The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure-function analysis of human IL-6 receptor : dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130
Author(s)	八幡, 英夫
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39454
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

【 36 】

氏　　名	八　幡　英　夫（やわたひでお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12033　号
学位授与年月日	平成7年6月7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	Structure－function analysis of human IL－6 receptor : dissociation of amino acid residues required for IL－6－binding and for IL－6 signal transduction through gp130 （ヒトIL－6レセプターの構造機能解析：IL－6の結合とIL－6シグナルの伝達に必要なアミノ酸残基の分離）
論文審査委員	（主査） 教授　岸本　忠三 （副査） 教授　宮坂　昌之　　教授　平野　俊夫

論文内容の要旨

【目　的】

多機能サイトカインであるIL－6は，標的細胞表面上の特異的なレセプター系を介してその機能を発揮する。IL－6のレセプター系はいわゆるサイトカインレセプターファミリー（CRF）に属する2つの膜貫通型蛋白質，すなわちIL－6Rとgp130から成る。IL－6がIL－6Rの細胞外領域に結合すると，IL－6Rとgp130は互いの細胞外領域を介して会合し，その結果gp130によりIL－6の情報が細胞内に伝達される。即ちIL－6Rの細胞外領域は，IL－6との結合，および情報伝達のためのgp130との会合という2つの役割を担っている。これらの役割にIL－6Rの細胞外領域のどのような構造がどのように関与しているのかを知るために，この領域の構造機能解析を行った。

【方法ならびに成績】

(1)　IL－6との結合に関与するドメインの同定

ヒトIL－6Rの細胞外領域はN末端側の免疫グロブリン（Ig）ドメイン（アミノ酸残基～20から～110）と細胞膜側のCRFドメイン（同～110から～330）の2つのドメインに分けられる。そのどちらがIL－6との結合に関与しているかを解析するために，各々のドメインを欠失したヒトIL－6R変異体IL－6RΔIg（Δ27－105）およびIL－6RΔFam（Δ124－342）のcDNAを作製し，これらのIL－6R変異体および野性型ヒトIL－6RをcDM8ベクター／COP細胞系にて一過性に発現させ，ビオチン化ヒトIL－6とFITC－アビジンで染色後，FACSにて解析した。その結果，IL－6RΔFamを発現したCOP細胞は染色されず，野性型IL－6およびIL－6RΔIgを発現したCOP細胞は同程度に染色された。以上の結果よりIL－6Rにおいて，IgドメインはIL－6との結合には不要であり，CRFドメインがIL－6との結合能を担っていることが解った。

(2)　IL－6シグナルの伝達に関与するドメインの同定

IL－6との結合能を担うCRFドメインがIL－6シグナルの伝達に必要十分であるか否かを調べるために，野性型ヒトIL－6R cDNAおよび上記IL－6RΔIg cDNAをそれぞれpZipNeoベクターに挿入し，マウス培養細胞株M1に導入してtransfectant M1IL－6RおよびM1IL－6RΔIgをそれぞれ得た。M1，M1IL－6RおよびM1IL－6R

ΔIgの細胞表面上のIL－6結合部位数はそれぞれ細胞あたり約50，約6700，約2600であった。M1細胞はIL－6に応答してマクロファージへと分化して増殖を停止し，^{3}Hチミジンの取り込みも停止する。この増殖停止を指標としてM1IL－6RおよびM1IL－6RΔIgのIL－6に対する感受性を調べると，親株M1に対してそれぞれ約36倍，約15倍の感受性を示した。このIL－6感受性の増大は細胞表面上のIL－6結合部位数の多少とよく相関していることから，ヒトIL－6RにおいてCRFドメインがIL－6シグナルの伝達に必要十分であることが示唆された。

(3) CRFドメイン中のIL－6との結合に関与するアミノ酸の同定

遺伝子工学的に作製した可溶性IL－6Rは，IL－6との結合と情報伝達のためのgp130との会合というIL－6Rの2つの機能を保持している。そこでIL－6RのCRFドメイン中のIL－6結合に関与するアミノ酸を同定するために，in vitro mutagenesis によりアミノ酸置換を導入した種々の可溶性IL－6R変異体cDNAを作製してpSVLベクター／COS7細胞系にて各可溶性IL－6R変異体を一過性に発現させ，IL－6結合能を解析した。即ち，各COS7培養上清をIL－6との結合を阻害しない抗ヒトIL－6Rモノクローナル抗体MT18をコートしたタイタープレートに加えて各変異体をトラップ後，^{125}I標識IL－6結合量を測定した。その結果，置換したアミノ酸101個中，39個がIL－6結合に必要であると考えられた。IL－6Rが属するCRFの提唱者Bazanが提出したCRFドメインの立体構造モデルによると，CRFドメインは7つのβストランドとそれらを連結するループ領域より形成される「樽型」のモジュールが2つ繋がった構造をとる。IL－6RのIL－6結合に必要な39個のアミノ酸の位置をこのモデルにあてはめてみると，そのうちCRFに特徴的な‘WSXWS’モチーフを含む23個が2つのモジュールを繋ぐヒンジ領域付近に位置した。また，IL－6結合に必要なアミノ酸のうちβストランド上に位置すると考えられる22個中CRFに特徴的な4つのCys残基のうち3つを含む17個が2つの「樽型」モジュールの一側面上に偏って位置していた。

