

---

---

# 特異な構造を有するヒトIa様抗原の解析

---

---

(課題番号 59480176)

昭和60年度科学研究費補助金 (一般研究B) 研究成果報告書

昭和 61 年 3 月

研究代表者 片 桐 一

(旭川医科大学医学部)

# は し が き

昭和59年度から文部省科学研究費補助金（一般研究B）の助成のもとに行なわれた「特異な構造を有するヒトIa様抗原の解析」は2年間の研究期間を終了し、ここに研究成果報告書をまとめることになった。研究計画の全てが達成されたわけではないが、いくつかの新しい重要な知見が得られたと考えられる。報告書をまとめるにあたって、各分野の専門家の方々から率直な御批判を願うものである。

## 研究組織

研究代表者：片 桐 一  
(旭川医科大学医学部・教授)

## 研究分担者：

### 昭和59年度

池 田 久 実  
(旭川医科大学医学部・助教授)

矢 倉 英 隆  
(旭川医科大学医学部・助手)

比 嘉 敏 夫  
(旭川医科大学医学部・助手)

### 昭和60年度

矢 倉 英 隆  
(旭川医科大学医学部・助教授)

比 嘉 敏 夫  
(旭川医科大学医学部・助手)

池 田 久 実  
(北海道赤十字血液センター研究部・部長)

研究経費	昭和59年度	3,800千円
	昭和60年度	1,800千円
	計	5,600千円

## 研究発表

### 1. 学会誌等

- 1) 丹野正隆、池田久実、片桐一：HLA-DR抗原及びそれらの超特異性抗原とは異なるヒトIa様抗原の免疫化学的解析、移植、19(1)、1984
- 2) 三代川齊之、池田久実、片桐一：9C4抗体により検出されるヒトクラスⅡ抗原の免疫化学的解析—F A 抗原との免疫化学的比較—、移植、20(2)、1985
- 3) 楯玄秀、片桐一：Tリンパ芽球のHLA-classⅡ抗原のmRNAの解析、北海道医学雑誌、61(2)、1986
- 4) Obata, F., Endo, T., Tate, G., Miyokawa, N., Katagiri, M. and Kashiwagi, N. : Partial N-terminal sequence analysis of DRw53 antigens : The  $\beta$ -chains of DRw53 antigens are distinct from  $\beta$ -chains of DR and DQ antigens., J. Immunol., 136(6), 1986

### 2. 口頭発表

- 1) 三代川齊之、池田久実、片桐一：単クローン抗体9C4によって検出されるヒトClassⅡ抗原の解析、第14回日本免疫学会、1984年12月4日
- 2) 熊井恵美、池田久実、片桐一：CTLクローンをを用いたClassⅡ抗原の役割の解析、第14回日本免疫学会、1984年12月4日
- 3) Miyokawa, N., Katagiri, M., Ikeda, H. and Tanno, M. : A unique classⅡ antigen molecule detected by 9C4 antibody., 9th Histocompatibility Testing Workshop, Biochemical Study of HLA-D Region Antigens, 1984, 5, 5
- 4) 比嘉敏夫、坂田博美、片山耕、片桐一：HLA-DQ抗原とHTLV-I構造蛋白の共通抗原性の解析、第15回日本免疫学会、1985年12月7日
- 5) 小端哲二、比嘉敏夫、矢倉英隆、片桐一：ヒトT細胞活性化に関与するT細胞膜抗原、第15回日本免疫学会、1985年12月7日

## 研究成果

---

HLA-DR座を含む遺伝子領域は複数のIa様抗原をコードし、そしてこれらの抗原は免疫応答にたずさわる細胞群の細胞間相互作用にそれぞれの役割を担っているとみなされる。現在ヒトIa様抗原としては、血清学的手法を用いて検出されるDR及びDQ抗原、そして第2次MLRにより決められているDP抗原の3種類の抗原系が明らかにされている。我々は、DR及びDQ抗原以外のヒトIa様抗原としてHon7抗原(DRw53抗原の名称に統一された)及び単クローン抗体9C4により検出される9C4抗原が存在することを明らかにして来た。これらの抗原について免疫学的解析をすすめ以下の諸点が明らかになった。

(1) ヒト培養B細胞Wa(DR4/DR4, DQw Wa/DQw Wa)及びKy(DRw9/DRw9, DQw3/DQw3)から界面活性剤Brij58又はRenex30を用いて可溶化し、部分精製した標識抗原材料<sup>125</sup>I-Brij(又はRenex)-Wa及び<sup>125</sup>I-Brij-Kyは、単クローン抗体(マウス抗ヒト)9C4と反応した。これらの反応物をSDS-PAGEにより解析すると、35Kダルトン構成鎖( $\alpha$ 鎖)と26~28Kダルトン領域に2峰性の放射活性を示す構成鎖が認められ、9C4抗体はIa様抗原を検出した。両標識抗原材料を用いて、この9C4抗体と反応する抗原分子(9C4抗原)と既知のDR及びDQ抗原分子との関係をsequential coprecipitation法により解析すると、9C4抗原はDR及びDQ抗原とは異なる抗原分子であることが明らかになった(別添1に詳述してある)。

