



Title	B151T細胞融合株由来T細胞代替因子（B151-TRF）の部分精製とそのB細胞分裂分化誘導活性
Author(s)	原，嘉信
Citation	大阪大学，1986，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35228
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	はら	よし	のぶ
	原	嘉	信
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7 2 2 4	号
学位授与の日付	昭 和 61 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	B 151 T 細胞融合株由来 T 細胞代替因子（B 151 -TRF）の部分精製 とその B 細胞分裂分化誘導活性		
論文審査委員	(主査) 教 授 塩谷弥兵衛 (副査) 教 授 濱岡 利之 教 授 岸本 忠三		

論 文 内 容 の 要 旨

（目 的）

B 細胞が抗原刺激を受けて抗体産生細胞に分化する過程には、B 細胞分裂因子（BCGF）や B 細胞分化因子（BCDF）を始めとする一連の T 細胞由来可溶性因子が、B 細胞に分裂・分化シグナルとして作用することが報告されている。我々は、これ迄に T 細胞融合株（B 151 K12）を樹立し、その培養上清中の BCDF 活性は、抗原感作 B 細胞や BALB/c 由来慢性 B 白血病細胞 BCL₁ に作用し、抗体産生細胞への分化を誘導することを報告してきた。更に加えて、近年 Swain 等は B 151 培養上清中に BCL₁ 細胞や Dextran sulfate で刺激した正常 B 細胞に分裂を誘導する BCGF II 活性が含まれることを報告した。そこで本研究では、B 151 培養上清中に含まれる BCDF 活性と BCGF II 活性が、同一分子の作用によるものか否かを明らかにする目的で B 151 培養上清中より分裂及び分化因子を可及的に精製し、その物理化学的性質を比較し検討した。

（方 法）

- ① B 151 T 細胞融合株（ $5 \times 10^5 / \text{ml}$ ）を無蛋白 RPMI 1640 で 3 日間大量培養し、その培養上清を回収した。
- ② B 細胞分裂及び分化因子の精製

B 151 培養液を 85% 硫酸塩析し PBS（pH 7.2）で透析後、SEP-PAK C₁₈ カラム（Waters）で前処理し、逆相 HPLC カラム（YMC AM-312, 山村化学）を用いて 0.1 % TFA 含有 80% アセトニトリル溶液により直線濃度勾配法により分画した。活性画分は、凍結乾燥後、PBS に溶解し、LBA-アガロースカラム（E.Y）に結合させ、0.2 MN-アセチルガラクトサミンにより溶出し、LBA 結合画分を回収した。

③ 精製画分の¹²⁵I 標識

逆相HPLC精製画分をBolton-Hunter試薬で¹²⁵I 標識しSephacryl S-300 でゲル濾過し標識画分を得た。標識画分をLBA-アガロースに結合させ0.2 MN-アセチルガラクトサミンにより溶出し、LBA 結合画分を得た。各標識画分は、0.1 %SDS-PAGE, オートラジオグラフィーにより分子性状を解析した。

④ B細胞分裂及び分化活性の測定

各活性画分をBCL₁細胞 ($5 \times 10^4 / 200 \mu\text{l}$) に加え、2日間培養し、抗-IgM抗体を用いたreverse PFC assayによりB細胞分化活性を、最終培養6時間における³H-Thymidineの取り込み量によりB細胞分裂活性を測定した。

(結 果)

① B 151 T細胞融合株は、無蛋白RPMI 1640 培養液で高比活性のB細胞分裂活性及び分化活性を生産することが明らかとなり、精製出発材料としては、RPMI 1640 培養上清を採用した。

② B 151 培養上清中のB細胞分裂及び分化活性は、共に56°C, 30分の熱処理, pH2の酸処理に安定でかつTrypsin感受性の蛋白である。

③ B 151 培養上清中のB細胞分裂及び分化活性は、ゲル濾過により、分子量50K, クロマトフォーカシングにより等電点pI 4.9 - 5.1 の同一画分に回収された。

④ B 151 培養上清を硫酸塩析し、SEP-PAK C₁₈カラムの前処理後、逆相HPLCにより分画すると、B細胞分裂及び分化活性は、共にアセトニトリル50-65%の同一画分に効率よく回収された。

⑤ HPLC精製画分を¹²⁵I 標識し、ゲル濾過により分画すると、分子量50K画分に、放射活性のピークが回収され、この標識画分は、TRF受容体を持つBCL₁細胞に特異的な結合を示した。この画分をSDS-PAGE, オートラジオグラフィーで解析すると19K, 50K, 74K相当の部位に3本のバンドとして検出された。

⑥ HPLC精製画分をLBA-カラムにより分画すると、B細胞分裂及び分化活性は、LBAに結合し、0.2 MN-アセチルガラクトサミンにより回収された。そこで¹²⁵I 標識HPLC精製画分をLBAアガロースにより分画し、LBA結合画分をSDS-PAGE, オートラジオグラフィーで解析すると分子量19K相当の部位に一本のバンドとして検出された。

(総 括)

B 151 培養上清に含まれるB細胞分化活性とB細胞分裂活性 (BCGF II) の異同を明らかにする目的で、両活性を部分精製し、その物理化学的性質を比較した結果、両活性の分子量、等電点、疎水性、レクチン結合性には、差異が認められず、両活性が常に同一画分に精製回収されることより、両活性は、単一のB 151 -TRF分子により発現するものと考えられる。従って、B 151 -TRFは、B細胞分裂分化誘導因子として作用し、活性化B細胞のクローンサイズを増大させると同時に、抗体産生細胞への分化を開始させるものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

B細胞が抗体産生細胞に分化する過程には、T細胞もしくは、T細胞代替因子（TRF）を始めとする種々の可溶性因子がB細胞に分裂及び分化を誘導することが知られている。これまでB 151 T細胞融合株の培養上清中にはB細胞の分裂及び分化を誘導する活性が検出されている。本論文は、B 151 T細胞融合株培養上清に含まれるB細胞分裂活性と分化活性の異同を明らかにする目的で両活性を可及的に部分精製し、その物理化学的性質を比較検討したものである。その結果、両活性の分子量、等電点、疎水性、レクチン結合能が等しいことを明らかにし、同一のTRF分子が活性化B細胞に分裂と分化を誘導することを示唆するものである。これは、B細胞の分裂と分化を解析する上で重要な知見であり、博士学位論文に値すると考える。