

Title	受容体遺伝子のリガンドを用いたクローニング : Tac 抗原 (p55) 内の単一のアミノ酸変異によるIL-2の結合能と抗Tac抗体反応性の解離
Author(s)	源, 誠二郎
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36058
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら 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)	みなもと 源	せい じ ろう 誠 二 郎
学位の種類	医 学	博 士
学位記番号	第 8 5 8 7	号
学位授与の日付	平成元年3月24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	受容体遺伝子のリガンドを用いたクローニング：Tac抗原(p55)内の 単一のアミノ酸変異によるIL-2の結合能と抗Tac抗体反応性の解離	
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 維紹 (副査) 教授 岸本 進 教授 吉川 寛	

論文内容の要旨

〔目的〕

IL-2 受容体は活性化T細胞などのリンパ球の細胞表面上に発現され、IL-2 と結合する事により増殖シグナルを細胞内へ伝達する。ヒトIL-2 受容体として以前より抗Tac抗体で認識されるTac抗原(p55)が同定されていたが、さらに機能的な高親和性受容体を構成するにはTac抗原に加えてp70-75というIL-2 結合能を有する分子が必要であると示唆されている。そこで、このようなIL-2 結合能を有する分子の同定を目的として、リガンドを用いた発現クローニング法を開発した。

〔方法ならびに成績〕

まず、ビオチン化IL-2 (Bi-IL-2) とフルオレッセイン-アビジン (F1-Av) で、p55およびp70-75を発現しているYT細胞を染色し、FACS (fluorescein activated cell sorter) で解析する事により、細胞表面上に発現されたIL-2 結合分子を特異的に検出できる事を明らかにした。

そこで、このIL-2 結合分子のcDNAを同定する事を目的として、COS細胞内で一過性の大量発現を期待できる発現ベクターCDM8にYT細胞由来のcDNAを挿入し、cDNA libraryを作成し、発現クローニングを試みた。即ち、cDNA libraryをCOS細胞にDEAE-dextran法にて遺伝子導入し、72時間後にBi-IL-2/F1-Avで染色し、FACSにて陽性細胞を選択分取し、この細胞からHirtの方法によりplasmidを回収するという方法を用いた。このサイクルを1-3回繰り返す事で、Tac抗原cDNAが急速にenrichされる事がSouthern blot解析から明らかとなった。

次に、抗Tac抗体と反応しないIL-2 結合分子を同定するために、高濃度の抗Tac抗体の存在下で、cDNA libraryを導入したCOS細胞をIL-2で染色し、上記と同様の操作を繰り返した。この結

果、IL-2と結合出来るが、抗Tac抗体と結合し得ない蛋白をコードする2種類のcDNAを得た。抗体を用いた解析およびDNAシーケンス解析から、1つはTac抗原のAsp-4、他方はAsp-4およびGlu-9に変異をもつTac variant分子をコードするcDNAである事が明らかとなった。またIL-2結合試験から、これらのvariant分子はintact分子と同等の親和性でIL-2と結合する事が示された。

〔総括〕

1) IL-2というリガンドを用いる事で、その細胞表面受容体を検出出来る事が明らかとなった。更に、ここで用いた方法によって受容体のcDNAクローニングが可能である事が示された。この方法は、多くのリコンビナントサイトカインが利用出来る現在において、対応する細胞表面受容体の構造解析に応用出来るものと思われる。

2) 抗Tac抗体およびIL-2はTac抗原への結合に関して競合的に作用するにも関わらず、Tac variantの解析から両者の結合部位は区別しうる事が明らかとなった。更に、Tac抗原のAsp-4が抗Tac抗体との結合において重要な位置を占めている事が示唆された。

3) COS細胞内でのplasmidのmutationが高頻度におこる事を考えると、この2つのTac variant cDNAは抗Tac抗体に反応しないという条件で多くのmutantの中から選択されたものと思われる。このように何らかの選択圧を加える事で、さらに興味あるmutantを得る事が可能であろう。

4) 今回、我々はp70-75 cDNAを得る事が出来なかった。その原因として、COS細胞で発現されたp70-75はIL-2に結合し得ない事、あるいはp70-75 mRNAの長さや構造の点から発現可能なcDNAを得にくい事などが考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は、リガンドを標識することによって、対応する受容体を検出する方法を開発すると共に、この方法を応用することによって、実際に受容体の遺伝子をクローンすることを可能とならしめた点で、極めて意義ある研究と考えられる。さらに、IL-2の受容体アルファ鎖のTac抗体とIL-2結合部位は、従来区別ないものと考えられていたが、本研究によって両者は区別出来ることを明らかにした。一連の成果は、今後のリガンドと受容体の解析に極めて重要と考えられ、充分博士論文として価値あるものと認める。