



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34634">https://hdl.handle.net/11094/34634</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【4】

氏名・（本籍）	いし 石 井 のり 紀 お 郎
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 6 7 9 8 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 F<sub>1</sub> 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 BCL<sub>1</sub> を前処置しておく、BCL<sub>1</sub> の TRF 活性吸収能は特異的に阻害され、逆に TRF を BCL<sub>1</sub> に前処置しても抗 BAR-1 抗体の BCL<sub>1</sub> への結合が阻害された。次に、BCL<sub>1</sub> 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、B 151-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BCL<sub>1</sub>のB 151-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BCL<sub>1</sub>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BCL<sub>1</sub>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<sup>125</sup>I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、B 151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<sup>125</sup>I-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、B 151培養上清中のBCL<sub>1</sub>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<sup>125</sup>I-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。