

## HLA分子とペプチドとの結合親和性の定量化：HLA分子の多型が免疫応答に与える影響

問田, 望  
九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

<https://doi.org/10.15017/7325065>

---

出版情報：福岡醫學雑誌. 85 (2), pp.57-67, 1994-02-25. Fukuoka Medical Association  
バージョン：  
権利関係：



# HLA 分子とペプチドとの結合親和性の定量化

## HLA 分子の多型が免疫応答に与える影響

九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門 (指導 笹月 健彦教授)

九州大学歯学部口腔外科学第二講座 (指導 岡 増一郎教授)

問 田 望

## Quantitative Analysis of the Binding of Peptides to HLA Molecules Role of Polymorphic HLA Molecules in the Immune Response

Nozomu TOIDA

*Department of Genetics (Director: Prof. T. Sasazuki), Medical Institute of Bioregulation,  
Kyushu University 69, Fukuoka 812*

*Second Department of Oral Surgery (Director: Prof. M. Oka), Faculty of Dentistry,  
Kyushu University 61, Fukuoka 812*

We established HLA-peptide binding assay system, using biotinylated peptide and HLA class II transfectants to make clear the interaction of peptides and HLA molecules. By using this system and T cell proliferation assay, we analyzed the effect of polymorphism of DR4 subtypes on responding to M12(4) peptide which derived from M12 protein of Streptococcus.

We found amino acid residue which determines T cell recognition is DR  $\beta$ -74 (Glutamate to Alanine) on this peptide.

Using this system, we expect to understand the mechanisms of immune response associated with HLA class II molecules.

### はじめに

ヒト主要組織適合抗原複合体 (MHC) である HLA は第 6 染色体短腕上にある多重遺伝子族によってコードされている<sup>1)</sup>。その中で HLA クラス II 領域は、DR, DQ, DP の各亜領域より構成されている<sup>29)</sup>。HLA-DR 分子, DQ 分子, DP 分子は HLA クラス II 領域のうちそれぞれ DR, DQ, DP 亜領域の遺伝子産物であり、抗原提示細胞表面に発現している。それぞれのクラス II 分子は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖からなる糖蛋白であり、抗原ペプチドと結合し CD 4 陽性 T 細胞に抗原を提示し<sup>26)</sup> 高度の遺伝的多型性を示す。またヒト集団中に溶連菌細胞壁抗原 (SCW)、スギ花粉抗原 (CP)、B 型肝炎ウイルス抗原 (HBs) などの外来抗原ペプチドに対する免疫応答性に個体差が存在し、この個体差が HLA クラス II 分子と相関することが明らかにされている<sup>22)-25)</sup>。HLA クラス II 分子の高度の多型性は主に抗原ペプチドを結合する細胞外ドメインに集中しており、このため抗原ペプチドとの結合性がそれぞれタイ

プごとに異なり、このことが免疫応答の個体差を決定する一因となると考えられている。

われわれは外来抗原ペプチドとの結合性と HLA クラス II 分子の多型性との関連をより詳細に検討するため、HLA 分子とペプチドとの結合性を定量化する系を樹立した。この系を用いて、溶連菌細胞壁 (SCW) の主要抗原である M 蛋白由来の外来抗原ペプチドと HLA 分子との結合親和性と T 細胞の免疫応答性とを比較することで、免疫応答性の個体差の形成における HLA の多型性の機能的意義を検討した。

### 材料および方法

#### 1. 形質転換細胞

HLA-Dw 15 ホモ接合体由来の DR 4 (DRA \* 0101 および DRB 1 \* 0405), HLA-Dw 12 ホモ接合体由来の DR 51 (DRA \* 0101 および DRB 5 \* 0102) 遺伝子をそれぞれ Ltk-細胞に導入し DR 4, DR 51 をそれぞれ発現した形質転換細胞を用いた (LDR 4-Dw 15, DR 2 AB 5, DRS 8)<sup>8)30)</sup>。また種々のタイプの DR 4 分

子(DRA と DRB1 \* 0401, 0402, 0403, 0404 あるいは 0406) をそれぞれ発現した HLA 形質転換細胞 (R/3, 2L, L164.11, L89.2, L165.6, B18) は、第11回国際 HLA ワークショップ(横浜)にて供与されたものを使用した。

## 2. ペプチド合成

HLA-DR に結合することが既知のインフルエンザ A/TEXAS/1/77 ウイルス H3 hemagglutinin 由来の HA 307-319(PKYVKQNTLKLAT)<sup>20,21)</sup> およびマラリア circumsporozoite 蛋白由来の CS 380-395(EKKIAKMEKASSVFENV)<sup>27)</sup> を合成した。また溶連菌 M 蛋白の M12 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列に基づいて、20-25 mer からなり 10-15 mer ずつ重複した 31 種 (表2) のペプチドを合成した。ペプチドは FMOC 法を用いてペプチド合成装置 (Millipore 社) にて合成した後、レジンを切り出し、HPLC (High Performance Liquid Chromatography) により精製した。また合成した各ペプチドのアミノ酸組成はピコタグ (Millipore 社) によって確認した。

