

胸腺に発現する新しいクラス Ib 分子

— 多抗原性ペプチド (MAP) 及び大腸菌組換え蛋白を用いた特異的抗体の作成 —

沈 敏 松 浦 晃 洋

札幌医科大学医学部病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Characterization of a Novel Class Ib Molecule of the Rat

— Preparation of Specific Antibodies with the Multiple Antigen Peptide System
and a Recombinant Protein Produced by the Prokaryotic Expression System —

Min Shen and Akihiro MATSUURA

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical University, School of Medicine

(Chief: Prof. K. KIKUCHI)

ABSTRACT The functional significance of class Ib MHC genes and their products is still enigmatic, but they show structural similarity to classical transplantation antigens in that they are composed of three extracellular domains: a peptide binding domain, an immunoglobulin supergene family constant (Ig-C) domain and a noncovalently linked $\beta 2m$. We have isolated class I cDNA clones from a rat thymus cDNA library. In this study, we selected a novel cDNA clone containing unique nucleotide sequences based on partial nucleotide sequences. Specific antibodies against the class Ib molecule were produced using two methods, a synthetic multiple antigenic peptide (MAP) system, and injections of a recombinant protein made by a prokaryotic expression system. The antibodies reacted specifically with the immunogens and with cultured cell lines transfected with the relevant cDNA in mammalian expression vectors. In normal rat tissues and cells, this novel class I molecule was expressed primarily by the cells in the thymus. A possible functional significance of the thymus specific class Ib molecule is discussed.

(Received April 10, 1995 and accepted May 9, 1995)

Key words: MHC, Class Ib, Multiple antigenic peptide, Recombinant protein

1 緒 言

主要組織適合抗原複合体 major histocompatibility complex (MHC) は移植片拒絶を支配する遺伝子領域として見いだされた^{1,2)}. chromosomal walking により MHC 染色体領域の物理的地図が作成されるにつれ, 古典的移植抗原遺伝子(クラス Ia, マウスでは H-2K, D, L, ヒトでは HLA-A, B, C) 以外に類似した配列を有するクラス I 様遺伝子(クラス Ib) が多数存在することが明らかになった. 最近では $\beta 2m$ と結合するクラス I 様構造を有するものを, MHC との連鎖の如何にかかわらず, クラス Ib として整理しようという動きがある³⁾. しかしながら, その多くは転写産物・蛋白産物の有無すらも不明である^{4,5)}. 我々はクラス Ib 遺伝子およ

びその産物の構造, 発現, 生物学的機能を明らかにすることを目的として, 特に胸腺に発現することが知られているマウス TL 抗原, 及びヒト CD1 抗原のラットにおける相同遺伝子について解析してきた^{6,7,8)}. さらにラット胸腺で転写されている cDNA クローンを多数単離し, 部分塩基配列を解析中であるが, その中に現在まで報告されているクラス Ib と類似性に乏しい配列を持つ RH104 クローンを見いだした(文献 9 及び未発表結果). 今回我々は 2 種類の方法により RH104 特異的抗体の作成を試み, この新しいクラス Ib 蛋白産物の同定に成功したので報告する. 第一の方法は部分塩基配列から推定したアミノ酸配列に基づき合成した多抗原性ペプチド (multiple antigenic peptide; MAP) を用いる方法であり¹⁰⁾, 第 2 の方法は

により産生した組換え蛋白を用いる方法である¹¹⁾。新しいクラス Ib 分子の機能についても考察をしてみたい。

2 実験方法

2.1 使用細胞

2.1.1 ラット正常細胞

6週令から8週令のWistar/Smcラットを使用した。摘出した胸腺及び脾臓をスライドガラスで擦り潰し、phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.5) に浮遊させ不純物、組織片を取り除いた。脾臓細胞は比重1.092のFicoll-Conray液(9%Ficoll 400, Pharmacia)と30%DIP conray(第一製薬)に重層し、比重遠沈法にて細胞を回収し、洗浄後PBSに浮遊させた。

2.1.2 培養細胞

ラット胸腺上皮細胞株FTE, 胎児線維芽細胞株WFBを用いた。培養液として10%FCS, 2mL-glutamineを含んだMEM培養液を用いた。RH104cDNAインサートを哺乳類発現ベクターに組換えたRH/CDM8, RH/SRE組換え体クローンとpSV2neo^oをリン酸カルシウム沈殿法にて遺伝子導入してGeneticin(G418, Sigma, St. Louis, MO, 300生物学的単位/ml)で選択を行い形質転換細胞株を作成した。

2.2 多抗原性ペプチド (multiple antigen peptide, MAP) の作成と精製¹⁰⁾

MAPは一つの分子の中に複数のペプチドが並列的につながったものである。 β -アラニンにリジンを結合させ、その α と ϵ のアミノ基の両方にさらにリジンを導入するということを繰り返して作成したMAP骨格を持っている(Fig. 1)。通常は β -アラニンにリジンを3サイクル導入し、計8個のアミノ基にそれぞれ目的とするペプチドを導入していく(8-branch form)。この場合、アミノ酸残基10個のペプチドを導入すると、分子量は約9,000~10,000となり充分免疫原性をもつ抗原となる。これによりキャリアー蛋白質に結合させる手間を省くことができ、キャリアー蛋白質に対する余分な抗体の夾雑を回避できる。RH104cDNAの部分塩基配列から推定したアミノ酸配列の中から特異的ペプチド配列を選択し、MAP骨格を用いてペプチド合成装置(431A, Applied Biosystems, ABI)で目的のペプチドを延長した。Pam-resinの切断はエタンジチオールとチオアニソールにより行った。切り出したMAPペプチドは透析後、逆相HPLC(C18カラム)を用いて精製した。得られたMAPが正しく8本に枝分かれした

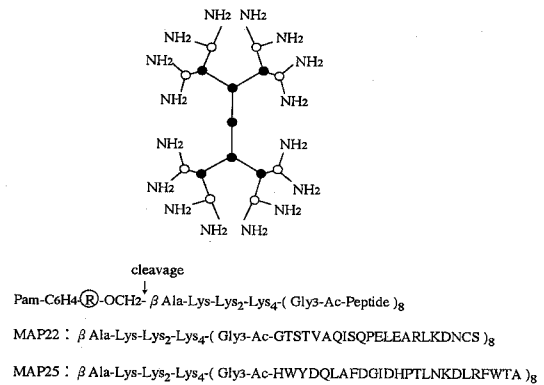


Fig. 1 Schematic representation of the core matrix of the MAP.

