



Molecular Cloning of The Murine Homologue of CD63/ME491 and Detection of Its Strong Expression in The Kidney and Activated Macrophages

宮本, 元

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1263

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001263>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	宮本	元	(兵庫県)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)		
学位記番号	博い第892号		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位授与の日付	平成6年3月31日		
学位論文題目	Molecular Cloning of The Murine Homologue of CD63/ ME491 and Detection of Its Strong Expression in The Kidney and Activated Macrophages (マウスCD63/ME491抗原相同体のクローニングおよび腎臓と 活性化マクロファージにおける高度発現)		
審査委員	主査教授 本間守男 教授 中村肇 教授 高井義美		

論文内容の要旨

<緒言>

ME491抗原はヒトメラノーマ関連抗原として堀田らにより初めてクローニングされた。この抗原は4箇所の膜貫通部位を持つ膜糖蛋白で、カルボキシ末端とアミノ末端の両方が細胞質内に出ている。この構造的特徴は、腫瘍関連抗原CO-029、抗増殖抗原TAPA-1、吸虫表面抗原Sm23などの細胞表面分子と共通しており、一つのジーン・スーパーファミリーに分類されている。

最近、ヒト血小板活性化マーカーであるCD63がクローニングされ、ME491 cDNAと相同であることが分かったので、以下はCD63と表記する。更に最近、組織球のマーカーAD1がラットにおけるCD63相同体であり、アミノ酸レベルの相同性は78%であることも報告されている。

多くの種類の細胞は培養系において増殖し始めるとCD63抗原を発現することが分かっている。しかしながらCD63抗原の発現は単に細胞の増殖に伴うものではなく、例えば転移性の悪性黒色腫では発現の見られないことが多い。従ってこの抗原の発現は特定の細胞においては発生や分化に伴っていることが予想される。ヒトの成長に伴う変化を調べるのでは組織標本が得られにくいため、我々はマウスにおけるCD63抗原相同体(Mu-CD63)の解析を行ってこの点を追及することにした。

本研究において我々は、Mu-CD63 cDNAのクローニングを行ってその塩基配列を決定し、成熟段階の違うマウスについて各種の組織におけるmRNAの発現を調べた。その結果としてMu-CD63はヒトCD-63と、特に細胞膜貫通部位と細胞質部位において、極めて高い相同体を有すること、およびこの発現は成熟マウスの腎臓と活性化マクロファージに強く認められた事を報告する。

<材料と方法>

1. マウスcDNAライブラリーのスクリーニング

マウスL929線維芽細胞のpoly(A)⁺mRNAから作られたcDNAライブラリーを、³²PラベルしたヒトCD63 cDNAをプローブに用いて弱い条件下でスクリーニングした。

2. DNAシークエンス解析

Mu-CD63 c DNAを適当な制限酵素にて切断し、生じたフラグメントをM13ベクターに挿入してSangerらのダイデオキシ法を用いて両方のストランドをシーケンスした。

3. マウスの組織と白血球

ICRマウス雌雄各1匹のマウスを交配させて得た胎仔と乳呑みマウスの組織を用いた。白血球として、胸腺および脾臓細胞を10%牛胎児血清添加 RPMI1640単独あるいはConcanavalin A (ConA) 10 μg/ml存在下で2日間培養した。

4. ノーザンプロット

マウスの組織と白血球からtotal RNAをグアニジニウムチオシアネートにて抽出し、セシウムクロライドにて超遠心した。5 μgのtotal RNAを1%アガロース／ホルムアルデヒドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロースフィルターに移した。泳動ゲルはエチジウムプロマイド染色を行い等量のRNAが各レーンに載っていることを確認した。フィルターは80°Cで2時間ベークした後、³²PラベルしたMu-CD63 c DNAをプローブとして、ハイブリ溶液中で42°C12時間ハイブリダイズした。その後フィルターは2×SSC/0.1% SDSにて室温でリノンスし、最終的には0.2×SSC/0.1% SDSにて55°Cで洗いを行った後、オートラジオグラフィーを行った。

＜結果＞

1. Mu-CD63 c DNAのクローニングとシーケンス

我々はすでにマウスのCD63ホモローグ遺伝子がCD63 c DNAとハイブリダイズすることを明らかにしてきた。このため我々は、L929細胞のc DNAライブラリーと同じプローブでスクリーニングして、 1.6×10^5 個のコロニーより十分な長さのインサートc DNAを持つクローニングを2個選び解析した。

