



Title	Signal transduction by interleukin 2 receptor $\beta$ chain : importance of the structural integrity as revealed by site-directed mutagenesis and generation of chimeric receptors
Author(s)	森, 寿
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/37212">https://doi.org/10.18910/37212</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	もり 森	ひまし 寿				
学位の種類	医	学	博	士		
学位記番号	第	9	6	7	0	号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 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	Signal transduction by interleukin 2 receptor $\beta$ chain : importance of the structural integrity as revealed by site- directed mutagenesis and generation of chimeric receptors (インターロイキン 2 受容体 $\beta$ 鎖によるシグナル伝達 : 特定部位 への突然変異導入, およびキメラ受容体の作製によって明らかにさ れた $\beta$ 鎖の全体構造の重要性)					
論文審査委員	(主査)					
	教 授 谷口 維紹					
	(副査)					
	教 授 平野 俊夫 教 授 岡田 善雄					

## 論文内容の要旨

### (目 的)

インターロイキン2 (IL-2) の受容体 (IL-2R) は少なくとも2つの異なる分子， $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖から構成されている。このうち $\beta$ 鎖はサイトカイン受容体ファミリーに属する分子であり，またIL-2による細胞内へのシグナル伝達を担う分子である。特に $\beta$ 鎖の細胞質内部分の特定領域 (Ser領域) が細胞増殖シグナルの伝達に必須であり，更にこの領域は，同じサイトカイン受容体ファミリーに属するエリトロポエチン受容体 (EPO-R) と相同性の高い領域に重複している。そこで本論文では，IL-2R  $\beta$ 鎖の構造と機能との関連性をより詳細に解析することを目的とし上記Ser領域内のアミノ酸に点突然変異を導入した変異体遺伝子，およびIL-2R  $\beta$ 鎖とEPO-Rとのキメラ遺伝子を作製し，マウスIL-2R  $\alpha$ 鎖を発現しているIL-3依存性細胞株BAF-B03に導入し発現されるIL-2Rの機能を解析した。

### (方法と成績)

#### 1) 変異体遺伝子の作製および変異体の機能解析

導入する点突然変異に対応した合成DNAを用い，SM1 (Leu<sup>278</sup>→Pro)，SM2 (Ile<sup>296</sup>→Val，Leu<sup>299</sup>→Pro)，SM3 (Ile<sup>296</sup>→Val)，SM4 (Leu<sup>299</sup>→Pro)，SM5 (Pro<sup>294</sup>→Ala) の5種類のヒト $\beta$ 鎖変異体遺伝子を作製した。これらの遺伝子を発現プラスミドに組み込み，neo耐性遺伝子とともにBAF-B03細胞株に導入した。このBAF-B03細胞株は，ヒト $\beta$ 鎖を導入，発現させることで新たに高親和性IL-2Rが形成されIL-2依存的細胞増殖を示すことから $\beta$ 鎖の機能解析に適切な細胞株である。G418による選択後，抗ヒト $\beta$ 鎖抗体を用い $\beta$ 鎖変異体を発現する細胞株を樹立した。

これらの細胞株では、いずれの変異体を発現する場合にも親細胞株には検出されない高親和性 IL-2 R が形成されていた。次に、これらの細胞株を用い IL-2 による細胞増殖を検討したところ、SM2 および SM4 変異体を発現する細胞株では IL-2 による細胞増殖は全く観察されなかった。この結果から  $\beta$  鎖内の特定のアミノ酸 Leu<sup>299</sup> が IL-2 による細胞増殖シグナルの伝達に必須の役割を担っていることが示された。

## 2) キメラ受容体遺伝子の作製およびキメラ受容体の機能解析

IL-2 R  $\beta$  鎖と EPO-R には上記のようにシグナル伝達における共通性が示唆される。そこでまず EPO-R 発現プラスミドを BAF-B03 細胞株に導入、発現させたところ EPO 依存的な細胞増殖を示す細胞株が得られ、EPO-R がこの細胞株で機能することが明らかとなった。さらに IL-2 R  $\beta$  鎖と EPO-R とから成る 2 種類のキメラ遺伝子 pBCE (IL-2 R  $\beta$  鎖と EPO-R とがキメラ受容体の細胞質内で置き換わったもの)、および pBEE (IL-2 R  $\beta$  鎖と EPO-R とがキメラ受容体の細胞質外で置き換わったもの) を作製し、それぞれ BAF-B03 細胞株に導入しキメラ分子を発現する細胞株を得た。これらいずれのキメラ分子を発現する細胞株においても IL-2 結合試験により、高親和性 IL-2 R が検出された。またいずれの細胞株においても IL-2 のインターナリゼーションが観察されたが、IL-2 による細胞増殖はみられなかった。

(総括)

- 1) 突然変異体 IL-2 R  $\beta$  鎖の機能解析から  $\beta$  鎖の特定のアミノ酸 (Leu<sup>299</sup>) が IL-2 による細胞増殖シグナルの伝達に必須の機能を担うことが明らかとなった。この Leu<sup>299</sup> はヒトおよびマウス  $\beta$  鎖、さらにはマウス EPO-R にも保存されており、また Chou-Fasman プログラムによる立体構造の予測から、蛋白の  $\alpha$ -ヘリックス構造中に位置すると考えられることから、 $\beta$  鎖の細胞質内部分の立体構造に重要な機能を担っていることが示唆される。
- 2) キメラ受容体を発現する細胞株にも高親和性 IL-2 R の形成およびインターナリゼーションが観察されたことから、 $\beta$  鎖の細胞外部分がそれらの機能を担っていることが示唆された。
- 3) BAF-B03 細胞株では EPO-R は細胞増殖シグナルを伝達したが、キメラ受容体にはこの機能は見い出されなかった。このことから  $\beta$  鎖によるシグナル伝達には、IL-2 結合後の  $\beta$  鎖の適切な立体構造の変化が必要であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

リンパ球増殖因子インターロイキン 2 (IL-2) は、2 種類の受容体、 $\alpha$  鎖 (IL-2 R  $\alpha$ ) 及び  $\beta$  鎖 (IL-2 R  $\beta$ ) に結合することが知られている。近年、両受容体 cDNA がクローンされ、一連の発現実験の結果から IL-2 R  $\beta$  鎖細胞質内領域に存在する特定アミノ酸配列が IL-2 による増殖シグナルの伝達に必須であることが明らかになり、またこの配列がエリトロポエチン受容体 (EPO-R) とホモロジーを示すことも判明した。本研究は、更に IL-2 R  $\beta$  の機能を解析するために、シグ

ナル伝達に関与する領域に変異を加え、変異 IL-2R $\beta$  の機能を解析することによってシグナル伝達に必須のアミノ酸 Leu<sup>299</sup> を同定することに成功した。更に本研究は EPO-R と IL-2R $\beta$  が共に増殖シグナルの伝達を行なう細胞において両者間のキメラ分子の機能を検定することによって、これらサイトカイン受容体によるシグナル伝達には受容体全体の構造及び、リガンド結合による特異的な立体的変化が重要であることを示した。一連の研究はサイトカイン受容体によるシグナル伝達機構の解明に大きく寄与したものであり、博士論文に充分値するものである。