

## lck (リンパ球特異的チロシンキナーゼ) の HTLV-I 感染細胞株における発現調節機序

古賀 泰裕、木村 元喜

**要約** HTLV-I感染T細胞株についてRNaseプロテクション法を用いてそのlck transcriptの種類について検討を行ったところ、HTLV-I感染T細胞株ではlck mRNAは上流域プロモーターよりその転写が開始されたtranscriptのみで構成されていた。一方、HTLV-I非感染T細胞株、正常末梢血Tリンパ球では、上流域及び下流域プロモーター由来lck transcriptの両者により構成されていた。さらにlckの遺伝子産物であるp56<sup>lck</sup>の発現量についてウェスタンブロット法により検索したところHTLV-I感染T細胞株では非感染T細胞株に比べその発現量が1/10以下に著しく低下していた。これらの事実はHTLV-I感染T細胞株では共通してp56<sup>lck</sup>が著減していること、そしてHTLV-I感染細胞株と非感染T細胞株におけるlck transcriptの種類の違いがHTLV-I感染細胞株で観察されたp56<sup>lck</sup>発現量の著明な低下に関与していることが示唆された。

**見出し語:** lck、HTLV-I、T細胞

**研究方法** (細胞)増殖に関してIL-2を必要とするHTLV-I感染ヒトT細胞株(以下IL-2依存性T細胞株と記す)として、TOM-1, NOBE, IL T-SU, KAN-Yを、IL-2を必要としないHTLV-I感染ヒトT細胞株(以下IL-2非依存性細胞株と記す)としてMT-4, IT607を用いた。HTLV-I非感染ヒトT細胞株としてはJurkat, Hut78を用いた。COLO201はヒト大腸癌由来細胞株でT細胞由来ではないが例外的にlck mRNAを発現することが知られている。U937はヒト単球由

来細胞株である。

(ノーザン法, ウェスタン法) ノーザン法は常法に従って行った。プローブはfull lengthのlck cDNAであるYT16<sup>1)</sup>を用いた。ウェスタン法は常法に従って行った。lckの遺伝子産物であるp56<sup>lck</sup>に対する抗体は、lck cDNAに基づくC末端部32アミノ酸基からなる合成ペプチドを作製しそれを抗原としてウサギに免疫し抗血清として得た。

(RNaseプロテクション法) YT16をBgl IIで切

九州大学 生体防御医学研究所 ウイルス学部門

(Dept. of Virology, Med. Inst. of Bioregulation, Kyushu Univ.)

断して得た350bpの5'末端部1ck cDNA断片をpSPT18に組み込み、SP6RNAポリメラーゼ、<sup>32</sup>P-CTPを用いて350bpのラベルされたアンチセンス1ck RNAを作製した。このアンチセンスRNAを種々の細胞株から得た30ugのtRNAに加え50℃、12時間の条件でハイブリダイゼーションを行った。反応後RNaseAで処理してハイブリダイズしなかった一本鎖部RNAを除き、アクリルアミドゲルに流し、オートラジオグラフィにより RNaseからプロテクトされたラベル1ck RNA断片の長さを検索した。

**結果** HTLV-I非感染T細胞株ではノーザン法により例外なく1ck mRNAの発現が認められ、HTLV-I 感染T細胞株においてはIL-2依存性細胞株では1ck mRNAは非感染T細胞株と同程度に発現されているがIL-2非依存性細胞株では殆ど検出できない<sup>3)</sup> (昭和63年度研究報告書 p148-150)。我々のグループを含めたこれまでの研究により、ヒト1ck遺伝子プロモーター一部の同定及びその構造決定が既に行われている<sup>2)</sup>。すなわち1ck mRNAの転写は上流域と下流域の2つの異なるプロモーターより開始されそれぞれ違った5'UT領域を持つ1ck transcriptが作られる。これらのtranscriptは5'UTは異なるがReading frameは共通である。研究方法で述べた1ck RNAプローブを用いてRNaseプロテクション法を行うと上流域プロモーター由来の1ck transcript では330bpの断片、下流域プロモーター由来の1ck transcriptでは250bpの断片を検出する<sup>2)</sup>。この方法を用いてIL-2依存性細胞株の1ck transcript

