

2H15-1 Single-cell PCR 法を用いた抗体の親和性成熟機構の解析

○岡澤 貴裕, 曲 正樹, 木本 崇文, 香山 絵美,
金山 直樹, 大森 斉
(岡山大工・生物機能工)

親和性成熟は、胚中心における抗体可変部領域の体細胞突然変異と、それにより抗原に対し高親和性を獲得した B 細胞の選択の結果であるが、その詳細な機構には未知な点が多い。我々は、親和性成熟における選択機構を明らかにするために B 細胞集団の限定された QM マウスを用いて解析を行ってきた。QM マウスは、NP 特異的な重鎖 VDJ 遺伝子 ($V_H T$) がノックインされ、軽鎖 κ 鎖が不活性化されている為、末梢 B 細胞の約 80% が $V_H T$ 重鎖と $\lambda 1$ あるいは $\lambda 2$ 軽鎖を発現している ($V_H T/\lambda 1$ と $V_H T/\lambda 2$)。これまでに、 $V_H T/\lambda$ 抗体に対して低親和性抗原である pNP への親和性成熟をモノクローナル抗体の作製により解析した結果、免疫初期には $V_H T/\lambda 1$ と $V_H T/\lambda 2$ B 細胞は IgM 抗体産生細胞として活性化されるが、pNP に対して初期活性の高い $V_H T/\lambda 2$ B 細胞が優先的に IgG ヘクラススイッチし、 $V_H T$ CDR3 上に pNP に対する特異性の獲得に重要な変異 (T313A) を受けていることを明らかにした。今回我々は、 $V_H T/\lambda 2$ B 細胞が親和性成熟のどの段階で選択されるのかということを検討するために、抗体の親和性成熟の場である胚中心の細胞を単離し、Single-cell PCR 法を用いて抗体遺伝子の解析を試みた。その結果、 $V_H T^+$ 胚中心 B 細胞のうち $V_H T$ に T313A の変異を有する細胞は約 70% であった。また、T313A の変異を有する $V_H T^+$ B 細胞において軽鎖の解析を行ったところ、 $\lambda 2$ が優先的に選択されている傾向が見られた。これらの結果は、単一 B 細胞レベルでの抗体遺伝子の解析が親和性成熟過程の研究に有効であることを示唆している。

Analysis of affinity maturation by single-cell PCR

○ Takahiro Okazawa, Masaki Magari, Takafumi Kimoto, Emi Kouyama,
Naoki Kanayama, Hitoshi Ohmori
(Dept.Biotech., Okayama Univ.)

Key words affinity maturation, somatic hypermutation, single-cell PCR

2H15-2 新規ダニアレルゲン Mag133 によるヘルパー T 細胞バランス調節

○中村 真子, 河本 正次, 馬場 幸治, 秋 庸裕,
重田 征子, 小埜 和久
(広大院・先端・生命機能)

【背景】ダニ排泄物粗抗原 HM2 画分 (30 ~ 40 kD) は、ダニアレルギー患者 IgE に特異的に反応するアレルゲンを含んでいる。演者らはこれまでに、HM2 の構成成分を検索し、主要抗原 Der f 3、Der f 6、Der f 17 に加えて UK114 ファミリータンパク質と相同性を有する新規ダニアレルゲン Mag133 を同定した。最近、哺乳類由来の UK114 タンパク質が、ヘルパー T 細胞バランスの Th2 偏向能や自己反応性 Th1 細胞の活性化を主徴とした免疫病 (関節炎や糖尿病) に対する治療効果を有することが報告されている。そこで、Mag133 のダニアレルギー発症における役割を調べるため、そのヘルパー T 細胞バランス調節能について解析することを目的とした。

【実験方法及び結果】Mag133 cDNA を COS7 細胞内で His-tag 融合タンパク質として発現させた後、enterokinase 消化により融合タンパクを切断して約 16 kD の単一タンパク質として精製した。この精製 rMag133 と SPF 環境下で飼育した Balb/c マウス由来脾細胞を混合して、24 時間前培養することにより抗原提示細胞をプライミングし、続いて抗 TCR 抗体で T 細胞を活性化させた後、細胞上清中のサイトカインについて定量したところ、Th2 型サイトカインである IL-4 の産生が誘導され、Th1 型サイトカインである IFN- γ の産生が抑制されることがわかった。このことは、Mag133 が UK114 タンパク質の特性であるヘルパー T 細胞バランス偏向能を持つことを示唆している。

