利用酵母双杂合系统研究 Jak3 与 IL-2R γ 相互作用

朱锦芳 唐 微 季红斌 郑仲承* 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031. * 联系人)

摘要 白细胞介素-2(IL-2)受体 γ 亚基(IL-2R γ)和非受体型酪氨酸激酶 Jak3 在 IL-2 发挥生理作用过程中都发挥着重要的作用,并已知 Jak3 可以与 IL-2R γ 或直接或间接地结合.为了研究 Jak3 与 IL-2R γ 之间发生直接相互作用的具体区域,构建了这两个分子的各种缺失体,利用酵母双杂合系统研究了各缺失体之间的相互作用.结果发现, Jak3 的氨基端 JH3-JH7 部分可以与 IL-2R γ 的胞内域直接结合.在进一步的定位中发现, Jak3 的 JH3-JH7 部分结构的完整性为其结合 IL-2R γ 所必需;而 IL-2R γ 离 C 末端 33~45 位氨基酸残基在与 Jak3 的相互作用中起重要作用.

关键词 Jak3 IL-2R γ 酵母双杂合系统 相互作用

白细胞介素-2(IL-2)是最重要的细胞因子之一.它发挥生理作用是通过与其靶细胞表面的特异性受体 IL-2R 作用后诱发的一系列胞内信号转导并最终导致特定的基因表达来实现的^[1]. IL-2R 由 α , β 和 γ 3 个亚基组成,其中 β 和 γ 亚基为信号转导所必需. IL-2R 与生长因子的受体不同,本身不具有酪氨酸激酶活性.它们功能的发挥要靠与其结合的非受体型酪氨酸激酶来实现,如与 IL-2R β 结合的有 Jak1, Syk, Lck 等,与 IL-2R γ 结合的有 Jak3^[2].这些激酶在 IL-2 的信号转导中非常重要.因此,研究这些激酶与 IL-2R 之间的相互作用对了解 IL-2 诱导的信号转导通路具有重要的意义.

IL-2R γ 同时还是 IL-4, IL-7, IL-9 和 IL-15 等多种细胞因子受体的共用亚基^[3],而 Jak3 是唯一已知与它结合的胞内信号分子,它们功能的丧失都将导致严重联合免疫缺陷症(SCID)^[3,4],因此对它们之间相互作用的研究显得更为重要. IL-2R γ 与 Jak3 的结合是采用免疫共沉淀的方法发现的^[5],而它们之间是否存在直接结合,若存在,又是通过哪些分子间区域来相互作用的还没见报道.

酵母双杂合系统是近些年来发展起来的用于在细胞内研究蛋白质之间相互作用的方法^[6].这个系统可用于研究两个已知蛋白质之间的直接相互作用,并可通过缺失和点突变的方法找到相互作用的区域.本文利用这种方法研究了 IL-2R γ 和 Jak3 之间的直接相互作用以及相互作用的各个区域.

1 材料与方法

(1) 酵母的培养. 酵母菌株 Y187 和 CG-1945(购自 Clontech)在 15%~30% 甘油中储存于 -70℃. 它们的基因型如下:

Y187: *MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3,112*,

URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-LacZ;

CG-1945: *MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *lys2-801*,

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-13-1409>

LYS2:: GALI_{UAS}-GALI_{TATA}-His,

URA3:: GALA_{17-mers(×3)}-Cycl_{TATA}-LacZ.

将冻存的酵母直接接种到 YPD (20 g/L Difco pepton, 10 g/L yeast extract, 2% dextrose, 18g/L agar) 平板上并在 30℃培养 2~3 d. 转基因后的酵母用缺少特定氨基酸的 SD 培养基培养. SD 培养基包括没有氨基酸的 yeast nitrogen base (6.7 g/L)、碳源(2% dextrose) 和 dropout 的氨基酸溶液. 根据使用酵母的基因型, 10x dropout 的氨基酸溶液中含有 400 mg/L 的 Adenine, Histidine, Methionine, Tryptophan, Uracil 和 600 mg/L 的 Lysine, 2 g/L 的 Leucine. L⁻; W⁻; LW⁻ 及 LWH⁻ 分别为缺少 Leu; Trp; Leu 和 Trp; Leu, Trp 和 His 的 SD 培养基.

