



Title	マウス・インターロイキン6受容体遺伝子のクローニングと解析：プラズマサイトーマP3U1細胞での変異型IL-6受容体mRNAの大量発現
Author(s)	杉田, 尚久
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38577
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	杉田尚久
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 10918 号
学位授与年月日	平成 5 年 9 月 17 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	マウス・インターロイキン 6 受容体遺伝子のクローニングと解析 — プラズマサイトーマ P3U1 細胞での変異型 IL-6 受容体 mRNA の大量発現 —
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 濱岡 利之 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

【目的】

多機能性サイトカインであるインターロイキン 6 (IL-6) のシグナル伝達機構や IL-6 と自己免疫疾患などの病態との関連を解明するさいに、受容体分子の構造や機能の解析は必要不可欠である。本研究ではマウス IL-6 レセプター (IL-6R) の構造と機能解析を目的として、cDNA のクローニングを試みた。

【方法】

1) マウス IL-6R・cDNA のクローニング

BALB/c マウスの脾細胞および P3U1 細胞 (plasmacytoma) から調製した poly(A)⁺RNA をもとに、λ ファージ gt10 を用いて cDNA ライブライアリを調製した。ヒト IL-6R の cDNA (pBSF2R236 の FspI-BamI 断片) をプローブに用いて、マウス IL-6R cDNA クローンをスクリーニングした。ブラークハイブリダイゼーションは 1% SDS, 1M NaCl, 0.05M Tris・HCl (pH7.5), 5X Denhardt's 液液, 200 μg/ml salmon sperm DNA 存在下に 65°C で 16 時間行った。得られた陽性クローンの塩基配列を dideoxy 法で決定した。

2) ノーザンブロッティング

BALB/c マウスの各種臓器または種々の株化細胞から調製した poly(A)⁺RNA を 1% アガロース・ホルムアルデヒドゲルで分離し、ナイロンフィルターに転写した。マウス IL-6R cDNA 断片 (EcoRI-BamHI 断片) をプローブに用いて mRNA を検出した。

3) マウス IL-6R のヒト細胞での発現と機能の解析

2 種類の IL-6R cDNA を発現ベクター pM5G の EcoRI 部位にそれぞれサブクローニングし、electroporation 法で KT-3 細胞 (T lymphoma) にトランスフェクションした。トランスフェクタントでのマウス IL-6R の発現と機能をみるため、マウス recombinant IL-6 に対する増殖応答を ³H-thymidine の DNA への取り込みを指標にして調べた。

【成 績】

- 1) マウス IL-6R の cDNA をクローニングした。マウスIL-6R は460アミノ酸の膜貫通タンパクで、細胞外領域のアミノ末端側には免疫グロブリンスーパーファミリーの C2セットに類似の構造が存在し、さらにサイトカインレスペクターファミリーに特徴的な 4箇所の Cys 残基と Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser 配列が保存されていた。
- 2) マウス IL-6R の mRNA は脾臓、胸腺、肝臓などの臓器や、P3U1, EL-4 (T lymphoma), P388D1 (macrophage-like) などの細胞株で発現していた。
- 3) P3U1細胞では正常型の IL-6R の mRNA に加えて、変異型の mRNA が大量に発現していた。変異型の mRNA では細胞内領域に相当する部分以下3'側の領域が、非感染性のレトロウイルス様遺伝子である小胞体内 A 粒子遺伝子の long terminal repeat 配列に置換されていた。
- 4) 正常型および変異型のマウス IL-6R をヒト T 細胞株 KT-3で発現させると、両者ともマウス IL-6に対する増殖応答能を獲得した。
- 5) P3U1細胞以外の 5種のプラズマサイトーマでは変異型 IL-6R の mRNA の発現はみられなかった。

【総 括】

マウス IL-6R の cDNA を単離し、その構造を明らかにした。マウス IL-6R は細胞外領域に免疫グロブリン様ドメインを有する460アミノ酸の膜貫通蛋白で、サイトカインレスペクターファミリーに特徴的な構造を有していた。P3U1細胞は正常型に加えて変異型 IL-6R の mRNA を大量に発現していた。変異型 IL-6R 遺伝子では細胞内領域をコードする部分が小胞体内 A 粒子遺伝子に置換されていた。変異型 IL-6R を発現させたヒト KT-3細胞はマウス IL-6に対する増殖応答能を獲得し、IL-6R としての機能を保持していた。

IL-6はプラズマサイトーマの増殖因子としても作用することから、機能性 IL-6R の異常発現は、P3U1細胞のようなプラズマサイトーマの発生に寄与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、マウス・インターロイキン6受容体(IL-6R)のcDNAを単離し、その遺伝子構造を明らかにした。塩基配列から一次構造を推定し、その細胞外領域が免疫グロブリン様ドメインとサイトカインレスペクターファミリーに特徴的なドメインで構成されていることを示した。また、プラズマサイトーマ・P3U1細胞で、正常型のIL-6R mRNAに加えて、変異型のIL-6R mRNAが大量に発現していることをみいだした。変異型のIL-6R mRNAでは、細胞内領域をコードする領域がレトロウイルス様因子である小胞体内A粒子の遺伝子に置換されていることを明らかにし、このタンパクがレセプターとして機能することも証明している。これらのこととは、IL-6Rの細胞内領域の配列がシグナル伝達に必須でないことを示すとともに、機能性IL-6Rの大量発現がプラズマサイトーマの発生過程に寄与していることを示唆するものである。さらに、本研究によって明らかにされたマウスIL-6R遺伝子の解析結果は、IL-6のシグナル伝達機構などを解明する際に有用な情報を提供すると考えられる。よって、以上の研究は学位に値する業績と認められる。