(2) 9C4抗体はDR及びDQ抗原以外のIa様抗原を検出する。DP抗原を検出する可能性が示唆されているB7/21抗体が検出するFA抗原とこの9C4抗原との関係を解析した。Wa細胞から分離した<sup>125</sup>I-Renex Waを抗原吸着カラム9C4-Sepharoseを用いて、9C4-Sepharose結合分画と素通り分画に分離した。結合分画は9C4抗体及びB7/21抗体と反応したが素通り分画は反応しなかった。この結合分画を用いて9C4抗原とFA抗原との関係をsequential coprecipitation法で解析すると、9C4抗体とB7/21抗体は同一分子を検出する可能性が明らかになった。更に両抗体により検出さ

れる抗原分子を2次元電気泳動により比較すると、両抗原の $\alpha$ 鎖間及び $\beta$ 鎖間には分子サイズ、pI上の差異は認められなかった。従って9C4抗体とB7/21抗体は同一の抗原分子を検出すると考えられた(別添2に詳述してある)。

(3) FA抗原はDP抗原に相当する可能性が報告されている(Linner, K.M and Bach, F.H.: HLA-FA: A non-DR, non-DQ HLA class II product, p538~539 in Histocompatibility Testing 1984, Springer-Verlag)。9C4抗体はFA抗原分子を検出するとみなされ、従ってこの9C4抗体はDP抗原を検出する可能性が推察される。DP抗原に関してホモ接合体でしかも特異性の異なる培養B細胞(WT46, Sa, L-KT-2等)を用いて、9C4抗原各構成鎖の異同を2次元電気泳動で解析した。

$^{35}\text{S}$ -methionineで標識した細胞から得た9C4抗原の $\alpha$ 鎖の主要なスポット間には差異は明らかでなかった。これに対し $\beta$ 鎖のスポットでは各種細胞間で荷電上の差異が認められた。この差異はDP抗原特異性と必ずしも一致しなく更に解析中である(別添2に一部記載してある)。

9C4抗体はDP抗原を検出する可能性が推測され、DP抗原 $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖に対応する遺伝子DNAをトランスフェクションした培養T細胞CCRF-CEMにおける9C4抗原の発現を解析しているが、現在迄9C4抗原の発現は検出されていない。更らに既に分離されているDP遺伝子DNAと9C4抗原遺伝子との関係を解析中である。

(4) DR及びDQ抗原分子以外にもヒトアロ抗血清Hon7により検出されるIa様抗原分子(DRw53抗原の名称に統一された)が存在することをWa細胞(DR4/DR4, DQwWa/DQwWa)を用いて明らかにして来た。さらに培養B細胞LG10(DR7/DR7, DQw2/DQw2)から可溶化、部分精製した標識可溶化抗原材料を用いて解析した。標識可溶化抗原材料 $^{125}\text{I}$ -LG10は、DR抗原を検出するとみなされる8C4及びISCR3抗体と反応し、それぞれは総放射活性の19.5%及び14.9%を反応沈降させた。DQ抗原を検出するBV-3抗体及びDRw53抗原を検出するHon7血清とも反応し、それぞれは総放射活性の7%及び10%を反応沈降させた。

Hon7 血清により検出される DRw53 抗原分子が DR7 抗原及び DQw2 抗原とは異なった抗原分子として存在することは sequential coprecipitation により証明された (表 1)。

表 1 Remaining Binding Activity of  $^{125}\text{I}$ -Renex-LG10 preparation After Removal of Antigen Molecules.