(4) IL－6シグナルの伝達能を失った可溶性IL－6R変異体

IL－6反応性マウス細胞株NFS60にヒトgp130 cDNAを発現ベクターpZipNeoを介して導入し，NFS130細胞株を作製した。NFS130細胞のIL－6存在下での可溶性IL－6R濃度依存的^{3}Hチミジンの取込みの増大は，親株のNFS60細胞に比べてより高い感度を示した。このNFS130細胞の培養液に（3）で得た各種可溶性IL－6R変異体を含む培養上清をIL－6と共に加えて2日間培養後，^{3}Hチミジンの取り込みの増強を指標に可溶性IL－6R変異体のIL－6シグナルの伝達能を評価した。評価の結果，(3) でIL－6結合能を保持していた可溶性IL－6R変異体42種中，7種ではIL－6シグナルの伝達能が失われていた。この7種の変異体で置換されているアミノ酸7個を上記の立体構造モデルにあてはめてみると，7個中6個は第2モジュールの細胞膜に近い部位に集中していた。

この7種の可溶性IL－6R変異体がIL－6シグナルの伝達能を失った原因を調べるために，これら変異体のIL－6存在下でのgp130結合能を評価した。^{125}I標識可溶性gp130をIL－6と共に野性型及び各変異体を含む濃縮培養上清と混合・インキュベートした後，抗ヒトIL－6Rモノクローナル抗体MT18を用いて免疫沈降した。その結果，^{125}I標識可溶性gp130は野生型の可溶性IL－6により免疫沈降されたが，IL－6シグナルの伝達能を失った7種の可溶性IL－6R変異体によっては沈降されなかった。したがって，これらの可溶性IL－6R変異体はIL－6には結合できてもgp130に結合できないためにIL－6シグナル伝達能を失っていることが示唆された。

【総　括】

本研究において，欠失変異体およびアミノ酸置換変異体の作製によりヒトIL－6Rの構造機能解析を行った。その結果，(i) IL－6Rの細胞外領域が持つIL－6との結合および情報伝達のためのgp130との会合という2つの役割がいずれもIL－6RのCRFドメインにより担われていること，(ii) CRFドメイン中のIL－6結合に関与すると考えられる39個のアミノ酸および関与しないと考えられる62個のアミノ酸，(iii) IL－6結合能を有しているもののIL－6シグナルを伝達できない7個の可溶性IL－6R変異体，(iv) (iii) の変異体がIL－6ジグナルを伝達できない原因がIL－6結合後ジグナル伝達因子であるgp130と会合できないためであること，を見いだした。さらに，CRFドメイン中のIL－6結合に関与すると考えられるアミノ酸の立体的位置やgp130との会合に必要な7個のアミノ酸の立体的位置を，CRFの立体モデル上にあてはめてみると，それぞれ一定の偏った部位に位置していることから，これらのアミノ酸のIL－6Rの立体構造の維持やIL－6との直接的相互作用，またIL－6結合後のgp130との会合における役割が推察

された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，多機能性サイトカインIL－6のレセプター系を構成する2種類の膜貫通型蛋白のうち，リガンドであるIL－6分子の結合と情報伝達のためのgp130分子への会合という2つの機能を持つIL－6レセプターの細胞外領域の構造機能解析を行ったものである。本研究では，まず欠失変異体の作製により上記2つの機能がいずれもサイトカインレセプターファミリードメインのみにより担われていることを明らかにし，次にアミノ酸置換変異体を多数作製してそれぞれの機能に関与するアミノ酸野同定を行っている。その結果，サイトカインレセプターファミリーに特徴的な4つのシステイン残基やWSXWSモチーフがIL－6の結合に重要なこと，IL－6結合に必要なアミノ酸残基とgp130との会合に必要なアミノ酸残基が別個に存在すること，などが示された。さらに，これらのアミノ酸残基の立体的位置とその役割についての立体モデルを用いた議論がなされている。本研究の成果は，サイトカインレセプターファミリーにおける情報伝達のためのリガンド分子・レセプター分子・シグナル伝達分子の相互作用様式について一つの普遍的なモデルを提唱するものであり，その学問的価値は非常に高いと考える。よって本研究は学位の授与に値するものと考えられる。