The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	An Antibody That Inhibits the Binding of Diphtheria Toxin to Cells Revealed the Association of a 27-kDa Membrane Protein with the Diphtheria Toxin Receptor
Author(s)	岩本, 亮
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3067980
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 23 】

氏　　名	岩　本　　亮（いわもと　りょう）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　1 0 8 4 4　号
学位授与年月日	平成 5 年 6 月 2 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	An Antibody That Inhibits the Binding of Diphtheria Toxin to Cells Revealed the Association of a 27-kDa Membrane Protein with the Diphtheria Toxin Receptor **（ジフテリア毒素受容体とアソシエートする27kDa膜蛋白質の発見とその解析）**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　木下タロウ （副査） 教 授　米田　悦啓　　教 授　本田　武司

論 文 内 容 の 要 旨

目　的

ジフテリア毒素（DT）はその感受性細胞において細胞膜上の受容体蛋白質を介して細胞内に侵入し，EF-2をADPリボシル化し蛋白合成を阻害する。DT受容体蛋白質の構造及び機能の解析は，受容体を介した蛋白質の細胞内侵入機構を解明する上で重要であると考えられる。DT受容体は分子量14.5kDaの膜蛋白質（DTR14.5）であることが既に同定され精製もされており，本研究では，DTの受容体への結合を阻害するモノクローナル抗体を作製し，これを用いてDT受容体やそれに関連する因子についてさらに解析を進めることを目的とした。

方法ならびに成績

1. DTの細胞への結合を阻害するモノクローナル抗体の作製：最も毒素感受性の高いサル腎由来Vero細胞の細胞膜分画を抗原として常法に従ってハイブリドーマを作製し，その培養上清の^{125}I-CRM197（DT受容体に特異的に結合する変異毒素）のVero細胞への結合阻害活性をもとにスクリーニングした。1200株から1株の活性を持ったクローン（007）が単離され，これの分泌する抗体を精製し実験に用いた。得られた抗体（以下007抗体）は^{125}I-CRM197のVero細胞への結合と細胞におけるDTの毒素活性を著しく阻害した。
2. 007抗体は27 kDa蛋白質を認識する：Vero細胞の可溶化膜分画に対する免疫沈降とウェスタンブロッティングから007抗体は，DTR14.5ではなく新たな分子量27kDaの膜蛋白質に対するものであることがわかった。このことからこの抗体は27kDa蛋白質と結合することでDTとDTR14.5の結合を阻害していると考えられ，27kDa蛋白質はDTR14.5と密接にアソシエートしていることが予想された。そこで27kDa蛋白質をDRAP27（Diphtheria Toxin Receptor Associated Protein）と名づけた。
3. DT受容体を含む種々の膜分画へのCRM197の結合に対する007抗体の効果：Vero細胞の（1）アルカリ抽出膜，（2）膜可溶化分画（以上DRAP27を含む）及び（3）精製DTR14.5（DRAP27は含まない）への^{125}I-CRM197の結合に対する007抗体の効果を観察したところ，Vero細胞に対する結合を100%阻害する抗体濃度（30 μg/$m\ell$）において，（1）では約50%しか阻害活性がなく，（2），（3）ではほとんど又は全く阻害活性はみられなかった。これら

のことから，007抗体によるDTの細胞への結合阻害活性が，抗体のDTR14.5への直接の結合によるものではなく細胞膜上でアソシエートしているDRAP27を介した間接的な効果であることが確認され，この効果には細胞膜のネイティブな構造が必要であることがわかった。

4. DRAP27とDTR14.5のアソシエーション：DRAP27とDTR14.5とのアソシエーションの確認のために，Vero細胞膜可溶化分画を007抗体カラムにかけるとDTR14.5（DT結合活性）がカラムに吸着したが，DRAP27を含まない精製DTR14.5をカラムにかけた場合は活性は吸着しなかった。このことから，DT結合活性はDRAP27を介して007抗体カラムに吸着したと考えられ，DTR14.5はDRAP27と密接にアソシエートしていることが確認された。
5. DRAP27の発現量と毒素感受性の相関：さらにDRAP27の性質を調べるため，種々のレベルの毒素感受性をもつ細胞（Vero＞HEL＞FL＞L）におけるDRAP27の発現量を^{125}I-007抗体の細胞への結合量から算出したところ，細胞の毒素感受性とDRAP27の発現量との間に相関関係がみられた。このことからDRAP27はDTの受容体との結合及び細胞内侵入になんらかの役割を担っていることが示唆された。

総　括

1. DTの細胞への結合を阻害するモノクローナル抗体を作製した。
2. この抗体はDT受容体DTR14.5を認識せず新たな27 kDaの膜蛋白質DRAP27を認識した。
3. DRAP27はDTR14.5と密接にアソシエートしていることが明かとなった。
4. DRAP27の発現量と毒素感受性との間に相関関係が観察され，DRAP27がDTの受容体への結合及び細胞内侵入においてなんらかの役割を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ジフテリア毒素は感受性細胞の膜上の受容体タンパク質を介して細胞内に侵入し，elongation factor-2をADPリボシル化して蛋白合成を阻害する。ジフテリア毒素の受容体は，分子量14,500の膜タンパク質であることがすでに同定され精製もされている。本研究は，ジフテリア毒素の受容体への結合を阻害するモノクローナル抗体を作製し，これをもちいて毒素の細胞内侵入機構を解析することを目的として行われた。

ジフテリア毒素に最も感受性の高いVero細胞の細胞膜を抗原として用い，毒素のVero細胞への結合を阻害するモノクローナル抗体007を得た。007抗体は受容体そのものではなく，分子量27,000の膜タンパク質を認識することがわかった。また細胞膜の可溶化分画をもちいて，分子量27,000のタンパク質が毒素受容体とアソシエートしていることを証明したので，このタンパク質をDRAP27（Diphtheria Toxin Receptor Associated Protein）と名づけた。007抗体は毒素受容体と分子量27,000の膜タンパク質の両方が存在するときには毒素の受容体への結合を阻害したが，精製された受容体への結合は阻害しなかったので，007抗体はDRAP27を介して間接的に毒素の結合を阻害すると考えられる。また細胞の毒素感受性とDRAP27の発現量との間に相関関係がみられた。これらの結果は，ジフテリア毒素の細胞内侵入にタンパク質複合体が働いていることを示唆する新しい知見であり，学位に値する。