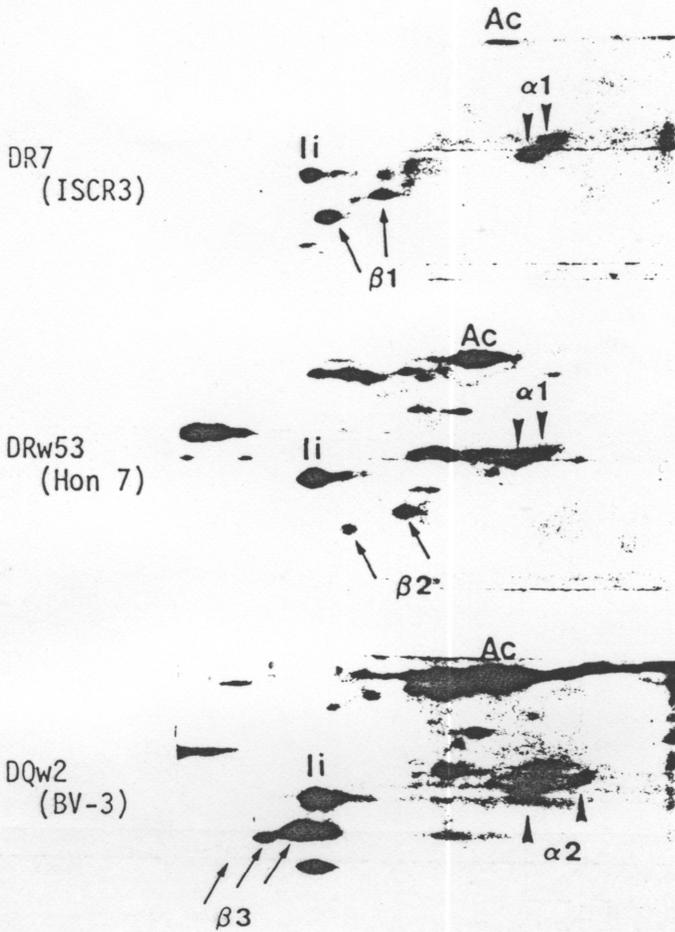
Binding activity of antigen preparation with

Depleting antibody	Hon 7	BV-3	8C4	ISCR3
	(Anti-DRw53) %binding	(Anti-DQ) %binding	(Anti-DR) %binding	(Anti-I-E) %binding
Hon 7	0.56	6.8	16.5	7.2
Norm. Human S.	10.3	7.3	17.5	10.1
BV-3	10.3	0.66	17.0	13.1
8C4	3.8	5.9	0.48	0.86
Norm. Mouse S.	10.4	7.1	19.5	14.9

BV-3 抗体と反応する抗原分子を除去した抗原材料は、他の単クローン抗体及びアロ抗血清とは、正常血清処理抗原材料と同様に反応し、逆に他の抗体又は抗血清で前処理した抗原材料は依然として BV-3 抗体と反応した。従って BV-3 抗体は抗原材料中の DQw2 抗原分子のみを検出するとみなされた。Hon7 血清で前処理した抗原材料は、他の抗体との反応性を殆んど減少させないが、8C4 抗体で前処理した抗原材料は、Hon7 血清との反応性が減少した。このことは 8C4 及び ISCR 抗体は大部分の DR7 抗原分子と反応し、しかも DRw53 抗原分子とも反応するためとみなされる。以上の結果から、Hon7 血清で検出される DRw53 抗原は、DR7 抗原及び DQw2 抗原とは異なった分子として存在するとみなされる。このことは 2 次元電気泳動による解析により確かめられた。 $^{35}\text{S}$ -methionine で標識した LG10 細胞から得た可溶性抗原材料と抗血清又は抗体との反応物を 2 次元電気泳動で解析した (図 1)。

図1

LG10 cell



$\alpha$ 鎖のスポットについて比較すると、DRw53抗原 $\alpha$ 鎖( $\alpha_1$ )とDR7抗原 $\alpha$ 鎖( $\alpha_1$ )との間には明らかな差異は認められなかった。これらに対しDQw2抗原 $\alpha$ 鎖( $\alpha_2$ )は、 $\alpha_1$ スポットよりも分子サイズの小さい位置に認められた。 $\beta$ 鎖スポットの位置は、これら3種類の抗原間で異なっていた。即ちDR抗原 $\beta$ 鎖( $\beta_1$ )はIiとそれに近接する第2のIiスポットとの中間部の下方から酸性側の方向にスポットを形成し、DRw53抗原 $\beta$ 鎖( $\beta_2$ )は第2

のIiスポットの真下より酸性側の方向にスポット形成している。DQw2抗原β鎖(β<sub>3</sub>)スポットは、Iiより塩基性側に認められた。

従って3種類の抗原間においてβ鎖は明らかに異なっているが、α鎖に関してはDRw53抗原α鎖はDR抗原α鎖と区別し得なかった。

(5) <sup>3</sup>H-phenylalanine, <sup>14</sup>C-Tyrosine 又は<sup>3</sup>H-valine で標識した可溶性抗原材料と各種単クローン抗体又はヒト抗血清との反応物をSDS-PAGEによりα鎖とβ鎖に分離した。それぞれの構成鎖のN末端部分アミノ酸配列をBechman890Cサイクエンサーにより解析した。表2にLG10細胞を用いた成績を既に報告されている成績に対比して示してある。