(2) 质粒的构建. 用 PCR 的方法扩增 Jak3 的 N 端 JH3-JH7, 引物序列如下:

5' 端引物: 5'-TAC AAG CTT ACC TCC AAG TGA A/GGA GAC-3',

3' 端引物: 5'-GAC/T ACT TGG CTC ATC AAG CT-3',

用 *Hind*Ⅲ(5' 端引物中引入, 见划线部分) 和 *Bgl*Ⅱ(基因中的 1599 位) 克隆至 pUC6S, 用 *Sal*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ切出并克隆至 pAS2-1(Clontech), 由此构建成 Jak3 的 N 端和 Gal4 的 DNA 结合功能域融合的表达质粒 pAS2-1JN(JH3-7), 其融合区域的读码框正确. 同样将用 PCR 方法得到的 IL-2R γ 胞内域用 *Nco*Ⅰ和 *Bam*HⅠ克隆至 pACT2(Clontech), 由此构建成 IL-2R γ 的胞内域和 Gal4 的转录活化功能域融合的表达质粒 pACT2 γ , 其融合区域的读码框正确. 该引物序列如下:

5' 端引物: 5'-GGA TCC ATG GAA CGG ACG ATG CCC CGA AT-3',

3' 端引物: 5'-AAA GGA TCC TCA GGT TTC AGG CTT TAG GGT-3'.

在 pAS2-1JN(JH3-7) 的基础上, 利用 *Jak3* 基因内的 *Acc*Ⅲ/*Nco*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ等酶切位点又构建了 *Jak3* 的 JH2-4, JH5-7 和 JH4-7 各区段基因; 并利用 PCR 的方法构建了 JH3-5 和 JH3-6 区段基因. 引物序列如下:

JH3-5 5' 端引物: 5'-TTG GAT CCA GAT GGC TCG TGA GCA-3',

JH3-6 5' 端引物: 5'-TTG GAT CCT GGA GAC ATG TCA CCG CTT T-3'.

在 pACT2 γ 的基础上, 用 PCR 的方法构建了缺失体 γ 1, γ 2 和 γ 3.

γ 1 3' 端引物: 5'-TCT CTA GAC TAG TCT GGC TGC AGA CTC TG-3',

γ 2 3' 端引物: 5'-TCT CTA GAT CAG GGA ATC TCA CTG ACG AG-3',

γ 3 3' 端引物: 5'-TCT CTA GAC TAC TGG TTG CAT GGG GAG GC-3'.

(3) 酵母的转化. 从 YPD 平板(在 4℃保存的时间不超过 4 个星期)上挑取几个淡红色的酵母菌落, 用 1mL 的 YPD 打匀, 加到 5mL 的 YPD 培养液中, 30℃振荡培养 16~18 h(A_{600} >1.5). 再转入 50mL YPD 中培养 3 h(A_{600} 从 0.2~0.3 变为 0.4~0.6 左右). 2 000 r/min 离心 3 min 以收集细胞. 去除上清液后用 10 mL 水悬浮, 再离心收集细胞, 并悬浮于 1 mL 1×TE/Li-Ac(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1mol/L LiAc, pH=7.5) 中. 将要转染的 DNA 与变性后的 herring testes carrier DNA 混合(1 μ g: 0.5 mg), 加入 100 μ L 酵母感受态细胞并混匀, 加入 0.6 mL PEG/LiAc 溶液(0.8 mL 50% PEG, 0.1 mL 1×TE, 0.1 mL 1×LiAc) 并振荡混合. 30℃振荡培养 30min, 加入 70 μ L 的 DMSO 并混合均匀, 42℃10 min, 置冰浴冷却. 离心去上清液, 用 1×TE 悬浮后涂布于相应的 SD 平板, 30℃培养 3~5 d.

(4) 酵母中半乳糖苷酶活力的测定. 1) Colony-Lift Filter Assay. 转染后的酵母在 LW⁻ 平板

上培养 3~5 d 后可出现克隆, 将其划线到新的 LW^- 平板上, 30°C 再培养 1~2 d. 用尼龙膜将平板上的克隆粘起, 粘菌的那面朝上浸入液氮中放置 15s, 取出后使其在室温融化. 用 2 mL 的 Z buffer/X-gal (100 mL Z buffer, 0.27 mL β -巯基乙醇, 1.67 mL 20mg/mL X-gal) 溶液浸湿滤纸并将其放到空的培养皿中, 有克隆的那面朝上将尼龙膜放在滤纸上, 30°C 放置, 并观察克隆变蓝的时间. 2) 荧光试剂定量测定. 用牙签挑取几个单菌落到 50 μL Z buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.1 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.5 g/L, KCl 0.75 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.246 g/L, pH=7.0), 反复吸吹悬浮. 将其用液氮冻融 2 次, 离心 5 min 取上清液, 加入 50 μL reaction buffer (Clontech), 25°C 1 h 后用 Lumi-meter 测定荧光值.