Fourth level, hexadecavalent, is shown. Amino acid sequences of synthetic peptides, MAP22 and MAP25.

目的どおりのものであることを確認するため、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)による分子量の測定とプロテインシーケンサー(477A, ABI)によるアミノ酸配列の解析を行った。

2.3 蛋白翻訳領域 DNA 断片の調整と発現ベクター組換え体の作成

RH104cDNA クローンの全塩基配列が未決定なので5'と3'の部分塩基配列をもとにDNA合成装置(391DNAsynthesizer, ABI)によりプライマーを合成した(Forward primer, N284: 5'-GGGGATCCCTG-CGGTATTTCTCC-3', N283: 5'-GGGGATC-CAGACCCCATGCTCTGG-3', Reverse primer, N285: 5'-GACAGGCTGGTACCTCTTTTA-3'). RH104インサートを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅したDNA断片をアガロース電気泳動により調整し、N284/N285断片は原核細胞発現ベクターpET3a, pET3b, pET3cのBamHI部位に組込んだ(RH284/pETまたはRH/pETと命名)¹¹⁾。組込んだインサートの方向を制限酵素地図により確認した。pETベクターは各々3つの異なる読み取り枠を用いるため、いずれか一つの組換え体のみが期待される分子量の蛋白を産生することになる。また哺乳類細胞発現用には、N283/N285増幅産物、及びRH104全長cDNAを各々CDM8, SRE発現ベクターに挿入した(RH/CDM8, RH/SREと命名した(Fig. 5)。

2.4 大腸菌組換え蛋白の発現と精製

2.4.1 組換え蛋白の発現

pET組換え体(RH284/pET3a)により形質転換し

た BL21 大腸菌を NZCYM 培地で培養し、OD (650 nm) が 0.6 になった時点で isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) を 1 mM になるように加えた。組換え蛋白の大腸菌内合成をみるため、IPTG 添加後経時的に培養株を採取し、sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol) に溶解後、100°C, 3 分間煮沸し、15% SDS-PAGE 後 Coomassie brilliant blue で染色した。

2.4.2 組換え蛋白の精製

RH284/pET3a 形質転換 BL21 を 500 ml の大量培養した。IPTG 誘導後、回収した菌ペレットを緩衝液 A (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 30 mM NaCl) で 2 回洗浄し、20 ml の緩衝液 A に懸濁し超音波で十分に破碎した。8000 rpm で 20 分間遠心後のペレットを 1 M 蔗糖 100 ml に懸濁し、8000 rpm, 20 分間遠心し封入体ペレットを得た。sample buffer に溶解し、15% SDS-PAGE 展開後 Coomassie brilliant blue で染色し、目的のバンドを切り出した。Electroelutor (Sample concentrator Model 1750, ISCO, NE), あるいは透析膜にてポリアクリルアミドゲルより組換え蛋白 (rRH284) を電気泳動的に溶出し、PBS で透析後吸光度を測定し蛋白濃度を算定した。

2.5 ポリクローナル抗体の作製

MAP ペプチド (MAP22, MAP25), 及び rRH284 組換え蛋白を各々 50~100 µg/kg を BALB/c マウスおよび New Zealand White rabbit (Charles-River) に免疫した。初回免疫は complete Freund アジュバントと、2 回目以降は incomplete Freund アジュバントと共に、家兎は皮下注射、マウスは腹腔内注射にて免疫を行った。得られた兎抗血清は飽和硫酸塩析法にて濃縮後、protein A Sepharose CL-4B カラム (Pharmacia) を用いて精製した。マウス血清は 50% glycerol 存在下で -70°C にて冷凍保存し使用時希釈して実験に供した。

2.6 ELISA

精製蛋白及びペプチドを ELISA 用 96 穴マイクロプレートに 0.5 µg/100 µl/ウェルずつ分注し、4°C, 18~20 時間反応させたあとで、0.1% Tween20/PBS で 3 回洗浄し 3% スキムミルク/PBS で 1 時間ブロックし 3 回洗浄する。抗体を室温にて 1 時間反応させ、3 回洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG, A, M 2 次抗体 1000 倍希釈液を 100 µl/ウェル加え、室温にて 15 分間反応させる。3 回洗浄後発色液を 50 µl/ウェル加え 15 分間反応させた後、ELISA マイクロプレートリーダー (Dynatech products, 490 nm) にて吸光度 (OD) を測

定した。

2.7 免疫蛍光抗体法

抗ラット RH104 ポリクローナル抗体の各種細胞との反応性を間接免疫蛍光抗体法により検討した。細胞表面の発現をみるためには生細胞を用い、 $0.5-2 \times 10^6$ 個の生細胞をペレットにし、50 µl の希釈抗体を加え、4°C 1 時間反応後 PBS にて洗浄し、次いで FITC 標識ヤギ抗マウスあるいはウサギ免疫グロブリン抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を混和し、4°C, 30 分間反応させ過量の PBS にて洗浄し、Fluorescence activated cell sorter (FACStar, Becton Dickinson) を用い判定した。陰性対照として、正常マウスあるいはウサギ血清を用いた。細胞質内発現をみるため、冷アセトン 1 分間固定後、0.1% Triton X-100/PBS にて洗浄した細胞を用いた。

