

Title	TRF受容体特異的単クローン性抗体を用いたTRF受容体の分子性状の解析
Author(s)	石井, 紀郎
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34634
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

【4】

氏名・(本籍)	い 石	い 井	の 紀	* 郎
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6798	号	
学位授与の日付	昭和60年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	TRF 受容体特異的単クローン性抗体を用いた TRF 受容体の 分子性状の解析			
論文審査委員	(主査) 教授 濱岡 利之 (副査) 教授 谷口 維紹 教授 岸本 忠三			

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

B細胞が最終的に抗体産生細胞へと分化する際に種々のT細胞由来因子の影響をうけていることはよく知られている。このうち、活性化B細胞に分化シグナルを与える最終分化因子、T細胞代替因子(T-cell replacing factor: TRF)に対応する受容体を欠損しているDBA/2Ha マウスは、X染色体に連鎖したヒト免疫不全症の1つのモデル動物で劣性遺伝する事が明らかにされている。我々は、このB細胞の最終分化を制御する活性因子TRFに対応する受容体分子の性状を明らかにするため、このDBA/2Ha マウスを用いて作成したTRF受容体に向かう単クローン性抗体と、高度に精製したTRF分子を用いて、B細胞上のTRF受容体を免疫化学的に解析した。

(方法及び結果)

抗TRF受容体単クローン性抗体は、TRF低応答性のDBA/2Haと高応答性のBALB/cのF₁雄マウスにBALB/cの受容体陽性B細胞を頻回免疫し、P3U1ミエローマ細胞と融合させて一連のハイブリドーマを得、我々の樹立した単クローン性TRF(B151-TRF)によるB細胞の分化阻害、FACSによるB細胞への結合試験などによりスクリーニングした。このようにして作成し、最終的に選別された1つの単クローン性抗体を以下、抗B-cell Activation Receptor抗体-1(抗BAR-1抗体)と呼称する。この抗体で、B151-TRFに応答してIgM産生細胞に分化しうるBALB/c由来B白血病細胞BCL₁を前処置しておく、BCL₁のTRF活性吸収能は特異的に阻害され、逆にTRFをBCL₁に前処置しても抗BAR-1抗体のBCL₁への結合が阻害された。次に、BCL₁からTRF受容体をその活性を保ったまま抽出可溶化できる条件につき検索した。その結果、Tsushima and Friesenの方法による膜画

分調整法が収量その他の条件から最もすぐれた方法であり、この膜画分に対して抗BAR-1抗体は特異的に結合性を示し、B151-TRF活性も特異的に吸収された。次に、この膜画分からのTRF受容体の可溶化に適した界面活性剤を選択するため、8種類の界面活性剤で可溶化した画分から可及的に界面活性剤を除去し、これをBCL₁のB151-TRFによるIgM産生細胞への分化系に添加し、その抑制活性を指標として検討した。その結果、2% Lubrol-PXが最も効率的に、しかも活性を保ったまま受容体を可溶化できた。このようにして可溶化したBCL₁可溶化膜蛋白画分をSDS-PAGEにかけ、Western Blotting法にて解析したところ、抗BAR-1抗体は分子量120kdの単一蛋白質と反応し、還元条件下では分子量60kdの単一蛋白質と反応した。さらにTRF受容体の詳細な構造解析を行うため、抗BAR-1抗体カラムにBCL₁可溶化膜蛋白画分を通過させてアフィニティ精製を行い得られた画分をIodobeads法を用いて¹²⁵I標識し、抗BAR-1抗体と免疫沈降を行わせた後、SDS-PAGE、オートラジオグラフィで観察すると、やはり非還元下120kd、還元下60kdの分子量を有する単一の分子が特異的に同定された。このようにして同定した分子がTRF受容体であることは、この分子量120kdの蛋白質そのものが、B151の無蛋白培養条件下で得られた培養上清から逆相HPLCで分取したTRF活性画分をBolton-Hunter試薬で標識した¹²⁵I-TRFと特異的結合性を示すことから確定された。

ところで、我々の今までの解析から、B151培養上清中のBCL₁を分化させるTRFはN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)をその分子構造にもつ糖蛋白質で、その活性発現がGalNAcにより特異的に阻害されることから、このTRFと受容体との相互作用は、TRF受容体自身が糖鎖に結合性を示し、TRF上のGalNAc-beadsに対して著明な結合性を有しており、上記の可能性が強く示唆された。また、この¹²⁵I-TRF受容体はCon A-Sepharoseへの結合性をも示すところから、mannoseをもつ糖蛋白質であると推定された。

(総括)

以上、我々が樹立した抗BAR-1単クローン性抗体は、B細胞上のTRF受容体を特異的に認識し、このTRF受容体分子は分子量60kdのポリペプチドがS-S結合で会合した分子量120kdのhomodimer構造を有し、GalNAc結合性を示す糖蛋白質であると結論された。

論文の審査結果の要旨

B細胞に最終分化シグナルを与えるB細胞分化因子、TRFに対する受容体分子を世界に先がけて分離同定し、その構造解析を行った。

これは今後、受容体を介した分化との情報伝達機構の解析、特にX染色体遺伝子により支配されるB細胞機能発現の分子機構を解明するのに重要な糸口となり得ると考えられる。