Regulation of helper T-cell differentiation by a new mite allergen, Mag133

○ Naoko Nakamura, Seiji Kawamoto, Kouji Baba, Tsunehiro Aki, Seiko Shigeta, Kazuhisa Ono
(Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University)

Key words helper T-cell, mite allergen, UK 114 family protein

2H15-3 「スーパー抗体酵素 41S-2-L」が持つ誘導期の特徴

○横道 博, 光田 有希恵, 一二三 恵美, 宇田 泰三
(広島県大、科技団 CREST)

【目的】HIV-1 の外膜タンパク gp41 は、HIV がヒト T 細胞への感染の際に重要な役割を果たしている。当研究室で見出された gp41 分子に特異的な抗 gp41 抗体の L 鎖、「スーパー抗体酵素」41S-2-L は抗原である gp41 保存領域ペプチドだけでなく、HIV の外膜タンパク gp41 を酵素的に分解する。この 41S-2-L は gp41 抗原ペプチドを分解する際に、誘導期/活性期という 2 相性の分解曲線を描きながら反応が進行し、誘導期の間に構造の変化を起こしていることが考えられる。そこで本研究では、この誘導期の性質について解析を行った。

【方法】抗 gp41 抗体を H 鎖、L 鎖に分離後、L 鎖 (41S-2-L) を 25℃ でインキュベートした。インキュベート時間の異なるそれぞれの 41S-2-L と gp41 抗原ペプチドとの反応を 25℃、リン酸緩衝液 (pH6.5) 中で行い、gp41 抗原ペプチドの濃度変化を HPLC で追跡した。

【結果】インキュベートを行っていない 41S-2-L と gp41 抗原ペプチドの反応では、誘導期/活性期という 2 相性の分解曲線を描きながら反応が進行した。インキュベートの時間を 0 時間から 95 日と長くしていくと次第に誘導期は短くなって行くが 3-4 日目で誘導期がなくなり、gp41 抗原ペプチドを加えるとただちに分解反応が始まった。また、95 日間 25℃ でインキュベートした 41S-2-L は、当然、誘導期を示さず gp41 抗原ペプチドを完全に分解した。このことから 41S-2-L の抗原分解能はかなり安定である事が解った。

Features of the induction phase in degradation of antigenic peptide by super catalytic antibody 41S-2-L

○ Hiroshi Yokomichi, Yukie Mitsuda, Emi Hifumi, Taizo Uda
(Hiroshima Pref. Univ., CREST of JST)

Key words catalytic antibody, HIV, gp41, peptide, induction phase

2H15-4 天然型抗体酵素と特定の germline ~ 新しい概念 Antigenase について~

○宇田 泰三, 一二三 恵美
(広島県大、科技団 CREST)

演者らはこれまでに HIV-1 *env* gp41 分子を特異的に破壊する「スーパー抗体酵素」(天然型抗体酵素) の作製に成功したのを皮切りに、i41SL1-2 や i41-7、また、*Helicobacter pylori* urease に対する天然型抗体酵素 HpU-9 および-18、さらには HIV が人白血球へ感染する時に重要であるケモカインレセプター CCR5 ペプチドに対する天然型抗体酵素などを作製してきた。本講演ではこれらの天然型抗体酵素がある特定の germline に属することを見出したので報告する。

【方法及び結果】抗体可変領域の三次元立体構造解析のデータとしては、塩基配列から推定したモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列 (35 株)、および PDB に登録されている抗体のアミノ酸配列 (56 株) を使用した。立体構造解析を実施した抗体の内、マウス型抗体で L 鎖のクラスが κ 型であった抗体については、Ig BLAST を使って V κ germline を検索した。各抗体が由来している germline を推定すると同時に、触媒三ツ組残基様構造を構築していると推定されたアミノ酸残基については、そのアミノ酸残基の配置や germline からの変異の状況を詳細に解析した。その結果、germline と V 領域のアミノ酸配列を比較すると、触媒三ツ組残基様構造を構成しているアミノ酸残基の大部分はある特定の germline に由来していた。これは抗体酵素が遺伝子レベルですでに用意されている事を示唆する重要な知見であり、こうした抗体酵素は Antigenase と呼ぶことが相応しい。

Natural catalytic antibodies and discrete germline ~ New concept of Antigenase~

○ Taizo Uda, Emi Hifumi
(Hiroshima Pref. Univ., CREST of JST)

Key words natural catalytic antibody, germline, Antigenase