Osaka University Knowledge Archive

Title	Molecular cloning of a pig homologue of membrane cofactor protein(CD46
Author(s)	豊村, 浩司
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41019
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【103】

氏　　名	豊　村　浩　司（とよむら こうじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　14000　号
学位授与年月日	平成10年3月25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	Molecular cloning of a pig homologue of membrane cofactor protein(CD46) (membrane cofactor protein(CD46)のブタホモログの遺伝子クローニング)
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　木下タロウ （副査） 教　授　谷口　直之　　教　授　竹田　潤二

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

近年，移植用臓器の不足を回避する方法として，異種の臓器の利用を目指した研究が行われている。特にブタは臓器の大きさが適当であること，トランスジェニック技術が確立していること，多産であること，食用の家畜であり倫理的問題がより少ないことの点より，移植用臓器の供給動物として重要視され研究されている。

しかし，ブタの臓器を霊長類に移植すると移植後一時間以内に補体関与の拒絶反応が生じる（超急性拒絶）。この反応のメカニズムとしては，霊長類血清中にあらかじめ存在していて，ブタ組織表面の糖鎖と反応する抗体を引き金とする，補体の一連の反応が考えられている。この超急性拒絶を回避するためにいくつかの方法が試みられているが，その内の一つは，ヒト補体の反応から自己組織を防御するヒト補体制御因子を発現したトランスジェニックブタを作成し，ヒト補体の反応から移植ブタ臓器を守ろうとする方法である。この場合，外来のヒトの補体制御因子をブタ自身の補体制御因子の発現している部位に充分量発現させなければならず，そのためのプロモーターとしてブタ由来の補体制御因子のプロモーターが適切と考えられる。しかし，ブタの補体制御因子についてはプロモーターどころか遺伝子も一つも取られておらず情報がなかった。また，超急性拒絶を生じるメカニズムの一つとしてブタの細胞上の糖鎖に反応する抗体の存在以外に，ヒト補体成分のC3bの分解反応の反応性がブタ補体制御因子では弱いことが予想されるが，*in vitro*の系における直接的証明はなされていなかった。そこで，本研究ではブタ補体制御遺伝子のプロモーターを得る第一ステップとして，ブタの補体反応を利用した発現クローニングの系を組み，ヒトCD46のブタホモログをクローニングした。そして，ブタとヒトのCD46のコファクター活性の比較を行った。またモノクローナル抗体を作り，ブタのCD46の血管内皮及び血球における発現を解析した。

【方法】

ブタ補体制御因子の高発現部位と考えられる血管内皮由来の細胞株(PAE)よりcDNAライブラリーを作成した。このライブラリーをヒトBリンパ芽球細胞であるJY細胞に導入し，まず，ハイグロマイシンBでセレクションしてトランスフェクタントを得た。その後，JY細胞上のヒト補体制御因子を抑制するために抗CD46抗体，抗CD55抗体，また古典経路を活性化するために抗HLA I抗体を反応させ，更にブタの補体原としてブタ血清を2時間37度で反応させた。1回目の処理での細胞の生存率は0.1%であったが，一週間後，生存した細胞数が元に戻った時に，再び同じ

処理を行うと生存率は6％，更にもう一度細胞数が元に戻った時に処理すると生存率は20％と上昇した。この細胞群よりプラスミドを回収し，インサートの大きさと制限酵素切断パターンで分けた10種類についてJY細胞にトランスフェクションするとこの中の1種類が高い抵抗性を与えた。このcDNAの配列を決定しヒトCD46の配列と比較した。またバキュロウイルスベクターを用いカイコでこの遺伝子にコーディングされた蛋白を発現させ精製した。ブタとヒトのCD46存在下に，^{125}Iで標識したヒトC3bがI因子によって分解されるパターンをSDS-pageで解析し，ヒトとブタのCD46のコファクター活性の比較を行った。またこの蛋白を使って抗ブタCD46の抗体を作成しブタ細胞でのCD46の発現量をフローサイトメトリーで解析した。

【結果】

1．ブタ血清によるセレクションの結果，得られたcDNAは42％のヌクレオチド相同性を持つヒトCD46のブタホモログであった。cDNAは5'UT，ORF，3'UTを含む1365ヌクレオチドの全長を持ち，配列より予想される蛋白は363アミノ酸の大きさでシグナルペプチドに続き4つのSCR，STR領域，膜貫通領域，細胞質内ドメインというヒトCD46と同一の構築を持つものであった。特に4つのSCRを形成する16個のシスティンの位置は，ほとんどギャップ無しで保存されていた。また，4つのSCRの内，活性中心と考えられるSCR4の領域は最も高い63％のアミノ酸同一性を持っていた。

2．本cDNAをカイコに発現させて得た蛋白の活性をヒトCD46と比較した。この結果，ヒトのC3bに対する分解力として，ブタのCD46はヒトのCD46に比べて1／10以下の活性しか持っていないことが明らかになった。

3．ブタの赤血球，白血球，血管内皮細胞を抗ブタCD46抗体で染色し，FACSで解析したところブタの場合はヒトと異なり，赤血球にも発現しており，その強さは赤血球＜白血球＜血管内皮細胞の順であることがわかった。

【総括】

ブタ補体を用いた発現クローニングによりヒトCD46のブタホモログcDNAをクローニングした。そのヌクレオチド相同性は42％とそれほど高いものではなかったが，ドメイン構造はよく保存されていた。またブタCD46蛋白はヒトC3bのI因子による分解に対してコファクター活性を示したが，その比活性はヒトCD46の1／10以下で，このことが超急性拒絶を起こす一つの要因であることが予想された。

論文審査の結果の要旨

ブタ臓器を移植医療に応用する可能性が追求されている。しかし，ブタ組織にはヒトや霊長類の自然抗体に反応する抗原があり，移植後ただちに抗原抗体反応そして補体の活性化が進行し，超急性拒絶がおこる。ブタの補体制御因子がヒトや霊長類の補体に対して効率良く働かないことが簡単に拒絶される理由の一つである。ヒトの補体を効率良く抑制するヒトの補体制御因子をトランスジェニックの手法によりブタ組織上に発現させればヒト補体に抵抗性のブタ臓器が得られ，超急性拒絶が回避できる可能性がある。トランスジェニックブタ作製にはブタ補体制御因子遺伝子のプロモーターが適していると考えられる。

本研究はトランスジェニックブタに応用可能なプロモーターを得るための第一歩としてブタ補体制御因子のcDNAをクローニングすることを目的とした。ヒトの細胞をブタ補体に抵抗性にすることを指標にした発現クローニング法を工夫し，ヒトCD46のブタホモログのcDNAが得られた。塩基配列の相同性は42％と高くなかったが，ドメイン構造はよく保存されていた。ブタCD46のリコンビナント蛋白質はC3bが分解するI因子のコファクターとして働く補体制御活性を持っており，機能的にもヒトCD46と同様であった。しかし，ヒトC3bとI因子に対するコファクター作用の比活性はヒトCD46の1／10であり，ブタ組織がヒト補体に弱いことと一致した。本研究で得られたcDNAはブタCD46遺伝子のプロモーターのクローニングを用いられ，現在そのプロモーターを利用したトランスジェニックブタの開発に応用されつつある。本研究は異種移植技術の開発に資するcDNAを初めてクローニングしたものであり，学位の授与に値すると考えられる。