

氏 名（本籍） 久 間 木 さとる 悟

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 1 3 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
（ 博 士 課 程 ） 病 理 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 Molecular cloning and expression of mouse
interleukin 2 receptor γ chain.
（ マウスインターロイキン2受容体の遺伝子単離
と発現）

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 菅 村 和 夫 教 授 帶 刀 益 夫
教 授 柴 原 茂 樹

論文内容要旨

インターロイキン2 (IL-2) は免疫系において中心的な役割を果たすサイトカインの1つである。IL-2はIL-2受容体を介し、細胞内へシグナルを伝達する。IL-2受容体には、これまで α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットの存在が知られており、高親和性受容体(解離定数, $K_d=10^{-11}M$)は α 鎖と β 鎖を含み、中親和性受容体($K_d=10^{-9}M$)は β 鎖を、低親和性受容体($K_d=10^{-8}M$)は α 鎖を含むことが分かっていた。また高親和性と中親和性IL-2受容体からシグナル伝達が見られることも分かっていた。しかし、 β 鎖遺伝子を単独で線維芽細胞に発現させてもIL-2結合は認められず、また α 鎖遺伝子と共に発現させるとやや低めの高親和性受容体($K_d=10^{-10}M$)を形成するが、細胞内へのシグナル伝達は認められなかった。これらの結果から機能的に完全なIL-2受容体の形成にはリンパ球に特異的な第3のサブユニット、 γ 鎖が必要であると考えられた。我々は最近ヒトの機能的IL-2受容体において γ 鎖を同定し、その遺伝子を単離した。この遺伝子をヒト β 鎖遺伝子と共にマウス線維芽細胞に導入すると中親和性受容体を、さらにヒト α 鎖、 β 鎖両遺伝子と共に導入すると完全な高親和性受容体を発現した。即ち γ 鎖がIL-2受容体に必須なサブユニットであることが証明された。この γ 鎖の機能、特に発生、分化における役割をヒトの系で解析するには制限があるので、解析の容易なマウス実験系の確立が望まれた。このため本研究ではマウスIL-2依存性T細胞株CTLL-2のcDNAライブラリーからヒトIL-2受容体 γ 鎖cDNAをプローブとしてクロスハイブリダイゼーション法により、マウスIL-2受容体 γ 鎖cDNAの単離を試みた。その結果得られたマウス γ 鎖cDNAは、369個のアミノ酸から成る1つの翻訳可能領域を有し、N末に22アミノ酸から成るシグナルシーケンスを、またC末寄りに29アミノ酸から成る細胞膜貫通領域を含むことが推測された。細胞膜表面に発現してくるときの蛋白質骨格は347アミノ酸で、計算上の分子量は39,762であった。またマウス γ 鎖cDNAがコードするアミノ酸の長さはヒトと同じで、細胞外領域が1アミノ酸長く233アミノ酸で細胞内領域が1アミノ酸短く85アミノ酸であった。さらにマウス γ 鎖はヒトと非常によく似ており、核酸で80%、アミノ酸で70%の相同性を有した。細胞外領域はヒトと66%のアミノ酸相同性があり、N末側に4つの保存されたシステイン残基と、膜貫通領域近位側にWSモチーフとを持つサイトカインレセプタースーパーファミリーに属していた。またヒト γ 鎖ではこれらの保存されたシステインのある領域とWSモチーフとの間にロイシンジッパー様構造がみられたが、マウスでは1つのロイシン残基がイソロイシンに置換されており、この領域がIL-2受容体の機能上どのような役割を担っているか現在解析中である。細胞内領域はヒトと83%の相同性を有し、既知のキナーゼドメインは認められないもののリン酸化蛋白質と会合できる可能性のあるSrc相同性領域2

