T細胞由来のリンフォカインをコードする遺伝子の クローニングと遺伝子発現**

Cloning, Expression and Characterization of T-cell Derived Lymphokine Genes

宮 島 篤*	横 田 崇*	武 部 豊*
ATSUSHI MIYAJIMA, Ph. D.	TAKASHI YOKOTA,	YUTAKA TAKEBE,
大 塚 毅*	新 井 直 子*	新 井 賢 一*
TAKESHI OHTSUKA,	NAOKO ARAI,	KENICHI ARAI,

免疫応答に関与するリンフォカインのうち、とくに筆者らがその遺伝子クローニングに成功した IL-4 遺伝子の解析を通じ、各種の細胞から産生されるリンフォカインの分子遺伝学的解析に関して解説した。

索引用語: リンフォカイン, IL-4, DNA, IL-3

Key words: lymphokine, IL-4, DNA, IL-3

抗原によるヘルパーT細胞の活性化機構は、T細胞受容体を介するシグナルによる各種リンフォカインの産生と、これらのリンフォカインによる標的細胞の増殖と分化の促進という二つの過程に分けることができる。われわれは各々のリンフォカインの持つ生物学的活性とその生理的意義、各種リンフォカインの遺伝子発現の制御機構、そしてリンフォカインの標的細胞での作用機構という点に興味をもっている。

これらの問題を解明するために、まず各種リンフォカイン遺伝子のクローニングとその構造解析を行い、さらに遺伝子組み換えの技術を用いて、種々の宿主ベクター系において、その産物を調整してきた。今回はわれわれにより単離された新しいリンフォカインIL-4を中心に、T細胞由来リンフォカイン遺伝子のクローニングと、それらの発現につ

いて述べる。

IL-4 cDNA のクローニングには、Okayama と Berg の開発した pcD 動物細胞発現ベクターに作製した活性化T細胞 cDNA ライブラリーを、COS 7 サル細胞にトランスフェクションして、その培養液中のリンフォカイン活性を測定するという方法を用いた (図1)。

この方法により、われわれはすでにT細胞増殖因子である IL-2、多能性幹細胞に作用して各種造血系細胞の増殖と分化を促進する IL-3、顆粒球・マクロファージのコロニー形成を促進する GM-CSF、そしてインターフェロン γ 等の cDNA の単離を行った。こうして得られた cDNA をプローブとした mRNA の解析、およびコンビナントリンフォカインを用いた実験から、ある種のマウスヘルパーT細胞 (D9細胞) は、IL-2、IL-3 とは異なる T細胞増殖因子活性 (TCGF II)、肥満細胞増殖因子活性 (MCGF II) をもつリンフォカインを産生していることが明らかになった。また、このT細胞は同時にB細胞増殖因子活性 (BSF-1) をも産生する。そこで、D9細胞の cDNA ラ

---

* カリフォルニア・DNAX 分子細胞生物研究所
DNAX Research Institute of Molecular and
Cellular Biology, Palo Alto, California, U.S.A.

** 第238回順天堂医学会学術集会 [Sept. 18, 1986]
(Oct. 30, 1986受付)

図1 発現ベクターを用いたリンフォカイン活性を持つ遺伝子のクローニング

ライブラリーから、これらの活性を指標として cDNA の単離を行った。こうして得られた単一の cDNA クローンは、TCGF と MCGF の両方の活性をもち、さらに、B細胞に作用して Ia 抗原産生を誘導する BSF-1 活性をもっていた¹⁾。この結果は、高度に精製された MCGF II は TCGF II 活性を示し、さらに Ia 抗原誘導活性をももっているという結果とも一致し、単一のタンパク質が、MCGF, TCGF, そして BSF-1 の活性をもつものと結論された。この cDNA クローンの構造は、本庶ら²⁾が IgG₁ 産生促進活性を指標として独立に単離した cDNA の構造とも一致した。このように一つのタンパク質が広範な生物学的活性を示すことから、われわれはこのタンパク質をインターロイキン 4 (IL-4) と呼ぶことを提唱している。マウス IL-4 cDNA は、シグナル配列を含む

140アミノ酸をコードし、三つの N-結合型糖鎖付加部位がある。このマウス IL-4 cDNA をプローブとしてヒト IL-4 cDNA が、ヒト株化 T 細胞および末梢血リンパ球 cDNA ライブラリーから単離された³⁾。この cDNA はシグナル配列を含む 153アミノ酸をコードする。マウスとヒト IL-4 のアミノ酸配列は、中央の約 40アミノ酸を除いて高い相同性が認められる。COS 7 細胞で発現されたヒト IL-4 は、ヒト株化 T 細胞、および抗 IgM 抗体で活性化したヒト B 細胞の増殖を促進し、さらに、B 細胞の Fcε 受容体の発現、クラス II 抗原 DR の発現を促進する活性をもつ。表 1 にマウスおよびヒト IL-4 で見いだされた生物学的活性を示す。マウス IL-4 で認められた IgG₁, IgE の産生促進活性、MCGF 活性はヒト IL-4 ではまだ確認されていない。