2.8 免疫組織染色法

新鮮凍結切片を用いてアビジン-ビオチン複合体 (ABC) 間接酵素抗体法でおこなった。すなわち 4 µm に薄切した凍結切片を風乾後アセトン固定を行い、一次抗体 (200~800 倍希釈) と室温で 2 時間反応させた。PBS にて洗浄後、ビオチン標識二次抗体と室温で 1 時間反応させ、洗浄後ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと室温 30 分反応させ、DAB にて発色した。核染にはメチルグリーンを用いた。

3 成 績

3.1 RH104 のコードするクラス Ib 分子特異的アミノ酸配列の同定

我々はラット胸腺に発現しているクラス I 遺伝子を cDNA クローニング法により多数単離した。遺伝子ごとの変異が豊富であると考えられている膜貫通領域 (エクソン 5) の塩基配列を決定した (文献 9 及び本田・松浦他未発表データ)。それらの一つ、RH104cDNA クローンは異なるクラス I 遺伝子間で保存されている細胞外 $\alpha 3$ ドメインをコードするエクソン 4 と良く似た配列を含むことからクラス I に属するものと結論された。しかしながら、現在まで知られている MHC クラス I 遺伝子とエクソン 5 のホモロジーが乏しく新しい遺伝子由来である可能性が考えられた。現在まで、エクソン 3, エクソン 4 を含む部分塩基配列を決定しているが、異なるクラス I 遺伝子間でもっとも保存されたエクソン 4 (細胞外 $\alpha 3$ ドメインをコードする) の読み取り枠に繋がるように、隣接するエクソン 3 相当部分の塩基配列から $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸配列を推定した (Fig. 2)。現在まで知られている他のクラス I との比較から、極め

```

RH104  DFHTLWQQCCVGSQGLLHWYQQLAFDQIDHEPTLWDLRFYAGTSTVANIQQ  MAP25  MAP22  PELEABLKDCSSELLQKYPKEREKELLIS
Pa      GS--I-SLS-E-----I--RG-S-P-Y-R-YIA-E--KT-A-ADFAAGITRWLELDGGAER-R-Y-EGE-Y-M-RR-L-LR--T---
RT1Aa  GS--I-SNT-----S--RG-R-D-F-R-YIA-E--KT--ADFAAGITRWLELDGGAER-R-Y-EGE-Y-M-RR-L-LR--T---
RT16   GS--I-SNT-----S--RG-R-D-F-R-YIA-E--KT--ADFAAGITRWLELDGGAER-R-Y-EGE-Y-M-RR-L-LR--T---
T3b(T1ab) GS--I-WY-E-EFF-S-FRA-R-HGY-R-YIA-E--KT--ADTAAGITRWLELDGGAER-R-Y-EGE-Y-M-RR-L-LR--T---
Q8b    GS----NY-----E--RG-L-F-YE-R-YIA-E--KT--ADMAAGITRWLELDGGAER-R-Y-EGE-Y-M-RR-L-LR--T---
H-2Db GS----QMS--L--M--RG-L-F-YE-R-YIA-E--KT--ADMAAGITRWLELDGGAER-R-Y-EGE-Y-M-RR-L-LR--T---
HLA-G  SS----NI--L-----RQ-R-Y-Y-K-YIA-E--S--ADTAAGITRWLELDGGAER-R-Y-EGE-Y-M-RR-L-LR--T---

```

Fig. 2 Comparison of deduced $\alpha 2$ domain amino acid sequences of various class I molecules. RH104 is a novel rat class Ib cDNA clone we have isolated. RT1A^a and H-2D^b is a rat and mouse classical class I gene, respectively. Pa and RT16 are rat class Ib genes. T3^b and Q8^b encodes the mouse TL and Qa-2 antigen, respectively. HLA-G is a human class Ib gene. Positions of RH104 specific peptides, MAP25 and MAP22 are indicated.

てユニークな配列を保有していることが見いだされた。

3.2 多抗原性ペプチド (MAP) の作成と精製

RH104 特異的な配列をもとに, Fig. 1 に示すような 2 種類のペプチド (MAP22, MAP25) を MAP 法により合成した。MAP 骨格レジンより切り出し, 逆相 HPLC 法により比較的広いピークとしてペプチドを分取・精製した。精製ペプチドを SDS-PAGE 展開すると分子量約 15000 のバンドがみられ (Fig. 3), これは一本鎖ペプチドの予想される分子量よりもかなり大きく, 枝分かれした 8 本鎖の MAP ペプチドが正しく合成されているものと推定された。さらにプロテインシーケンサーを用いてアミノ末端から 3 番目までのアミノ酸配列を決定したところ, 各々の MAP ペプチドのアミノ末端配列と一致することから, カルボキシル末端から合成開始された MAP ペプチド鎖が十分に伸長していることが確認された。

