

Title	Critical cytoplasmic region of the IL-6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family
Author(s)	村上, 正晃
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38125">https://hdl.handle.net/11094/38125</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"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	むら かつ まさ あき 村 上 正 晃
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 6 4 2 号
学位授与年月日	平成 5 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	Critical cytoplasmic region of the IL-6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family (IL-6 信号伝達蛋白 gp130 の細胞内領域に存在する IL-6 信号伝達 に重要なアミノ酸配列はサイトカイン受容体ファミリーで保存され ている)
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)

インターロイキン6受容体(IL-6R)系はIL-6結合能を持つが信号伝達能の無いIL-6Rと、IL-6結合能は持たないがIL-6・IL-6R複合体と会合して信号を伝達するgp130の2つの分子から構成される。本研究はIL-6信号伝達蛋白, gp130の細胞内領域にサイトカイン受容体ファミリーで保存されている領域を見だし, それに基づきIL-6の信号伝達に重要なアミノ酸配列を解析した。

#### (方 法)

- 1) 変異型gp130の作製および発現: gp130の細胞内領域に部位特異的変異導入法などにより, 終止コドンや別のアミノ酸への置換を導入したcDNAを作製した。次いで, レトロウイルス発現ベクター(pZipNeoSVX)に組み込み, マウスIL-3依存性プロB細胞株BAFB03に電気導入法にて形質導入した。
- 2) 変異型gp130分子の発現確認とIL-6・可溶性IL-6R(IL-6・sIL-6R)複合体との会合能の解析: 変異型gp130導入細胞をそれぞれ<sup>35</sup>S-メチオニンにより生体内標識し, IL-6およびsIL-6R刺激後に可溶化して抗IL-6抗体, MT18にて免疫沈降後, SDSPAGEで解析した。
- 3) 変異型gp130分子のIL-6信号伝達能の解析: 変異型gp130導入BAFB03細胞をそれぞれsIL-6R存在下, 各種濃度のIL-6と共に培養してIL-6依存性のDNA合成能を<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みを指標に解析した。
- 4) gp130分子のチロシンリン酸化の解析: 野生型および変異型gp130導入BAFB03細胞をそれぞれIL-6およびsIL-6R刺激有無の後, 可溶化し, 抗gp130抗体にて免疫沈降した。SDSPAGEに次ぐ抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

#### (成 積)

- 1) ヒトgp130の細胞内アミノ酸配列を他のサイトカイン受容体ファミリーに属する分子(GCSFR, IL-2R $\beta$ , EPOR, KH97, IL-3R, IL-7R, IL-4R)と比較したところ, これらの分子には細胞膜直下, 細胞内第10-60番アミノ酸にかけて相同領域が存在した。特に細胞内第10-17番アミノ酸(IWPNVPDP)のbox1はファミリー全体で高度に保存され, 細胞内第53-60番アミノ酸(EIEANDKK)のbox2はgp130, GCSFR, IL-2R $\beta$ , EPOR, KH97, およびIL-3Rで保存されていた。box1およびbox2の機能を検討するためにbox1およびbox2を残してC末端をすべて削除したgp130cDNA, box1を有するがbox2の半分以降を削除したgp130cDNA, 細胞内領域

をすべて持つが box 1 にアミノ酸の置換を有する変異型 gp130 cDNA などを作製した。

- 2) 変異型 gp130 分子はすべて野生型 gp130 分子と同程度に発現し、正常に IL-6・IL-6R 複合体と会合した。また、以下の実験には発現量のほぼ等しい細胞株をそれぞれ用いた。
- 3) 変異型 gp130 分子のうち box 1 および box 2 を共に完全に含むものは IL-6 依存性の増殖信号を伝達したが、box 2 以降の C 末端を欠くものや box 1 にアミノ酸の置換を導入したものでは IL-6 依存性の増殖信号を伝達できなかった。この結果から、サイトカイン受容体ファミリーで保存された細胞膜直下に存在する box 1 および box 2 が gp130 を介する IL-6 依存性の増殖信号伝達に重要であることが示された。
- 4) IL-6 および sIL-6R 刺激を加えた場合に野生型 gp130 分子はチロシン残基がリン酸化されたのに対し、IL-6 信号伝達能の失われた gp130 PP 分子はチロシン残基のリン酸化は認められなかった。この結果から、IL-6 刺激依存性に gp130 のチロシン残基をリン酸化するチロシンキナーゼの存在が示された。

(総括)

IL-6 信号伝達蛋白、gp130 にはサイトカイン受容体ファミリーに属する分子と高い相同性を有する領域が細胞膜直下に存在した。変異型 gp130 分子を用いた実験からこの相同領域が gp130 を介する IL-6 依存性増殖信号の伝達に重要であることが示された。また、IL-6 刺激依存性に gp130 をリン酸化するチロシンキナーゼの存在が示された。

#### 論文審査の結果の要旨

この研究は IL-6 進行伝達蛋白 gp130 の細胞質領域にサイトカイン受容体ファミリー全体を通じ、高い相同性を持つ 61 アミノ酸を有する領域を見だし、この領域の中でも特に高い相同性を有する box 1 (IWPNVDP) および box 2 (EIEANDKK) が IL-6 依存性の増殖信号伝達に必須であることを証明した。加えて、IL-6 刺激依存性に gp130 自身をリン酸化するチロシンキナーゼの存在を証明した。

この論文は IL-6 信号伝達に必須な gp130 の細胞内領域を同定し、IL-6 信号伝達系へのチロシンキナーゼの関与を示したことにより、gp130 以降の IL-6 の信号伝達機構を解明することに大きく寄与するものであり、学位論文に値する。