130」の組み合わせでも弱いシグナルが観察された。これは、IL2R $\beta$  からのシグナル伝達を示唆している。次に STAT3 のリン酸化を見ると、「FKBP-IL2R $\beta$ 、FRB-gp130」、「FKBP-gp130、FRB-IL2R $\gamma$ 」の組み合わせにおいて濃いバンドが現れた。これは、gp130 からのシグナル伝達を示唆している。さらに ERK のリン酸化を見ると、「FKBP-IL2R $\beta$ 、FRB-IL2R $\gamma$ 」、「FKBP-IL2R $\beta$ 、FRB-gp130」においてバンドが確認され、これについても、IL2R $\beta$  からのシグナル伝達を示唆された。

以上から少なくとも、「FKBP-IL2R $\beta$ 、FRB-gp130」の組み合わせで受容体を発現させた場合、非天然型の組み合わせであっても、両受容体の特徴を併せ持ったシグナル伝達が起こることが示唆された。

\*TEL: 03-5841-7290, FAX: 03-5841-8657

E-mail: kenoga@bio.t.u-tokyo.ac.jp