3.3 大腸菌による rRH284 組換え蛋白の発現と精製

最初に, 全長の RH104cDNA インサートに BamHI リンカーを接続し, 3 種類の pET3 ベクターを用いて作成した組換え体を作成した。方向も考慮し 6 種類について検討したが, いずれにおいても明らかな誘導蛋白の産生が認められなかった。これは 5' 非翻訳領域に停止コドンが含まれるためと推定された。そこで, インサート途中の部分塩基配列に基づき BamHI 制限酵素認識配列 (GGATCC) を付加した Forward primer, N284 と reverse primer, N285 を用いて翻訳領域を含むと思われる部分を PCR 法により増幅した。Fig. 4 に示すように, 約 1 kb のバンドが得られた。アガロース電気泳動にて増幅 DNA バンドを精製し, 一度 TA クローニングベクター pMOSBlue に挿入し (RH/pMOSBlue, Fig. 5a), BamHI で切断したインサートを大腸菌発現ベクター pET3a, pET3b, pET3c に挿入して

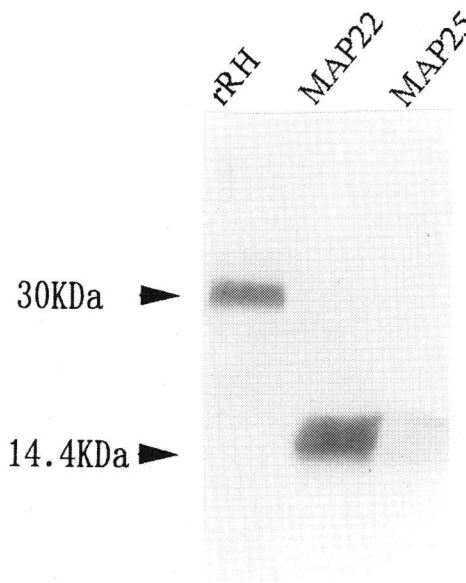


Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of purified recombinant RH284 (rRH284) protein, MAP22 and MAP25.

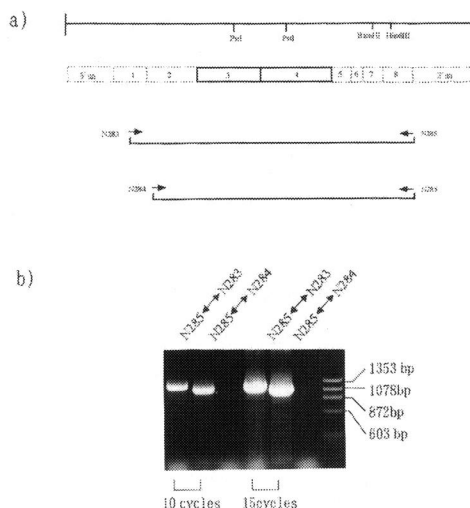


Fig. 4 Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the part of RH104 cDNA.

- Positions of primers, two forward primers (N283 and N284) and a reverse primer (N285), were shown beneath the cDNA.
- Amplified fragments after 10 cycles and 15 cycles were shown. DNA bands with 10 cycles of amplification were excised, eluted from the gel and subcloned into appropriate vectors.

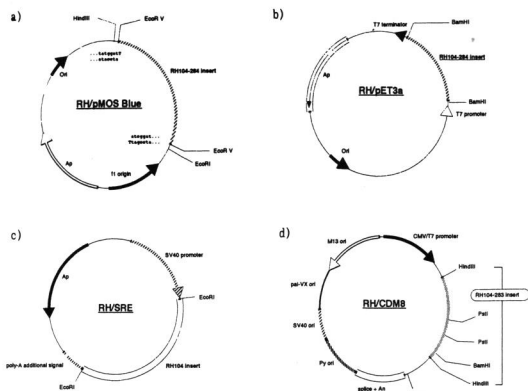


Fig. 5 Schematic representation of recombinant plasmids derived from RH104 cDNA.

- RH/pMOS Blue: PCR amplified fragment (N284/N285) in the TA cloning vector (pMOS Blue).
- RH/pET3a: Bam HI fragment of RH104 was subcloned into the prokaryotic expression vector system, pET3a, 3b and 3c, for recombinant protein production.
- RH/SRE: RH104 EcoRI insert was subcloned into the mammalian expression vector, SR α .
- RH/CDM8: N283/N285 amplified fragment in the mammalian expression vector, CDM8.

RH/pET 組換え体を作成した (Fig. 5b). 各々の組換え体で発現用大腸菌株 BL21 を形質転換し, IPTG 添加後経時的に細胞を回収し作成した lysate を SDS-PAGE にて展開した. Fig. 6 に示すように, pET3a ベクターのみでは認められないが, 同ベクターに増幅 DNA を組込んだもの (RH/pET3a) では IPTG 添加後分子量約 30,000 の新生蛋白が経時的に誘導された. 他の読み取り枠の pET3b, pET3c, 及び全てのベクターについてインサートの向きが逆方向の組換え体についても検討したが, 分子量 10,000 以上の新生蛋白は観察されなかった. pET に組込んだインサートの長さが約 1000 bp で, 最大で約 330 個のアミノ酸からなる蛋白をコードでき, その場合アミノ酸の加重平均分子量 110 を考慮すれば, 約 36,000 の分子量を持つ蛋白となる. これは RH/pET3a で観察された新生蛋白の分子量と近似している. これらのことから, RH/pET3a によって産生される組換え蛋白は生体内の自然な RH104 分子の一部を含むと考えられた.

RH/pET3a-BL21 を大量培養, IPTG で組換え蛋白誘導後, 封入体を精製し, さらに SDS-PAGE にてより純度の高い組換え蛋白 (rRH284) を分離・精製した (Fig.

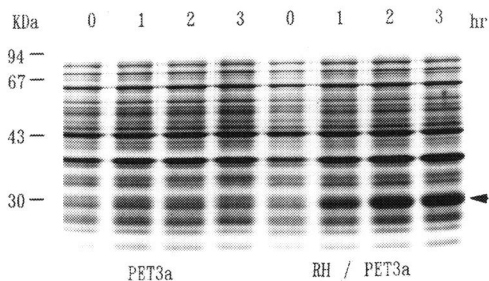


Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins induced in *E. coli*. The BL21 cells transformed with the pET plasmid without (pET3a) or with insert (RH/pET3a) were cultured with 1mM IPTG and harvested at 0, 1, 2, and 3 hours sequentially. Total cellular proteins were electrophoresed in a 15% acrylamide gel and was stained with Coomassie brilliant blue. The positions of induced protein are denoted by an arrowhead.

