

Title	ジフテリア毒素リセプターの分離同定と抗ジフテリア毒素リセプター・モノクローナル抗体の作製
Author(s)	妹尾, 博行
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36086
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【8】

氏名・(本籍)	せの 妹	お 尾	ひろ 博	ゆき 行
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8 5 7 8	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	ジフテリア毒素リセプターの分離同定と抗ジフテリア毒素リセプター・モノクローナル抗体の作製			
論文審査委員	(主査) 教授 内田 暁 (副査) 教授 岡田 善雄 教授 上田 重晴			

論文内容の要旨

〔目的〕

ジフテリア毒素(以下、毒素)は真核細胞のペプチド伸長因子EF-2をADPリボシル化することにより標的細胞のタンパク合成を停止させ細胞を死に至らしめる作用を持つタンパク質である。この毒素が毒性を発揮するには毒素分子(あるいは、そのAフラグメント)が細胞質内に侵入する必要があるが、この時、重要な役割を果たすのが、細胞膜に存在するジフテリア毒素リセプターである。本研究では、毒素の細胞内侵入機構ひいてはタンパク質の細胞内輸送機構を明らかにするために、ジフテリア毒素リセプターの分離同定を行った。またVero細胞膜を抗原としてBALB/cマウスを免疫し、ジフテリア毒素リセプターに対するモノクローナル抗体を作製した。

〔方法ならびに成績〕

1. ジフテリア毒素の変異タンパク質CRM197を用いたジフテリア毒素リセプターの検索

サル腎由来Vero細胞はジフテリア毒素に最も高い感受性を有するので、この細胞から細胞膜を分離し、以下の実験に用いた。これまでの研究から、この細胞膜分画には目的とするリセプターではないが、ジフテリア毒素に結合する物質(以下、阻害物質という)が含まれていることが明らかになっていて、この阻害物質はリセプターと毒素の特異的結合の観察を困難にすることが予想される。本研究では、リセプターには結合するがこの阻害物質には結合しないと考えられる毒素の変異タンパク質CRM197を用いてリセプターの検索を行なった。¹²⁵Iで標識したCRM197をVero細胞膜とインキュベーションし、膜に結合したCRM197を測定したところ、過剰の未標識CRM197でコンピートされる特異的な結合が観察された。この結合は加えた¹²⁵I-CRM197の濃度に依存するが、一定の濃度(約80ng/ml)以上で

飽和した。この濃度依存結合量をもとに、スカッチャード・プロットからその結合定数と結合部位数を求めたところ、 $K_a = 2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, $B_{\text{mex}} = 54 \text{ fmol/mg protein}$ という値が得られ、 ^{125}I で標識した毒素を用いて生細胞で求めた値とよく一致した。また、毒素に感受性のないマウス L 細胞より細胞膜を分離し、同じ方法で CRM197 の結合を調べたところ L 細胞膜では CRM197 の特異的結合は全く認められなかった。さらに ^{125}I - CRM197 の Vero 細胞への結合は未標識毒素やリセプター結合能を持つ毒素変異タンパク質で阻害されたが、リセプター結合能を持たない毒素変異タンパク質やフラグメント A では全く阻害されなかった。以上の事実から、Vero 細胞膜で観察される ^{125}I - CRM197 の特異的結合がジフテリア毒素リセプターへのものであると結論し、次の実験を進めた。

2. リセプターの部分精製と SDS - ゲル電気泳動によるタンパク・バンドの同定

Vero 細胞の膜分画よりリセプターを界面活性剤で可溶化し、種々のカラムクロマトグラフィーによる精製を試みた。可溶化した試料中のリセプター活性は、レシチン存在下に試料をアセトン沈澱し、この沈澱した試料と ^{125}I - CRM197 をインキュベーションしてその結合活性をみた。その結果、CM-Sepharose カラムや CRM197 を結合したアフィニティークロマトグラフィーにより約 1 万倍の精製を行なうことができた。次に、CM-Sepharose で部分精製したリセプター標品を Bolton-Hunter 試薬でヨードラベルし、毒素あるいは CRM197 と抗毒素抗体を結合した Sepharose Beads で免疫沈降し、沈降したタンパク質を SDS-PAGE とオートラジオグラフィーで解析したところ、分子量 14.5 kD, 47 kD, 62 kD の 3 本のバンドが認められた。また、同じリセプター・フラクションを SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜にトランスファーし、 ^{125}I - CRM197 をプローブにして毒素結合タンパクを調べたところ、分子量 14.5 kD のバンドだけが検出され、14.5 kD のタンパクがリセプターあるいはリセプターの毒素結合部位であることがわかった。

3. 抗ジフテリア毒素リセプター・モノクローナル抗体の作製

アルカリ処理により得た Vero 細胞の膜分画を抗原として、BALB/c マウスを免疫した。免疫マウスより血液を採取し、その抗体価を調べたところ、単層培養 Vero 細胞への ^{125}I - CRM197 の結合を阻害する抗体が検出された。このマウスの脾細胞とミエローマ細胞を融合しハイブリドーマを作製した。HAT 培地中で増殖してきたハイブリドーマ約 1300 株のうち 3 株が ^{125}I - CRM197 の Vero 細胞への結合を阻害する抗体を分泌していた。現在、これら得られた抗体を再クローニングし、それぞれの抗体についてその性質を詳しく検討中である。

〔総括〕

1. 毒素の変異タンパク質 CRM197 を用いて Vero 細胞より得た細胞膜に毒素リセプターの活性を認めることができた。
2. 毒素リセプターはイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を用いて約 1 万倍まで精製された。
3. 部分精製したリセプター分画に含まれる 14.5 kD のタンパクが毒素リセプターあるいはその毒素結合部位であることがわかった。
4. 毒素のリセプターへの結合を阻害するジフテリア毒素リセプターに対するモノクローナル抗体を得た。

論文の審査結果の要旨

ジフテリア毒素に関する研究の歴史は長いが、ヒトを始めとする毒素感受性細胞に存在するジフテリア毒素リセプターに関しては、長年の努力にも関わらず、まったく解析されていなかった。本論文は世界で初めてジフテリア毒素リセプターの分離同定、並びにリセプターに対するモノクローナル抗体の作製を行った研究である。

この研究の特徴は毒素の変異タンパク質CRM197 を毒素リセプターの検索に用いた事で、これによって毒素と結合する他の物質の影響を受けずに、リセプターの検索が可能となった。リセプター分子の同定、リセプターに対するモノクローナル抗体の作製に成功し、これによって、今後このリセプターの構造をさらに詳しく解析する事を可能にした。

本論文は医学博士の学位論文として適当であると認められる。