



Title	Binding Properties of Monoclonal Antibody to the Cytoplasmic Domain of Transferrin Receptor
Author(s)	吉森, 保
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36865">https://hdl.handle.net/11094/36865</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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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)	吉 森 保
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8795 号
学位授与の日付	平成元年 7 月 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Binding Properties of Monoclonal Antibody to the Cytoplasmic Domain of Transferrin Receptor (ヒト・トランスフェリンレセプターの細胞質側部分に対するモノクローン抗体の分離とその性状)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄 (副査) 教授 岸本 忠三 教授 上田 重晴

## 論文内容の要旨

### (目 的)

レセプター・メディエーテッド・エンドサイトーシスは細胞における基本的かつ必須の生理活動である。その機構については多くの部分が不明のまま残されているが、レセプター分子の細胞質側部分が重要な働きをしている可能性が考えられ、近年それを示唆する実験結果も報告されている。著者は、この部分に対するモノクローン抗体が得られれば解析のプロープとして有用であると考え、ヒトのトランスフェリン・レセプター (TFR) を材料として、そのような抗体の作製及びそれを用いた解析を行う目的で以下の実験を行った。

### (方法ならびに成績)

#### 1) TFR に対するモノクローン抗体の分離

ヒト胎盤より TFR を可溶化、精製しこれを BALB/c マウスに免疫した。その脾臓細胞とミエローマ細胞 SP 2/0 を Köhler らの方法に従って融合しハイブリドーマを得た。スクリーニングは  $^{125}\text{I}$  標識 TFR を用いて行い、分離した抗 TFR モノクローン抗体の内 N-2, U-1, W-3 と名付けたものについて精製しその性状を解析した。

#### 2) モノクローン抗体の結合部位

$^{125}\text{I}$  標識した各抗体のヒト培養細胞 (HeLa, FL) に対する結合を調べたところ、N-2 と W-3 は有意な結合が見られたのに、U-1 は全く結合しなかった。次に cDNA から推測される TFR のアミノ酸配列に基づき細胞質側部分の一部 Ala<sub>8</sub>-Arg<sub>27</sub> を合成し、そのペプチド各抗体の結合を 2 種類の RIA で検討した。その結果 U-1 のみがペプチドに結合した。これらの結果から U-1

抗体の結合部位は細胞質側部分にあると結論された。トリプシン消化実験でもこの結論が支持された。他の2つの抗体N-2, W-3は細胞表層側部分を認識し、トランスフェリンとの競合実験からW-3はトランスフェリン結合部位の近傍に結合すると考えられる。

### 3) U-1 抗体の結合性の特徴

<sup>35</sup>S-メチオニンで標識した培養細胞 (FL, WI-38) を可溶化し、各抗体で免疫沈降した。N-2, W-3 と異なり U-1 は TFR を沈降しなかった。一方、一度 N-2 で沈降後回収したものや <sup>125</sup>I 標識した精製 TFR とは U-1 は結合した。TFR に対する結合定数も U-1 と N-2 ではほぼ等しい。ゆえに、U-1 が細胞可溶画分の TFR と結合しないのは、結合力が弱いためや、細胞質側部分が分解されているためでなく、①細胞可溶画分中の TFR では U-1 結合部位のある細胞質側部分が庶蔽され露出していない、②細胞可溶画分中に U-1 と交差反応する TFR 以外の因子が有り、それが U-1 と TFR の結合を競合的に阻害している、という2つの可能性が示唆された。

### 4) 他の抗体の U-1 抗体結合性に及ぼす影響

3) の可能性を更に調べるために <sup>125</sup>I 標識した U-1 と細胞可溶画分 (HeLa) を混合しそれを N-2 抗体-セファロース 4 B で沈降し放射活性を測定した。その結果、上記②の可能性が否定され、また U-1 は細胞可溶画分中の TFR と、それが N-2 抗体-セファロース 4 B と結合している場合には結合し得ることが判明した。一方、W-3 抗体-セファロース 4 B と結合している細胞可溶画分中 TFR に対しては U-1 は結合しなかった。これらの結果は、N-2 の結合が TFR 分子の構造変化を引き起こし U-1 結合部位を露出されるが、W-3 の結合はそのような変化を引き起こさないことを意味している。

最後に TFR に他の蛋白質が結合して、U-1 結合部位を庶蔽している可能性を検討するために、<sup>35</sup>S-メチオニンで標識した培養細胞 (FL) を可溶化し、それを結合部位露出を起こさない W-3 で免疫沈降したが、そのような蛋白質は確認出来なかった。よって U-1 結合部位の庶蔽および露出は TFR 分子自身のコンフォメーションによるものである可能性が高いと結論した。

### (総括)

- 1) 今回作製した TFR に対するモノクローン抗体の内、U-1 は TFR の細胞質側部分を認識していた。他の抗体 N-2, W-3 は TFR の細胞表層側部分を認識し、後者は TFR に対して、トランスフェリンと競合的に結合した。
- 2) これらのモノクローン抗体を用いた実験から、TFR の細胞質側部分には2つのコンフォメーション、すなわち U-1 が結合できる状態と出来ない状態、が存在し、N-2 の TFR への結合は後者から前者への遷移を引き起こすことが示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

本研究では、receptor mediated endocytosis の機構の解析に有用なモノクローン抗体の作製を、トランスフェリン・レセプターを材料として試みている。得られた抗体のうち一つがレセプターの細胞質側部分を認識することが示されているが、このような抗体は過去に報告例が無く極めて興味深い。さらにレセプターの細胞質側のその部位が可逆的に二つのコンフォメーション状態をとることを、抗体を用いた解析から見いだした。実験結果により、これらの結論を妥当性は十分に示されており、レセプターの構造に関する新知見を得た点で意義深い。

最近この抗体の結合部位と一致する領域が endocytosis の鍵となっていることが報告されており、以上の業績はこの分野の進展に大きく寄与するものと考えられる。