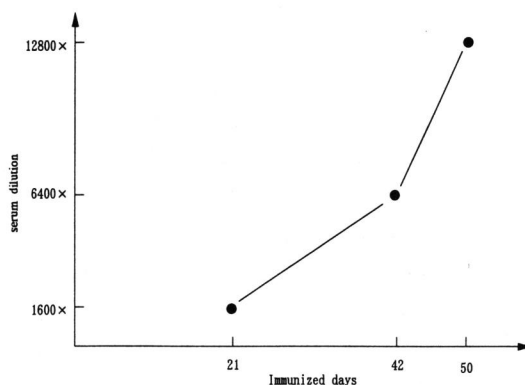


Fig. 7 Serum titer of anti-MAP22 antiserum. Titer was determined by ELISA. Serum dilution yielding OD 0.7 were plotted.

3 レーン rRH).

3.4 MAP ペプチド及び組換え蛋白に対する抗体の作成

前述の MAP 法により作成したペプチド及び精製 rRH284 蛋白をマウス及びウサギに免疫した. ペプチド免疫に通常用いられるウシ血清アルブミン (BSA) や KLH キャリヤー蛋白は使用しなかった. 2 週間隔で免疫し, 免疫後 2, 3 日後に採血し, ペプチド, 組換え蛋白をコートしたプレートを用い ELISA にて血清抗体価を測定した. Fig. 7 に示すようにウサギ 3 回免疫後, 通常の免疫方法と比較すると免疫回数の少ない時点にもかかわらず, 十分な抗体価の上昇が観察されたので, 抗体価の上昇した個体より血清を採取した. 抗 MAP22 抗

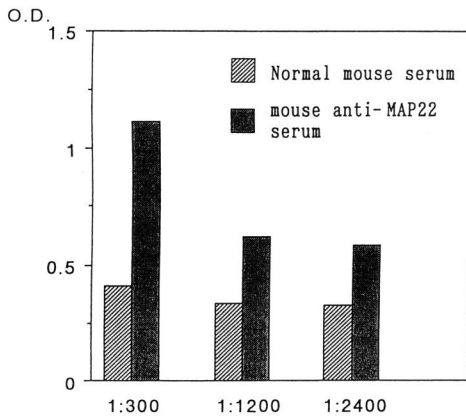


Fig. 8 Reactivity of specific antisera with recombinant rRH284 protein.

体は免疫原の MAP22 ペプチドのみならず, rRH284 組換え蛋白とも強く反応した (Fig. 8)。また両抗体は読み取り枠をずらした pET3b 及び pET3c での組換え体の lysate とは反応を示さなかった (data not shown)。このことから, rRH284 組換え蛋白は MAP22 に一致するペプチド配列を確かに含むこと, 即ちクラス I の読み取り枠を用いた蛋白であると結論された。精製 rRH284 蛋白のアミノ酸配列の決定により, 実際の蛋白読み取り枠の確認を試みたが, 十分量のサンプルを用いてもエドマン分解にてピークが検出されず, アミノ末端が何らかの翻訳後修飾を受けブロックされているものと考えられた。また, 抗 MAP25 抗体は抗体価が十分に上がっていませんでしたので, 今回の解析からは除外した。

3・5 抗 MAP22 抗体・抗 rRH284 抗体による RH104 クラス IbcDNA 導入細胞株の FACS 及び免疫染

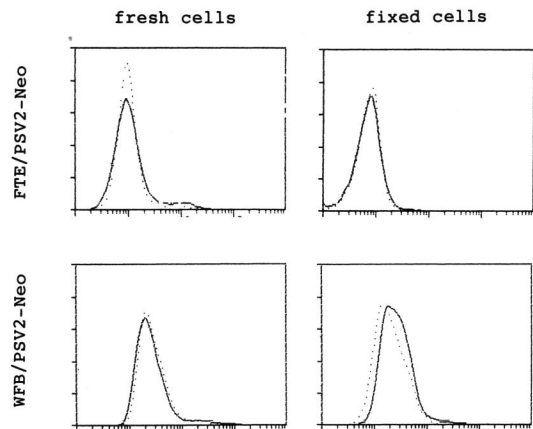


Fig. 9 FACS analysis of the reactivity of the anti-rRH284 antibody. Log fluorescence intensity is indicated on the abscissa and cell number on the ordinate.

Parental cell lines used for DNA transfection did not react with anti-rRH284 antibody. Fresh cells and acetone-fixed cells was used to detect cell surface expression and cytoplasmic expression, respectively.

色による解析

RH104cDNA はインサートの長さが約 1.8 kb で通常のクラス I 分子をコードするのにほぼ十分な長さを有するため, そのまま SR α 発現ベクターに組込んだもの (RH/SRE) を作成した (Fig. 5c)。また 5'末端が全長でない場合に備えて, 開始コドンである ATG (Met) を含む 5'プライマーと 3'プライマーを用いて PCR 法により RH104cDNA インサートを増幅し, CDM8 発現ベクターを用いて組換え体 RH/CDM8 を作成した (Fig.