(5) 酵母交配实验. 将 pAS2-1 系列质粒转染到 Y187 并在 W^- 平板上筛选, 将 pACT2 系列质粒转染到 CG-1945 并在 L^- 平板上筛选. 3~5 d 后从两平板各挑取一个 2~3 mm 直径的克隆, 并将它们同时放入 0.5 mL 的 YPD 中 30°C 培养 6~18 h. 分别涂布于 LW^- 和 LWH^- 平板. 30°C 培养 3~5 d 观察杂合子在 LWH^- 平板上的生长, 并测定 LW^- 平板上克隆的半乳糖苷酶活性.

2 结果

2.1 Jak3 N 端的 JH3-JH7 区可直接与 IL-2R γ 的胞内域相结合

将 pAS2-1JN 和 pACT2 γ 共转染 Y187, 可检测到半乳糖苷酶的表达. 将它们共转染 CG-1945, 可看到转染子在 LWH^- 平板上生长, 并能检测到半乳糖苷酶的活性(图 1). 用酵母的交配实验也证实了以上的结果. 比较阳性和阴性的对照实验, 这些结果均证实了 Jak3 与 IL-2R γ 有结合, 并且这种结合作用发生于 IL-2R γ 的胞内域和 Jak3 的 N 端(JH3-JH7 区域).

1 Jak3 的 N 端(JH3-JH7) 与 IL-2R γ 的胞内域在 CG-1945 中的相互作用
 LWH^- 平板上的生长情况; (b) 生长在 LW^- 平板上的克隆的半乳糖苷酶活性. 1——pAS2-1JN+ pACT2 γ ; 2——pVA3-1+ pTDT-1(阳性对照, p53 和大 T 抗原的相互作用); 3——pVA3-1+ pACT2 γ ; 4——pAS2-1JN+ pTDT-1

2.2 JH3-JH7 区的完整性是 Jak3 与 IL-2R γ 胞内域结合所必需

为了进一步确定 Jak3 N 端中与 IL-2R γ 相互作用的细致区域, 对 JH3-JH7 分别从 C 端或 N 端进行一系列的缺失构建成 JH4-7, JH5-7, JH3-6, JH3-5 和 JH2-4. 结果发现, 任何一种缺失体都丧失了与 IL-2R γ 胞内域相互作用的能力, 说明 Jak3 的 N 端 JH3-JH7 的结构完整性是结合 IL-2R γ 胞内域所必需的(图 2)。

2.3 IL-2R γ 胞内域离 C 端 33~45 位的氨基酸残基为结合 JH3-JH7 所必需

为了确定 IL-2R γ 胞内域中与 Jak3 N 端相互作用的区域, 构建了各种 IL-2R γ 胞内域的缺

失体, 分别从 C 末端缺失 14 个或 33 个氨基酸残基后, 虽然与 Jak3 的 JH3-JH7 结合能力有所下降, 但结合还是存在的。而进一步将 IL-2R γ 胞内域从 C 末端缺失 45 个氨基酸残基后则失去了与 Jak3 结合的能力。这个结果说明, IL-2R γ 胞内域离 C 端 33~ 45 位的氨基酸残基为结合 JH3-JH7 所必需 (图 2 和表 1)。

图 2 Jak3 N 端各种缺失体及不同的 IL-2R γ 胞内域缺失体的构建及其相互作用

这种相互作用以实验系统中的酵母在 LWH⁻ 平板上的生长情况来表示。

表 1 IL-2R γ 胞内域各种缺失体与 Jak3 N 端相互作用导致半乳糖苷酶合成的情况

	pACT2 γ	pACT2 $\gamma3$	pACT2 $\gamma2$	pACT2 $\gamma1$	pACT2
a 克隆变蓝时间	20 min	40 min	2 h	> 20 h	> 20 h
b 荧光测定值	34700	26900	4300	1350	1200

