

論文の内容の要旨

氏名：砂 川 恵 伸

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：多量体免疫グロブリン受容体の構造と機能 その変異と分泌効率との関連

【背景】

多量体免疫グロブリン受容体 polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) は、I型の膜貫通型タンパク質で、腸管上皮細胞に表出される。その細胞外部位である domain 6 は上皮細胞膜上のタンパク分解酵素により切断され、分泌型免疫グロブリン (pIgs) として pIgR と一緒に、または pIgs 非結合型の free secretory component (fSC) として放出される。この酵素的切断部位の点突然変異は、種々の疾患と関与するとされているが詳細不明である。

【目的、研究に使用した培養細胞と方法】

pIgR における domain 6 の 580 番目の Ala から Val への置換は、pIgR の上皮内輸送の効率を低下させ、pIgR の機能低下の可能性が示唆されている。本研究では、pIgR の細胞外 domain 6 における酵素切断に関与する種々の mutant を作製し、mutation を起こして分泌能の上昇・低下を検討した。これにより pIgR の細胞外 domain 6 における酵素切断に関与する部位を明らかにすることを目的とした。

培養細胞には、Chinese hamster ovary (CHO) cell を使用した。抗体は非標識化抗体、ないしは horseradish peroxidase (HRP) -conjugated rabbit anti-human SC antibody (Ab) (DAKO, Tokyo, Japan)、HRP conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (Jackson ImmunoResearch, Tokyo, Japan) を用いた。

ヒト pIgR cDNA EcoRI 断片を発現ベクターに挿入し、このプラスミドから種々の mutant を作製した。Transfection and metabolic labelling は、培養細胞に recombinant vaccinia virus を infection させた。Transfection 後に、metabolic labelling した細胞培養上清および細胞溶解液を回収し免疫沈降を行った。

pIgR の domain 6 における各 mutant を stable transfection させ作製し、各プラスミドを CHO 細胞に Lipofectamine plus reagent を用いて、transfection した。単一のクローンを得るために、限界希釈法 limiting dilution を用いた。

また ELISA を用いて、rabbit anti-human SC antibody でコーティングインキュベーションし、培養上清または細胞溶解液に対して、HRP 標識 rabbit anti-human SC antibody で反応させ、吸光度測定し分泌効率を判定、統計解析を行った。

【結果】

ヒト pIgR の酵素的切断部位で、580 番目の Ala から Val への置換、606 番目/607 番目の Glu から Ala に置換、高度保存領域 9 アミノ酸の各 mutation は、pIgR の酵素的切断には全く影響しないことが分かった。

一方、上記の保存領域 9 アミノ酸に隣接する N 末端側 10 アミノ酸を欠損させた mutant と C 末端側 10 アミノ酸を欠損させた mutant は、pIgR の酵素的切断には逆の効果があることが明らかとなった。つまり N 末端側を欠損させた mutant では pIgR の酵素的切断は増強、C 末端側の 10 アミノ酸を欠損させた mutant は pIgR の酵素的切断は抑制を示した。

【考察および結語】

pIgR は、分子内の様々な部位が酵素的切断部位に対して、異なる機能を担っている可能性が示唆された。種の間で高度に保存されたアミノ酸領域は、9 アミノ酸とそれに隣接するアミノ酸は、pIgR の酵素的切断においては重要な役割をしていると考える。