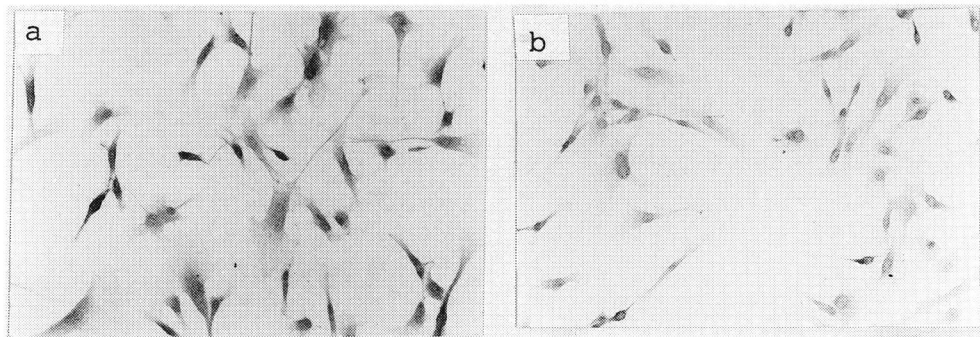


Fig. 10 Immunohistochemical staining of WR3, WFB cell line transfected with RH/SRE recombinant plasmid. The cells were stained with (a) anti-rRH284 antiserum (a) or normal mouse serum as negative control (b).

5d). 胎児線維芽細胞株 WFB 及び胎児胸腺上皮細胞株 FTE は細胞表面及細胞質内ともに抗 rRH284 抗体との反応性は陰性であったので (Fig. 9), 両組換え体をリン酸カルシウム沈殿法により遺伝子導入し形質転換細胞株を多数得た. 単離した元々の RH104 がクラス Ib 分子コード能があれば, クラス I の読み取り枠を用いて作成した MAP22 や rRH284 に対する抗体が形質転換細胞株と反応するはずである. FACS を用いた間接蛍光抗体法によっては細胞表面には陰性かあるいは極めて微弱な反応しか得られなかった. しかしながら, スライドガラス上で培養してアセトン固定したものを ABC 法にて免疫組織染色すると形質転換細胞株 (WR3) は抗 MAP22 抗体及抗 rRH284 抗体の両者により染色された. Fig. 10 に抗 rRH284 抗体での免疫染色を示す. このことから, RH104 はクラス I 様配列を持つ分子をコードすること, また細胞表面の発現は極めて弱く, 主に細胞質内 (おそらくは小胞体膜) に存在していることが示唆された.

3・6 正常組織における RH104 クラス Ib 分子の発現

RH104 は胸腺 cDNA ライブラリーから単離され, また RT-PCR 法により胸腺に mRNA 発現が強く他の臓器の発現はほとんど検出されなかったので, ラット胸腺細胞 (胸腺リンパ球) の免疫蛍光抗体法による FACS 解析を行った (Fig. 11). 未固定の新鮮細胞を用いた場合, 胸腺リンパ球及 T 細胞リンパ腫は陰性で, 細胞表面には発現していないと考えられた. アセトン固定すると, 両者とも弱陽性で, 細胞質内には少量発現しているものと結論された. 免疫組織染色による観察では,

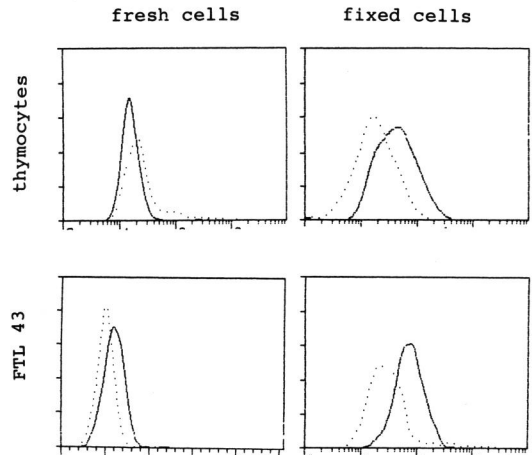


Fig. 11 FACS analysis of the reactivity of the anti-rRH284 antibody. Thymocytes and a thymic lymphoma cell line (FTL43), freshly isolated or acetone-fixed, were used for indirect immunofluorescence assay.

両抗体とも特に胸腺髄質及皮質の胸腺上皮細胞とその細胞質突起及び網状の線維成分が強陽性であった (Fig. 12). 胸腺リンパ球はいずれもほとんど反応が見られなかった. 発現量が極めて少ないと考えられ FACS 解析の結果と一致する所見であった. このことから, RH104 分子は生体内においては, 主に胸腺上皮細胞に発現するという極めて限局した組織分布を示すユニークな分子であると考えられた.

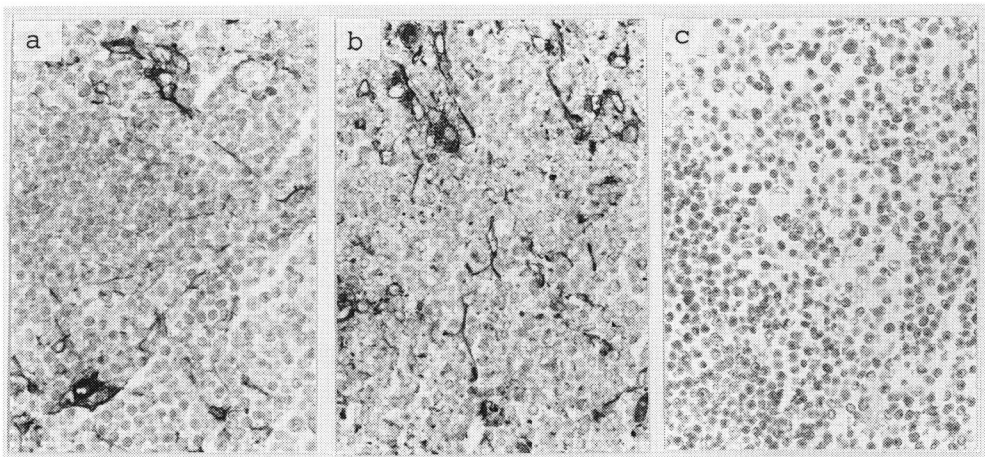


Fig. 12 Immunohistochemical staining of rat thymus with (a) anti-rRH284 antibody, (b) anti-MAP22 antibody and (c) normal mouse serum.