3 讨论

利用酵母双杂合系统能够检测到 IL-2R γ 胞内域和 Jak3 的 N 端 JH3-JH7 的相互作用。这种结合在 Y187 和 CG-1945 中均可以检测到, 而且利用共转染质粒和酵母交配的方法可得到相同的结果。此外, 我们还采用 LexA 系统的酵母双杂合实验, 也很好的重复了上述结果(结果未给)。这也说明在酵母中产生的 IL-2R γ 胞内域和 Jak3 的 N 端 JH3-JH7 有合适的构象, 因此, 利用酵母双杂合系统研究两者的相互作用区域是可行的。

缺失实验表明, JH3-JH7 的结构完整性为 Jak3 结合 IL-2R γ 所必需。我们还利用 pAS2-1JN

(JH3-JH7)进行cDNA库筛选,得到一些可与其相互作用的蛋白质.这些蛋白质与Jak3的结合也需要JH3-JH7的结构完整.因此,Jak3的JH3~JH7在空间上可能是一个完整结构,如果将这些区域分开,不但无法研究与其他蛋白质的相互作用,而且用来筛库也会遇到一系列的困难.有的实验室也在用Jak3的不同区域采用酵母双杂合系统进行筛库,但基本上都没有得到结果.这可能正是忽视了Jak3这一结构完整性的结果.另外一家实验室也得到了类似的结果,即Jak1与IFN γ RI的结合需要有JH3-JH7的完整结构^[7].

Jak3有JH1~JH7这7个保守的区域^[8].JH1为催化功能域,它本身就足以行使催化功能^[9].JH2是类似的催化功能域,但没有催化功能.有实验室利用酵母双杂合系统的方法发现JH2可以结合Stat5,从而提出了另外一种JAK活化STAT的新方式^[10].JH3~JH7的作用还不清楚.从我们的结果来看,Jak3的JH3~JH7在结合IL-2R γ 胞内域中起作用,它使Jak3锚定在IL-2R复合物中从而发挥激酶活性.

有文献报道,细胞因子受体的Box1区域在结合JAK中起重要的作用^[11],我们发现IL-2R γ 胞内域离C端33~45的氨基酸残基也同样的重要.为此,我们已利用亲疏水分析的方法对这两个区域中可能较为关键的氨基酸残基进行点突变,并分析了它们在结合Jak3及信号转导中的作用(另文发表).其他实验室的研究表明,IL-2R γ 胞内域靠近膜的52个氨基酸残基为信号转导所必需^[12].结合我们的结果,这些氨基酸残基在结合Jak3中同样不可缺少,说明Jak3与IL-2R γ 的结合是IL-2R介导胞内信号转导的重要前提.

致谢 本工作为中国科学院“九五”重大资助项目(批准号:KJ951-B1-608).

参 考 文 献

- 1 Minami Y, Kono T, Miyazaki T, et al. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 245~ 267
- 2 Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*, 1995, 268: 251~ 255
- 3 Puck J M. IL2RGbase: a database of gamma c chain defects causing human X-SCID. *Immunol Today*, 1996, 17(10): 507~ 511
- 4 Macchi P, Villa A, Gillani S, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*, 1995, 377: 65~ 68
- 5 Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*, 1994, 266: 1045~ 1047
- 6 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. *Short protocols in molecular biology*, 3rd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1995. 53~ 61
- 7 Kohlhuber F, Rogers N C, Watling D, et al. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 695~ 706
- 8 Leonard W J, O'shea J J. JAKs and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 293~ 322
- 9 朱锦芳, 鲁林荣, 季红斌, 等. Jak3介导白细胞介素-2对c-myc基因表达的诱导. *科学通报*, 1997, 42(23): 2554~ 2557
- 10 Fujitani Y, Hibi M, Fukada T, et al. An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene*, 1997, 14: 751~ 761
- 11 Tanner J W, Chen W, Young R L, et al. The conserved box1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem*, 1995, 270: 6523~ 6530
- 12 Nelson B H, Lord J D, Greenberg P D. A membrane proximal region of the interleukin 2 receptor gamma c chain sufficient for Jak kinase activation and induction of proliferation in T cells. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 309~ 317

(1998-12-07 收稿, 1999-02-10 收修改稿)