(SH2) のサブドメインがあり良く保存されていた。次にこのマウス γ 鎖 cDNA が機能的なものであるかどうかを確認するため、IL-2 結合能および IL-2 インターナリゼーションを検討した。マウス α 鎖および β 鎖遺伝子を IL-2 受容体の発現していない L929 細胞に導入すると $K_d=254\text{pM}$ とやや低い高親和性 IL-2 受容体を 2325 サイト発現したが IL-2 のインターナリゼーションは認められなかった。しかしこの細胞にさらにマウス γ 鎖を遺伝子導入すると $K_d=60\text{pM}$, 1735 サイトの完全な高親和性 IL-2 受容体が発現し、IL-2 をインターナリゼーションするようになった。このように今回クローニングしたマウス γ 鎖 cDNA は機能的であった。そこでこのマウス γ 鎖がどの細胞株および臓器で発現しているかをノーザンプロットで検討した。その結果、T 細胞株である CTLL-2 と EL-4, pro-B 細胞株である BAF, およびナチュラルキラー細胞株である NK3 では γ 鎖が構成的に発現しているのに対し、Balb/3T3, NIH/3T3 等の線維芽細胞株では γ 鎖の発現は認められなかった。また各臓器についてみると脾臓、胸腺および肺で γ 鎖 mRNA が構成的に発現しており、さらに ConA 刺激で脾臓、胸腺の γ 鎖 mRNA の増加が認められた。肺でどの細胞が γ 鎖を発現しているかは今後の検討課題である。この γ 鎖遺伝子は IL-2 受容体の全体像をあきらかにしていく上で極めて有用で、特に造血系細胞の発達と分化における γ 鎖の役割の解明に役立つものと思われる。

審査結果の要旨

本論文は、マウス IL-2 受容体 γ 鎖遺伝子を単離し、その構造と機能を解析したものである。

IL-2 は免疫系で重要な役割を果たしているサイトカインで、細胞表面上の特異的受容体を介して細胞内へシグナルを伝達する。従来この受容体の構成成分として少なくとも α 鎖と β 鎖の 2 つの異なるサブユニットの存在が知られていた。最近本論文提出者らは IL-2 の結合親和性を規定する第 3 のサブユニット、 γ 鎖の存在をヒト T 細胞で証明し、その遺伝子を単離することに成功した。この γ 鎖の機能、特に造血系細胞の発生と分化における生体内での役割をヒトの系で解析するには制限がある。そこで解析の容易なマウス実験系の確立を目指し、本研究ではマウス γ 鎖遺伝子の単離を行なった。ヒト γ 鎖遺伝子をプローブとしてクロスハイブリダイゼーション法によりマウス IL-2 依存性 T 細胞株 CTLL-2 cDNA ライブラリーからマウス γ 鎖 cDNA を得た。マウス γ 鎖とヒト γ 鎖を比較したところ、核酸で 80%、アミノ酸で 70% の相同性を有していた。マウス γ 鎖 cDNA がコードする蛋白質は 369 アミノ酸からなりヒトと同じであった。しかし、細胞外領域がヒトより 1 アミノ酸長く、細胞内領域が 1 アミノ酸短くなっていた。細胞外領域には 4 つの保存されたシステイン残基と Trp-Ser-X-Trp-Ser (WS) モチーフがありサイトカインレセプターファミリーに属している。細胞内領域には既知のキナーゼドメインは認められないものの、リン酸化蛋白と会合できる可能性のある *Src* 相同性領域 2 (SH2) の一部と類似した構造がヒト γ 鎖と同様にみられた。このマウス γ 鎖遺伝子の機能を検討するために IL-2 受容体の発現のないマウス線維芽細胞を用いて遺伝子導入実験を行なった。その結果この γ 鎖が IL-2 受容体の IL-2 結合親和性を規定し、IL-2 インターナリゼーションにも必須であることが明らかとなった。マウス γ 鎖 mRNA の発現を種々の細胞株および臓器で検討した。 γ 鎖はリンパ球系細胞に発現しているのに対し、線維芽細胞では γ 鎖の発現を認めなかった。また脾臓、胸腺および肺で γ 鎖が発現しており、ConA 刺激で脾臓、胸腺細胞での γ 鎖 mRNA の増加が認められた。

本研究はマウス IL-2 受容体 γ 鎖遺伝子を単離し、その機能を解析したもので、マウス IL-2 受容体の全体像を明らかにした成果は高く評価できる。従って本論文を博士号授与に値する研究とみなす。