4 考 察

4.1 未知クラス Ib 分子に対する抗体の作成法について

RH104 は様々な MHC クラス I 遺伝子間で極めて良く保存された $\alpha 3$ ドメインをコードするエクソン 4 を含むことからクラス IcDNA クローンとして単離したものであるが、エクソン 5 やエクソン 3 のシーケンスが現在まで知られているクラス I とはかなり異なっていることから、新しいクラス Ib 遺伝子に由来するものと考えた。しかしながら、クラス Ib 遺伝子は多くの偽遺伝子が存在することが知られており^{4,9)}、単離された cDNA が転写された偽遺伝子産物であったり、ライブラリー作成の際のアーティファクトである可能性も否定しきれない。それ故に、こういったクラス Ib cDNA が真に生体内において蛋白として翻訳・発現されているかどうかという点については、塩基配列の決定のみでは十分とは言えない。我々は全塩基配列が決まっていない未知の分子の解析を効率良く短時間で行うことを試みた。部分塩基配列に基づき合成した多抗原性ペプチドに対する抗体と cDNA インサートの一部を用いて産生した組換え蛋白に対する抗体を作成し、両抗体がお互いに他方の免疫原と反応するか否かを検討する。さらに、抗体の反応性を、発現ベクターにて遺伝子導入した細胞株や mRNA を発現する細胞・組織について検討対象とする cDNA が蛋白コード能を有するか否かを判定するというものである。pET ベクターは 5' 末端に付加されるアミノ酸残基の数が少なく融合蛋白をそのまま免疫原に用いてもできた抗体が他の分子と交叉反応を示すことはほとんどなく、大変有用な系であることがわかった。また pET ベクター系には 3 つの異なる蛋白翻訳読み取り枠のベクターがあるので、どのフレームの組換え体がインサートの長さから期待される大きさの分子を適切に産生するかを簡便・迅速に判定できた。今回の我々の経験からいって、組換え・蛋白作成・抗体作成には少なくとも 3~5 カ月かかるので、通常であればその間に元の cDNA シーケンスを全て決定し、予測どおりの結果が得られているか否か確認することができるものと考えられた。また、多抗原性ペプチドを用いることによりキャリアー蛋白とペプチドを結合する必要はなく、手技が簡略化できるだけでなく交叉反応性を減らすことができる。また、作成したポリクローナル抗体により分子の組織分布や特徴についてのおおまかな情報を得ることができる。従って引き続き単クローン抗体を作成する場合の適切な陽性・

陰性対照を選択することが可能となる。我々も現在単クローン抗体を作成中であるが、合成ペプチドを免疫し ELISA のみでスクリーニングを行った場合、免疫原の他に予想外の特異性を示すものが多数取れて来ることを経験している。この場合、むしろ比較的分子量の大きい組換え蛋白で免疫し、遺伝子導入細胞とその親株を用いたスクリーニングを組み合わせると良好な結果が得られるものと考えられる。

また、MAP25 は十分に抗体価が上がるのに時間がかかったが、これは切り出し後の可溶化が難しく、同じ条件で行った MAP22 と比較してかなり収量が低かったためである (Fig. 3)。このように、合成ペプチドの配列によっては切り出し後の可溶化が容易でないことが報告されており¹⁰⁾、この点について解決する必要がある。レジンごと免疫するなどの修飾方法が試されるべきと考えた。

4.2 胸腺特異的発現を示すクラス Ib 分子について

マウス TL 抗原やヒト古典的 CD1 分子は主に胸腺細胞に強く発現することが知られている^{12,13)}。我々の解析では、ラットでは TL 遺伝子は全て偽遺伝子であることが判明しており^{6,14)}、またラット CD1 は CD1d タイプでありヒトでは胸腺に発現しない型に属するが、ラット胸腺では相当量発現していることが明らかになっている⁹⁾。今回の我々の結果はラットという種においても胸腺特異的に発現するクラス Ib 分子が存在することを初めて証明したものである。

興味深いことに RH104 分子は胸腺上皮細胞と網状成分に特に強く発現しており、他の胸腺特異的クラス Ib が胸腺細胞、とくに未熟な CD4⁺CD8⁺ (ダブルポジティブ) の胸腺リンパ球に強く発現しているのと異なっている。このような発現パターンを示すクラス Ib 分子は未だ知られておらず、アミノ酸配列の違いとともに、RH104 分子がユニークなクラス Ib であることを示している。現在、全塩基配列の決定と推定される高次構造の解析が進行中である。

4.3 RH104 クラス Ib 分子の機能的意義

クラス Ib 分子は、移植拒絶抗原であるクラス Ia 分子と一次構造が類似していること、 $\beta 2 m$ と結合していること等から、抗原提示能を有することが推定されている。実際、クラス Ib 分子である Qa-2, TL, H-2M, CD1 などが、 $\alpha/\beta T$ 細胞抗原受容体 (TCR) のリガンドになったり、ペプチドを結合して提示する場合があることが報告されてきている¹⁵⁻¹⁸⁾。RH104 はこのような抗原提示分子として機能する可能性がある。また、クラス Ib には新生児ラットの腸管上皮に発現し初乳中の