こうした広範な IL-4 の生物学的活性は、活性化されたある種の T 細胞が、IL-4 の産生を通して、B 細胞や T 細胞だけでなく、肥満細胞やマクロファージなどの造血系細胞をも刺激し、その両者の機能的な連関を調節する役割をもつことを示唆する。さらに、抗原刺激により活性化された T 細胞は、IL-4 以外に IL-3 や GM-CSF などのコロニー形成促進因子 (CSF) を産生することが知られているが、T 細胞由来の CSF は生体に異物が侵入した際の急性炎症反応部位近傍で、各種の造血系幹細胞群を急速に増殖分化させるための、緊急

表1 IL-4 のもつ生物学的活性

		マウス	ヒト
T細胞	TCGF	+	+
B細胞	BCGF	+	+
	クラスII抗原発現誘導	+	+
	IgG ₁ 産生誘導	+	?
	IgE産生促進	+	?
	Fcε受容体発現	+	+
造血系細胞			
	MCGF	+	?
	CSF	?	?

装置としての役割を果たすものと思われる。

緊急装置としてのリンフォカインは一過性に誘導され、レクチン等でT細胞を刺激すると急速に産生され、速やかに元のレベルへ戻る。IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IFN- γ いずれの場合も、mRNA量は刺激後約6時間後にピークがみられる。T細胞の活性化の際のリンフォカイン誘導の機構を調べるため、まず各種リンフォカインのゲノム遺伝子の構造解析を行った。IL-3遺伝子は5つのエクソンより成る。第2イントロンの中には、72塩基対よりなる繰り返し配列が見い出されるが、この配列はエンハンサーのコア配列と類似している。また、5'上流領域にはGCに富む配列が存在しており、この領域はさらにGM-CSFの5'上流領域とも若干の類似性が認められる。ヒトとマウスのGM-CSF遺伝子の構造はよく似ているが、特に5'上流領域は90%以上の相同性を示している。同様に、IL-4の5'上流領域にもヒトとマウスで非常に高い相同性がみられる。また、IL-2とIL-4の5'上流領域にも若干の相同性が認められている。このように種間で保存されている5'上流領域やその他の特徴的塩基配列がリンフォカインの遺伝子の発現にどのように関与するのか、という点については現在検討中である。

純化されたリンフォカインを用いてその生物学的活性や作用機構を研究するために、リンフォカインcDNAクローンを種々の宿主ベクター系を用いて発現させ、精製の出発材料とした。動物細胞においては、ウシバビローマウイルスを用いたベクターにIL-3 cDNAを組み込み、IL-3を構成的に産生する線維芽細胞を得た。また、Epstein-Barrウイルスを用いたベクターにIL-4 cDNAを導入することにより、COS 7細胞を用いた一過性発現において高い活性を得た。こうした方法によりIL-3, IL-4を精製した。さらに、われわれは酵母の α 因子分泌シグナルを用いた分泌型発現ベクターを開発し、IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSFなどを発現したが、特にGM-CSFは大量に分泌され精製することに成功した。さらに、酵母により産生されたマウスGM-CSFには、動物細胞に

おける糖鎖付加部位に糖鎖が付いていることが示された。前田らは蚕のもつ高いタンパク質合成能を利用して、多角体ウイルスを用いた発現ベクターを開発した。このベクターにIL-3 cDNAを組み込み、蚕の培養細胞および幼虫に感染させることにより、COS 7細胞での発現に比べ蚕培養細胞で約200倍、幼虫の体液では約20,000倍もの活性が認められた。

こうして種々の発現系で得られたリンフォカインを用いて、その作用機構の生化学的研究を開始した。PDGF, FGF等は細胞に結合した後、ホスホリパーゼCを活性化することにより、2次メッセンジャーを出すことが知られている。リンフォカインの作用機構を知る上で、まずどのようなシグナルが伝達されるのかという点について調べた。造血系細胞の中には、複数のリンフォカインに反応するものが多数知られている。われわれは、IL-3, IL-4, GM-CSFに反応する肥満細胞様細胞株を用いて、 ^{32}P のイノシトールリン脂質への取り込みを調べたところ、IL-3を加えたときのみ ^{32}P の取り込みが増加することを観察した。このことは、IL-3がホスホリパーゼCを介してC-キナーゼ、 Ca^{2+} 系に作用する可能性を示唆している。

今後は、さらにこのような生化学的研究を進めて、IL-3, IL-4, GM-CSF等の作用機構を明らかにして行きたいと考えている。

参考文献

- 1) Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Meyerson, P., Villaret, D., Coffman, R., Mosmann, T., Rennick, D., Roehm, N., Smith, C., Zlotnik, A., and Arai, K.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **83**: 2061~2065, 1986
- 2) Noma, Y., Sideras, P., Naito, T., Bergstedt-Lindquist, S., Azuma, C., Severinson, E., Tanabe, T., Kinashi, T., Matsuda, F., Yaoita, Y. and Honjo, T.: Nature, **319**: 640~646, 1986
- 3) Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchemreau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., DeVries, J., Lee, F., and Arai, K.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **83**: 5894~5898, 1986