表2 DR7, DRw53及びDQw2抗原各構成鎖のアミノ末端アミノ酸配列

α-chain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
DR7*	Ile	Lys	Glu	Glu	His	Val	Ile	Ile	Gln	Ala	Glu	Phe	Tyr	Leu	Asn	Pro	Asp	Gln	Ser	Gly	Glu	Phe	Met	Phe		
DR7(LG10,8C4)						Val						Phe	Tyr									Phe		Phe		Phe
DRw53(LG10,Hon)						Val						Phe	Tyr									Phe		Phe		Phe
DQw2(LG10,BV-3)				Val							Tyr	Val				Tyr				Tyr						
DQw2(DS)*	Glu	Asp	Ile	Val	Ala	Asp	His	Val	Ala	Ala	Tyr	Gly	Val	Asn	Leu	Tyr	Gln	Ser	Tyr	Gly	Pro	Met	Gly	Gln		
DQw1(DC1)**	Glu	Asp	Ile	Val	Ala	Asp	Ser	Val	Ala	Gln	Leu	Gly	Val	Asn	Leu	Tyr	Gln	Ser	Tyr	Gly	Pro	Ser	Gly	Gln		
β-chain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
DR2***	Gly	Asp	Thr	Arg	Pro	Arg	Phe	Leu	Trp	Gln	Pro	Lys	Arg	Glu	Cys	His	Phe	Phe	Asn	Gly	Thr	Glu	Arg	Val		
DR7(LG10,8C4)							Phe						Tyr				Phe	Phe								Phe
DRw53(LG10,Hon)							Phe										Phe									?
DQw2(LG10,BV-3)							Phe	Val	Tyr			Phe				Tyr	Phe									
DQw2(DS)**							Phe					Phe					Phe									
pDR-β-1****	Arg	Asp	Ser	Pro	Glu	Asp	Phe	Val	Tyr	Gln	Phe	Lys	Gly	Met	Cys	Tyr	Phe	Thr	Asn	Gly	Thr	Glu	Arg	Val		

\* Goyert, S.N. et al, J. Exp. Med. 156, 550, 1982      \*\* Bono, R. et al, Nature 299, 836, 1982

\*\*\* Kratzin, H. et al, Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1665, 1981

\*\*\*\* Larhammar, D. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 3687, 1982

DRw53抗原α鎖は、検討した範囲内においてDR7抗原のα鎖に一致しており、両者間に差異は認められなかった。しかしDRw53抗原β鎖とDR7抗原β鎖の間には差異が存在し、DR7抗原β鎖が有する<sup>13</sup>Tyrと<sup>18</sup>PheはDRw53抗原β鎖では検出されなかった。従ってDRw53抗原β鎖のアミノ末端から第13番及び18番目のアミノ酸はTyr, Phe, Val以外のアミノ酸である。DQw2抗原のアミノ酸配列は明らかにDR7及びDRw53抗原のアミノ酸配列と異なり、

これ迄報告されている DQ 抗原のアミノ酸配列に類似の配列をしめした。

培養 B 細胞 Ky (DRw9/DRw9, DQw3/DQw3) を用いた解析においても、DRw53 抗原  $\beta$  鎖の N 末端アミノ酸配列が DRw9 抗原  $\beta$  鎖及び DQw3 抗原  $\beta$  鎖と異なり、DRw53 抗原  $\beta$  鎖の独立法が証明された (別添 3 に詳述してある)。

現在、DR 抗原構成鎖に対応する cDNA 及び遺伝子 DNA の解析により、1 種類の DR  $\alpha$  鎖遺伝子と 3 種類の DR  $\beta$  鎖遺伝子の存在が明らかにされている。従って 1 種類の  $\alpha$  鎖遺伝子産物とそれぞれの  $\beta$  鎖遺伝子産物の組み合わせからなる抗原分子の存在が推定される。今回の解析結果から DRw53 抗原と DR7 又は DRw9 抗原とは  $\alpha$  鎖を共有し  $\beta$  鎖を異にしている可能性が考えられ、この両抗原間の関係は DNA レベルの解析結果に合致するものと思われた。

- 別添 1 丹野正隆ほか：HLA-DR 抗原及びそれらの超特異性抗原とは異なるヒト Ia 様抗原の免疫化学的解析、移植、19(1)、1984
- 別添 2 三代川齊之ほか：9C4 抗体により検出されるヒトクラス II 抗原の免疫化学的解析—FA 抗原との免疫化学的比較—、移植、20(2)、1985
- 別添 3 Obata, F. et al : Partial N-terminal sequence analysis of DRw53 antigens : The  $\beta$ -chains of DRw53 antigens are structurally distinct from  $\beta$ -chains of DR and DQ antigens. J. Immunol., 136 (6), 1986