免疫グロブリンの吸収に役立つ Fc レセプター (FcRn) の存在も知られており²⁰⁾, 抗原提示以外の機能を有する可能性もある。

胸腺は T 細胞の分化・成熟の場であり, 特に胸腺上皮細胞の発現する自己クラス I, クラス II 分子と胸腺内で分化しつつある発達段階にある T 細胞が発現する TCR 分子との相互作用により, 自己 MHC 分子と適当なアフィニティを示す T 細胞がさらなる発達を遂げると考えられている¹⁹⁾. RH104 は胸腺上皮特異的クラス Ib であることから, ある種の特殊な TCR レセプターを持つ細胞, たとえば γ/δ T 細胞や NK 1.1 陽性の T 細胞 (Fas キラー) などの分化・成熟や自己反応性の制御に関わっている可能性が考えられる。今後, 単クローン抗体を作成して $\beta 2 m$ 結合能や高次構造について明らかにし, 発現細胞を詳細に同定してゆきたい。さらに, RH104 分子発現の T 細胞分化に与える影響などについて解析を行う予定である。

5 結 語

2 種類の方法を用いて抗体を作成し, 新しいラットクラス Ib 分子の同定に成功した。

1) 多抗原性ペプチド法は抗体価の高い血清を簡便に得るのに適していた。また, 大腸菌組換え融合蛋白を 3 種類の読み取り枠で作成する方法では簡単に産生蛋白の有無の判定ができた。両法で作成した抗体はほぼ類似した特異性を示した。

2) RH104 分子は胸腺上皮細胞特異的発現を示し, 現在まで知られていない新しいクラス Ib 分子であることが分かった。

3) RH104 分子の構造と機能を解析することにより, クラス Ib 分子の新たな側面を発見することができるものと期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を頂いた本学病理学第 1 講座菊地浩吉教授に深謝致します。また, RH104cDNA クローンを単離・解析し, 快く供与して下さいった同教室の本田亮一先生に感謝致します。長年にわたり励まして下さいました山家英子先生, 第 1 病理学教室の諸先生に深謝致します。

文 献

1. Steinmetz M, Winoto A, Minard K, Hood L. Clusters of genes encoding mouse transplantation

antigens. *Cell* 1982, 28: 489-498.

2. Weiss EH, Golden L, Fahrner K, Mellor AL, Devlin JJ, Bullman H, Tiddens H, Bud H, Flavell RA. Organization of the class I gene family in the major histocompatibility complex of the C57BL/10 mouse. *Nature* 1984, 310: 650-655.
3. Strominger JL. The γ/δ T cell receptor and class Ib MHC-related proteins: Enigmatic molecules of immune recognition. *Cell* 1989, 57: 895-898.
4. Stroynowski I. Molecules related to class-I major histocompatibility complex antigens. *Ann Rev Immunol* 1990, 8: 501-530.
5. 松浦晃洋, 一宮慎吾, 水野伸一, 菊地浩吉, クラス Ib は何をしているのか—その全体像—菊地浩吉, 矢田純一, 奥村康編 *Annual Review 免疫* 1994, 東京, 中外医学社, 1994: 227-240.
6. 高山晋一, 松浦晃洋. クラス Ib 遺伝子の分子遺伝学的—ラット T1a および CD1 相同遺伝子の同定— *札幌医学雑誌* 1992, 61: 49-61.
7. 一宮慎吾, 松浦晃洋: ラット CD1 抗原—組換え蛋白を用いた抗ラット CD1 ポリクローナル抗体による同定— *札幌医学雑誌* 1993, 62: 225-234.
8. Ichimiya S, Kikuchi K, Matsuura A. Structural analysis of the rat homologue of CD1; Evidence for evolutionary conservation of the CD1D class and widespread transcription by rat cells. *J Immunol* 1994, 153: 1112-1123.
9. Honda R, Matsuura A, Takayama S, Ichimiya S, Itoh Y, Kikuchi K. Identification of the function class I genes of the rat by cDNA cloning. *Transplant Proc* 1995, 27: 1515.
10. Tam JP. Synthetic peptide vaccine design synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 5409-5413.
11. Studier FW, Maffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986, 189: 113-130.
12. Boyse EA. The Biology of T1a. *Cell* 1984, 38: 1-2.
13. Boumsell L. Cluster report CD1. In: Knapp W, DÖken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGK, editors *Leukocyte typing IV*. Oxford University Press 1989, 251-253.
14. Matsuura A, Takayama S, Kozutsumi D, Ichimiya S, Honda R, Shen M, Natori T, Kikuchi K. Molecular cloning of rat class I genes related to the mouse TL gene subfamily of the major histocompatibility complex. *Transplant*

- Proc 1993, 25: 2754-2755.
15. Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Grahovac SB, Soloski MJ, JunG, Rammensee HG. Qa-2 molecules are peptide receptors of higher stringency than ordinary class I molecules. *Nature* 1993, 361: 642-644.
 16. Morita A, Takahashi T, Stockert E, Nakayama E, Tsuji T, Matusudaira Y, Old LJ, Obata Y. TL antigen as a transplantation antigen recognized by TL-restricted cytotoxic T cells. *J Exp Med* 1994, 179: 777-784.
 17. Pamer EG, Wang C-R, Flaherty L, Lindahl KF, Bevan MJ. H2-M3 presents a listeria monocytogenes peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell* 1992, 70: 215-223.
 18. Porcelli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4⁻CD8⁻ T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 1992, 360: 593-597.
 19. Marrack P, Lo D, Brinster R, Palmiter R, Burkley L, Flavell RH, Kappler J. The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell* 1998, 53: 627-634.
 20. Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 1989, 337: 184-187.
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目
札幌医科大学医学部病理学第1講座 沈 敏