

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	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36058">https://hdl.handle.net/11094/36058</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 【17】

氏名・(本籍)	源	誠	二郎
学位の種類	医	学	博士
学位記番号	第	8587	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。