

Title	Molecular Cloning and Expression of an IL - 6 Signal Transducer, gp130.
Author(s)	日比, 正彦
Citation	
Issue Date	
oaire:version	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3060170
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	日比正彦
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10171 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 病理系専攻
学位論文名	Molecular Cloning and Expression of an IL - 6 Signal Transducer, gp130. (インターロイキン - 6 シグナル伝達分子 gp130の遺伝子クローニングと発現)
論文審査委員	(主査) 教授 平野 俊夫 (副査) 教授 岸本 忠三 教授 谷口 維紹

論文内容の要旨

(目 的)

interleukin-6 (IL - 6) は、Bリンパ球の抗体産生細胞への最終分化を誘導する因子 (BSF - 2) として発見され、遺伝子クローニングによる構造が決定された。その後の研究から、IL - 6 は抗体産生を誘導するだけでなく、造血、肝での急性期反応誘導にも関わる生体防御の中心的役割を担う分子であることが明らかとなってきた。その IL - 6 の多様な機能は、細胞膜上に存在し IL - 6 と結合する IL - 6 レセプターと、IL - 6 刺激でレセプターと会合し細胞内へシグナルを伝達する膜蛋白 gp130 とを介して発揮されることが明らかとなった。そこで、本研究において、gp130 をコードする cDNA を単離し、その詳細な構造及び機能の解析を行った。

(方法ならびに成績)

1. 抗体 gp130 モノクローナル抗体の作成

IL - 6 で刺激したヒトミエローマ細胞株 U266 より、IL - 6 レセプターと会合した gp130 を抗レセプター抗体を用いて粗精製し、マウスに免疫し、gp130 を免疫沈降しうるモノクローナル抗体 AM277 を得た。さらに、この抗体を用いて、U266 細胞及びヒト胎盤から精製した gp130 を、免疫原としてモノクローナル抗体 AM64, AM66, AM82 抗体を作成した。これらの抗体のうち AM64 抗体は、U266 細胞上に存在する IL - 6 高・低親和性レセプターのうち、高親和性レセプターを阻害した。

2. gp130 cDNA のクローニング

上記の 4 抗体を用いてヒト胎盤 λ gt11 cDNA ライブラリーをスクリーニングし抗体と反応するクローンを得た。さらに、このクローンを用いて、胎盤及び U266 細胞のライブラリーを再スクリーニングし、gp130 構造部分全体をコードする cDNA を得た。cDNA の解析から、gp130 は 22 アミノ酸か

らなるシグナル配列を含む918アミノ酸（細胞外597アミノ酸，膜貫通部22アミノ酸，細胞内277アミノ酸）から構成されていることが明らかとなった。

gp130の細胞外領域の125-320の部分は，IL-6レセプターと同様サイトカインレセプターファミリーの構造（位置の保存された4つのシステム及びWS×WSモチーフを有する構造）をとっていた。さらに，この部分を含めて細胞外領域は，Fibronectin Type IIIドメインが6回繰り返す構造をとっていることが明らかとなった。細胞内領域は，IL-6レセプターと比較して長く，シグナルを伝えるのに十分な長さがあると考えられた。また，Ras等の低分子量GTP結合蛋白にみられる4つのコンセンサス配列（GXXXXG，DXXG，NKXD，EXSA）が存在した。

3. gp130の発現の解析

ヒト各種細胞株より polyA⁺RNA を抽出し gp130及び IL-6レセプターのコーディング領域をプローブとして Northern ブロット解析を行った。IL-6レセプター mRNA が主として IL-6反応性細胞株にしか発現されていないのに対して，gp130mRNA は解析したすべての細胞株に検出された。

4. gp130の IL-6高親和性レセプター形成に関わる役割の解析

gp130 cDNA を導入した形質導入株を作成し，gp130の IL-6を含めたサイトカインとの結合能を解析した。gp130は，IL-6のみならず IL-2，IL-3，G-CSF にも結合しなかった。さらに，IL-6レセプター cDNA を導入した細胞株では，低親和性レセプターがほとんどであるのに対して，gp130cDNA を導入することにより高親和性レセプターが形成されることが示された。

5. gp130のシグナル伝達能の解析

gp130cDNA をマウス IL-3依存性細胞株 BAF-B03に導入し，gp130のシグナル伝達能の解析した。可溶性 IL-6レセプターと IL-6を用いて形質導入株を刺激し，抗レセプター抗体で免疫沈降すると，レセプターと会合してgp130が沈降された。さらに，この系で³H-チミジンの取り込みを測定した結果，形質導入株は IL-6濃度依存性に増殖した。

(総括)

ヒト IL-6シグナル伝達分子 gp130をコードする cDNA を単離した。gp130の細胞外領域は，Fibronectin Type IIIドメインが6回繰り返す構造をとっていた。さらに，2番目および3番目のドメインはサイトカインレセプターファミリーに属する構造であった。抗gp130抗体を用いた実験および cDNA 形質導入実験から，gp130は IL-6とは結合しないが IL-6高親和性レセプター形成に関与することが示された。さらに IL-3依存性細胞株に gp130 cDNA を形質導入することにより gp130 の IL-6シグナル伝達能を再構築することができた。

論文審査の結果の要旨

インターロイキン6 (IL-6) は、免疫応答や急性期反応を誘導する生体防御にとって重要なサイトカインである。そのIL-6の機能は、IL-6と結合する低親和性IL-6レセプターと、IL-6刺激でレセプターと会合する膜糖蛋白gp130を介して伝達されるものと考えられている。本研究ではこのgp130をコードするcDNAを単離し、gp130自身はIL-6と結合しないが、低親和性レセプターと一緒に発現させることによってIL-6高親和性レセプターを形成すること、さらに、gp130がIL-6のシグナルを細胞内へ伝えるシグナル伝達分子として機能していることを証明したものである。本研究は、IL-6シグナル伝達解明に大きな役割を果たしたのみならず、サイトカインレセプターが機能の異なる二つの膜蛋白から構成されるというモデルを提唱したものであり、世界的にも高く評価されている。

したがって、本論文は学位論文として価値のあるものと認める。