を調べたところTOM-1, NOBE, ILT-Su, KAN-Yいずれの細胞株においても上流域プロモーター由来transcriptのみが検出された(図)。IT607はIL-2非依存性でノーザン法では1ck mRNA検出されなかった。しかしこの方法では1ck transcriptが検出され、かつ他のHTLV-I感染細胞株と同様に上流域プロモーター由来であった。一方、HTLV-I非感染T細胞株Jurkat, Hut78及び正常末梢血リンパ球ではいずれも上流域、下流域両方のプロモーター由来の1ck transcriptを有していた。非T細胞株であるCOL0201の1ck transcriptは下流域プロモーター由来であった。すなわちHTLV-I感染T細胞株では1ck mRNAの転写は上流域プロモーターのみから開始され下流域プロモーターは使われていない。これに対してHTLV-I非感染T細胞株、正常末梢血リンパ球では上流域、下流域プロモーターのいずれもが1ck mRNAの転写に使用されていた。次にウェスタンブロット法を用いてp56<sup>lck</sup>発現量をこれらの細胞株について調べた。興味深いことに上流域プロモーター由来1ck transcriptのみを有するHTLV-I感染T細胞株ではいずれもが、上流域、下流域両プロモーター由来1ck transcriptを有するHTLV-I非感染T細胞株に比べp56<sup>lck</sup>の発現量が1/10以下に著しく低下していた。これらの事実は上流域プロモーター由来1ck transcriptは下流域プロモーター由来1ck transcriptに比べp56<sup>lck</sup>への翻訳効率が低いことを示唆した。

**考察** 1ckの遺伝子産物であるp56<sup>lck</sup>は510個のアミノ酸からなり非受容体型チロシンキナ

ーゼに属する。さらに1988年 HLA class II 抗原を認識するT細胞表面マーカーであるCD4に p56<sup>lck</sup> が細胞内で連結してその情報伝達分子として機能していることが明らかにされた。T細胞特異的チロシンキナーゼであるlckのHTLV-1発がんにおける役割を明らかにするためにこれまで我々はHTLV-1感染 T細胞株を用いて検討を行ってきた。今回の報告ではlck mRNAが発現しているIL-2依存性細胞株でもp56<sup>lck</sup> の発現量は著しく低下していることが示され、HTLV-1感染 T細胞株に共通する特徴としてp56<sup>lck</sup> の著明な低下が明らかとなった。この事が HTLV-1発がんにどのような役割を有するのか今後検討を加えたい。さらにIL-2依存性細胞株のlck transcriptはすべて上流域プロモーター由来であり、下流域プロモーター由来lck transcriptとは Reading frameは共通であるが5'UTが異なる。5'UTの違いがHTLV-1感染細胞株に認められるp56<sup>lck</sup> 発現量の低下に関わっているのかについて現在実験を進めている。またHTLV-1感染 T細胞株では下流域プロモーター由来lck transcriptがなぜ転写されないのかについても今後明らかにされねばならない。

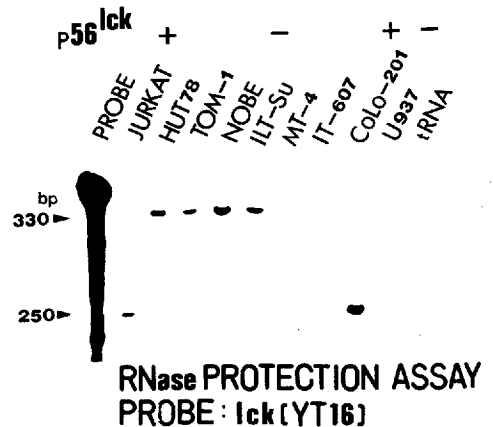
#### 文献

1)Koga, Y., Caccia, N., Toyonaga, B., Spolski, R., Yanagi, Y., Yoshikai, Y and Mak. T. W. (1986) A human T cell specific cDNA clone (YT16) encodes a protein with extensive homology to a family of protein-tyrosine kinases.

Eur. J. Immunol. 16: 1643-1646.

2)Takadera, T., Leung, S., Koga, Y., Takihara, Y., Miyamoto, N. G and Mak, T. W. (1989) Structure of the two promoters of the human lck gene: Differential accumulation of two classes of lck transcription in T cells. Mol. Cell Biol.9:2173-2180.

3)Koga, Y., Oh-hori, N., Sato, H., Yamamoto, N., Kimura, G and Nomoto, K. (1989) Absence of transcription of lck (lymphocyte specific protein tyrosine kinase) message in IL-2-independent, HTLV-1-transformed T cell lines. J. Immunol. 142:4493-4499.





## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約 HTLV-1 感染 T 細胞株について RNase プロテクション法を用いてその lck transcript の種類について検討を行ったところ、HTLV-1 感染 T 細胞株では lck mRNA は上流域プロモーターよりその転写が開始された transcript のみで構成されていた。一方、HTLV-1 非感染 T 細胞株、正常末梢血 T リンパ球では、上流域及び下流域プロモーター由来 lck transcript の両者により構成されていた。さらに lck の遺伝子産物である p56lck の発現量についてウェスタンブロット法により検索したところ HTLV-1 感染 T 細胞株では非感染 T 細胞株に比べその発現量が 1/10 以下に著しく低下していた。これらの事実は HTLV-1 感染 T 細胞株では共通して p56lck が著減していること、そして HTLV-1 感染細胞株と非感染 T 細胞株における lck transcript の種類の違いが HTLV-1 感染細胞株で観察された p56lck 発現量の著明な低下に参与していることが示唆された。