

Title	ヒトB細胞分化因子 (BCDF or BSF-2) の精製と部分的アミノ酸配列の決定
Author(s)	柏村, 信一郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/35257
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	かしわ 柏	むら 村	しん いち ろう 信 一 郎
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7 2 0 2	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 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	ヒト B 細胞分化因子 (BCDF or BSF-2) の精製と部分的アミノ酸配列の決定		
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三		
	(副査) 教授 濱岡 利之 教授 谷口 維紹		

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

B細胞が活性化され抗体産生細胞へと増殖，分化するためにはT細胞が産生する種々のB細胞活性化因子 (BSF) が必須である。B細胞の増殖，分化の機構を分子レベルで明らかにするためには，これらのBSFを分離精製し，その構造を決定するとともに，受容体分子を同定しシグナル伝達機構を解明し，さらにBSFおよびその受容体遺伝子の発現機構を解明する必要がある。我々は以前よりB細胞の増殖，分化の最終過程に作用し，分泌型免疫グロブリン産生を転写レベルで調節する因子としてB細胞分化因子 (BSF-2) の性状と機能について報告してきた。今回，BSF-2をコードする遺伝子の同定を目的として末梢血T細胞をHuman T cell leukemia virusで形質転換し樹立されたBSF-2産生T細胞株，TCL-NaI細胞培養上清よりヒトBSF-2を精製し，N末端の部分的アミノ酸配列を決定した。

(方 法)

- 1) 培養上清の調製：TCL-NaI細胞 (1×10^6 cells/ml) を48時間，ウシ胎児血清 (FCS) を含まないRPMI 1640培養液中にて培養し上清を回収した。
- 2) BSF-2活性の測定：Epstein-Barr virusで形質転換して樹立されたヒトB細胞株，SKW6-Cl 4細胞 (1×10^4 cells/200 μ l) に標品を加え72時間培養し，上清中のIgM濃度をELISA法にて測定した。 1×10^4 個のSKW6-Cl 4細胞に最大反応量の50%のIgM産生を誘導する活性を1単位と規定した。
- 3) BSF-2の精製：TCL-NaI細胞培養上清を限外濾過法により濃縮し，Ultrogel AcA 34カラム (LKB) にてゲル濾過を行い，活性分画を25mM piperazine-HCl buffer (pH 6.3) にて透析し，Mono Pカラム (Pharmacia) にて等電点分画を行った。更に活性分画をSynchropak RP-Pカラム (C₁₈) (Synchron

Inc)あるいはBio Rad C₄カラム (Bio Rad) にて逆相高速液体クロマトグラフィーを行った。蛋白の溶出はacetonitrileの0~80% linear gradientによって行った。各分画を0.1%SDS-PAGE後、銀染色法により染色するとともに未染色のゲルを1mm間隔で切断し、各分画より10%FCSを含むphosphate buffered salineにて蛋白を溶出しBSF-2活性を測定した。

4) アミノ酸配列の決定：逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製された標品を、Edman法によりマイクロ気相シーケンサー (Applied Biosystem) にてN末端よりアミノ酸配列を決定した。

(結 果)

1) BSF-2の精製：TCL-NaI細胞培養上清中のBSF-2活性は、ゲル透過により30~35K, 等電点分画によりpI 5.0~5.1の間に溶出され、逆相高速液体クロマトグラフィー (C₁₈) による分画では55% acetonitrileにて溶出された。このBSF-2標品をSDS-PAGE, 銀染色法で解析した結果、非還元, 還元条件いずれの場合も19Kおよび21Kの蛋白のバンドが認められた。さらにゲルより蛋白を溶出してBSF-2活性を測定した結果、2本のバンドと一致していずれも同等のBSF-2活性が測定された。

上述の方法で最終的にmg蛋白あたり 1.7×10^7 単位のBSF-2活性を有する標品を得た。精製BSF-2は3pM (1u/ml) でB細胞株に最大Ig産生の50%のIg産生を誘導するが、他のサイトカイン活性、すなわちIL-1, IL-2, BSF-1, BCGF-II, インターフェロン活性等は認められなかった。

2) アミノ酸配列の決定：C₄およびC₁₈カラムによる逆相高速液体クロマトグラフィーを行うことにより、40ℓの培養上清より約10μgの21K-BSF-2を精製し、マイクロ気相シーケンサーにてN末端よりアミノ酸配列を決定した。初期収率は約80%で、N末端より単一のアミノ酸が同定できた。同様に第14番目までのアミノ酸配列が決定された。決定されたアミノ酸配列はIL-1, IL-2, IL-3, インターフェロン等を含む既知の5,000種の蛋白のいずれとも一致しなかった。

(総 括)

ヒトBSF-2産生T細胞株, TCL-NaI細胞培養上清を濃縮後、ゲル透過、等電点分画、逆相高速液体クロマトグラフィーにより分画した結果、BSF-2活性を有する19Kおよび21Kの蛋白が精製された。この精製BSF-2は他のサイトカイン活性を持たないことが示された。さらに精製BSF-2 (21K) 標品を用いてマイクロ気相シーケンサーにてN末端より14個のアミノ酸配列が決定され、サイトカインを含む既知の蛋白とは異なることが示された。決定されたアミノ酸配列に対応する合成DNAプローブはBSF-2 遺伝子の単離に有用であると考えられる。

論文の審査結果の要旨

本論文は、Bリンパ球の抗体産生細胞への分化を誘導する、ヒトB細胞分化因子 (BCDF or BSF-2) を精製し、そのN末端のアミノ酸配列を決定した最初の報告と考えられる。B細胞に作用する因子は多く報告されているが、生体内に於て微量しか存在せず分子レベルでの解析は未だ行われていなかった。本研究はB細胞分化因子と考えられる蛋白を同定し、そのN末端アミノ酸配列を決定し、更に、精製さ

れたB細胞分化因子を用いてその免疫学的機能を明らかにした。以上の点より考えて学位論文として価値あるものと思われる。