一方のクローニングは714bpのオープンリーディングフレームおよびpoly(A)tailを含む878bpのMu-CD63 c DNAを含んでいた。他方はオープンリーディングフレームのアミノ末端側が18bp短くなっていたが、対応する部分は完全に一致した。Mu-CD63 c DNAの塩基配列はヒトCD63やラットのホモローグAD1と、特にオープンリーディングフレームに於てはそれぞれ81.8% (584/714), 94.1% (672/714)と極めて高い相同意を有することが分かった。

予想されるMu-CD63抗原のアミノ酸配列もヒトおよびラットのホモローグと極めて高い相同意を有する（それぞれ79.4%と95.4%）。細胞内部分と膜貫通部分は細胞外部分よりもずっとよく保存されていた。4箇所のN-グリコシレーション部位が2番目の細胞外部分に存在し、このうち3箇所はヒトおよびラットのホモローグと共に通じた。

2. 正常マウス組織におけるMu-CD63 mRNAの発現

日齢の異なるマウス組織からtotal RNAを抽出してMu-CD63 mRNAの発現を調べた。若い成熟マウスでは腎臓には強い発現が見られたが他の臓器では極めて弱いか検出不能であった。色々な日齢のマウスから腎臓を抽出して分析した結果、Mu-CD63 mRNAの腎臓における発現は胎仔に於ては弱く、成長と共に強くなっている、4週齢で最高となった。Mu-CD63 mRNAの発現は乳呑みマウスの肺や腸管にもある程度は認められたが、同じ成長程度の腎臓に比べると弱かった。

更に腎臓におけるMu-CD63 mRNAの発現を詳しく調べるために、腎臓よりSieving法を用いて糸球体を分離した。ノーザンプロット法にて解析した結果、Mu-CD63 mRNAの発現は糸球体において強いことが分かった。

3. 活性化または非活性化状態のマクロファージとリンパ球におけるMu-CD63mRNAの発現

細胞の活性化がMu-CD63mRNAの発現に与える影響について調べた。まずin vivoで腹腔内常在マクロファージと活性化マクロファージについて調べたところ、チオグリコレート刺激で腹腔内に滲出してきた細胞（約90%は活性化マクロファージの特徴を示す）はMu-CD63mRNAを強く発現していたが、腹腔内常在マクロファージはわずかにしか発現していなかった。

次に脾臓細胞と胸腺細胞を培養したものについて発現をみた。脾臓細胞においてはCon A存在下で培養することによって強いMu-CD63mRNAの発現が誘導された。しかし胸腺細胞においてはCon A存在の有無にかかわらず発現はほとんどみられなかった。

<考察>

Mu-CD63cDNAをクローニングし、塩基配列を決定した結果、予想されるアミノ酸配列はヒトのCD63と、特に細胞内部分と膜貫通部位においてほぼ同一と言える驚くべき高い相同意を示した。種を越えての保存の厳密さはこの分子の機能的な重要性を強く示唆するものである。CD63抗原にみられる15個のシステインと3箇所のN-グリコシレーション部位はすべてマウスにも保存されていて、機能を発現するためには適切な構造を取る必要があることが推測された。今回の研究において明らかになったように、細胞内部分と膜貫通部位が細胞外部分より種を越えてずっとよく保存されているという事実は、この部位に生理的活性部分が存在することを示唆していると思われる。

本研究ではMu-CD63mRNAは4週齢マウスの腎臓に強く発現し、成長に比例して発現も強くなった。更に腎臓を分画しての解析ではMu-CD63mRNAは糸球体に強く発現していた。ラットのCD63相同体も胎仔腎臓にある程度発現しているとの報告があるが、マウスにおいてはむしろ成体より少なかった。ヒトにおいては正常な腎臓細胞ではCD63抗原の発現はみられない。このような特徴をもつMu-CD63抗原のマウス腎臓における生理的役割は相同蛋白質のそれとは異なっていて、ラットやヒトの腎臓では他の蛋白がこの役割をはたしているのかも知れない。

in vivoで、腹腔内常在マクロファージはMu-CD63mRNAをわずかしか発現しないが、刺激で滲出してきたマクロファージは強く発現する。脾臓細胞もCon A存在下で培養するとMu-CD63を強く発現する。その一方で胸腺細胞はCon A存在下で培養してもほとんど発現しない。まとめると、活性化マクロファージはMu-CD63mRNAを強く発現するが、Tリンパ球は増殖の如何にかかわらず発現しないことになる。この結果は、CD63抗原の発現はある種の細胞の成熟や分化と密接に関連していることを示している。

論文審査の結果の要旨

申請者の共同研究者である堀田らによってクローニングされたヒトメラノーマ関連抗原ME491抗原と、ヒト血小板活性化マーカーであるCD63抗原が同一であることが、最近になって明らかにされた。そこで今後はCD63抗原の名称を用いるが、この抗原は4箇所の膜貫通部位を持つ膜糖蛋白である。この構造的特徴は、腫瘍関連抗原CO-029、抗増殖抗原TAPA-1、吸虫類表面抗原Sm23などの他の細胞表面分子と共通しており、一つのジーン・スーパーファミリーに分類されている。しかしその機能に関しては未だ不明である。

これまでの研究で多くの種類の細胞が培養系におかれて増殖し始めるとCD63抗原を発現することが分かっている。しかしながらCD63抗原の発現は単に細胞の増殖に伴うものではなく、例えば転移

性の悪性黒色腫では発現の見られないことが多い。従ってこの抗原の発現は特定の細胞においては発生や分化に伴っていると考えられる。申請者は以上の研究結果より、成長に伴うCD63抗原の発現の変化を調べることによりこの抗原の機能に迫れるのではないかと考えた。人間の組織標本は得られにくいために申請者はマウスにおけるCD63抗原の相同体 (Mu-CD63) の解析を行った。

成 績

1. Mu-CD63 cDNAのクローニング

マウスL929細胞から作られたcDNAライブラリーを、³²PラベルしたヒトCD63 cDNAをプローブに用いてスクリーニングした。Mu-CD63 cDNAの塩基配列をダイデオキシ法にて解読したところ、ヒトCD63と、714 bpからなるオープンリーディングフレームに於ては81.8% (584/714) と極めて高い相同性を有することがわかった。予想されるMu-CD63抗原のアミノ酸配列もヒトと極めて高い相同性を有する (79.4%)。種を越えての保存の厳密さはこの分子の機能的な重要性を強く示唆するものである。特に細胞内部分と膜貫通部位においてはほぼ同一と言える驚くべき高い相同性を示したことは、ここに生理的活性部分が存在することを示唆している。従って膜貫通部位が細胞膜を貫通するチャンネルを形成することも考えられる。CD63抗原にみられる15個のシスティンと3箇所のN-グリコシレーション部位はすべてマウスにも保存されていて、機能を発現するには適切な構造を取る必要があることも推測された。

2. 正常マウス組織におけるMu-CD63 mRNAの発現

マウスの組織と白血球からtotal RNAをグアニジニウムチオシアネートにて抽出し、ノーザンプロット法を用いて解析した。若い成熟マウスでは腎臓には強い発現が見られたが他の臓器では極めて弱いか検出不能であった。腎臓においては成長に比例して発現も強くなった。更に腎臓を分画しての解析では糸球体に豊富に発現していた。ヒトでは正常な腎臓組織ではCD63抗原の発現はみられない。このような特徴をもつMu-CD63抗原のマウス腎臓における生理的役割は相同蛋白質のそれとは異なっていて、ヒトの腎臓では他の蛋白がこの役割をはたしている可能性がある。

3. 活性化状態のマクロファージとリンパ球におけるMu-CD63 mRNAの発現

マクロファージは腹腔内をPBSで洗うことによって得た。チオグリコレート刺激で腹腔内に滲出してきた活性化マクロファージはMu-CD63 mRNAを強く発現していたが、腹腔内常在マクロファージはわずかにしか発現していなかった。脾臓細胞も ConA 存在下で培養するとMu-CD63 mRNAを強く発現するが、Tリンパ球は増殖の如何にかかわらず発現しないことになる。この結果は、CD63抗原の発現はある種の細胞の成熟や分化と密接に関連していることを示している。

本実験はCD63抗原が種を越えて保存されており、なんらかのチャンネルのような重要な機能をもっている可能性を示した。マウス糸球体における強い発現もこれを支持するデータであろう。更にはこの抗原が単に増殖に伴って発現するものではなく、マウス腎臓においては成長に比例して発現も強くなったように、ある種の細胞の成熟や分化に関係するものであることを示唆した。これらは、CD63抗原の生理的な意義を解明するうえで価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。