## 3. ペプチドのビオチン化

C 末端がレジンに結合したままの状態、ペプチドにビオチン (long arm biotin) を加え、DMF, N,N ジイソプロピルメチルアミン存在下にいて 2 時間インキュベートすることにより、合成ペプチドの N 末端にビオチンを付加した。ペプチドのビオチン化の効率は Kaiser test<sup>12)</sup> にて確認した。ビオチン化ペプチドはレジンより切り出された後、HPLC により精製した。

## 4. M12 蛋白特異的 T 細胞株の樹立

健康人 (DRB1 \* 0406/\* 0405) の末梢血リンパ球 (PBL) を、20  $\mu$ g/ml のリコンビナント M 蛋白を含む 10% ヒト血清加 RPMI 1640 (GIBCO) 培養液中で、 $1 \times 10^6$ /ml の濃度で 7 日間培養した。培養後 Ficoll-Paque 比重遠心法にて回収した生細胞 ( $5 \times 10^5$ ) に放射線照射 (3000 R) した自己の PBL を ( $5 \times 10^6$ ) 加え、リコンビナント M 蛋白 10  $\mu$ g, IL-2 (100 U) および IL-4 (1 U) 存在下にヒト血清加 RPMI 1640 培養液にてさらに 7 日間培養した。7 日毎に同様の方法にて生細胞を回収しさらに培養を行うことでリコンビナント M 蛋白特異的 T 細胞株を樹立した。また抗原として M12 蛋白由来の合成ペプチドを使用することで同様に抗原特異的 T 細胞株を樹立した。

## 5. DR 拘束性 T 細胞株の T 細胞増殖反応

抗原提示細胞として形質転換細胞を用いる場合は、各形質転換細胞をマイトマイシン C (25  $\mu$ g/ml) 含有培養液にて 37°C で 30 分間処理後 3 回 PBS にて洗浄し、20% ヒト血清加 RPMI 1640 培養液に浮遊して、 $3.5 \times 10^4$ /well の割合で 96 well 平底プレートにまいた。12 時間後形質転換細胞が再付着したことを確認し刺激細胞として用いた。約 1 カ月間培養を続けた T 細胞株 ( $2 \times 10^4$ /well) を合成ペプチド 2  $\mu$ M および刺激細胞と 3 日間培養し、T 細胞増殖反応を <sup>3</sup>H-チミジンの取り込みにより測定した。測定はトリプリケートで行った。

## 6. 合成ペプチドと HLA 分子の結合親和性の測定

ビオチン化ペプチドと HLA-DR 分子を発現した形質転換細胞を用いて、以下の方法によりペプチドと HLA 分子との結合親和性を定量化した。各形質転換細胞 ( $3 \times 10^5$ ) にビオチン化ペプチド (100  $\mu$ M) を加え、10% 牛胎児血清 (FCS/Gibco) 加 PBS 中で 37°C で 4 時間培養を行った。ついで PBS で 5 回洗浄し、これにアビジン-フィコエリスリン (AV-PE) を 4  $\mu$ l 加え、4°C で暗所にて 30 分間反応させた。その後 PBS で 3 回洗浄し、フローサイトメトリー (FACSscan) にて PE 蛍光強度を測定した。死細胞は 7-アミノアクチノマイシン D により染色し、FACSscan による蛍光測定から除外した。フローサイトメトリーの蛍光強度は PE 結合標準ビーズ (FCSC 社) を用い、標準化し MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome) に換算した。また、PE 標識の抗 HLA-DR 単クローン抗体 (抗 HLA-DR framework/Becton-Dickinson 社) の 1 抗体当りの蛍光強度 (Effective F/P ratio) を標準ビーズ (Simply Cellular/FCSC 社) を用いて算出し、これを用いて染色した形質転換細胞の蛍光強度から細胞表面の HLA-DR 分子の数を推定した。HLA 分子の発現量の異なる形質転換細胞間で HLA 分子と合成ペプチドとの結合親和性を比較するため、R. B. U. (Relative Binding Unit) という次の値を定義した。

$$R. B. U. (\%) = (A - B) / (C)$$

A: 形質転換細胞上の HLA-分子と結合したペプチドのアビジン-フィコエリスリンの MESF

B: ネオマイシン耐性形質転換細胞 (L-neo) と結合したペプチドのアビジン-フィコエリスリンの MESF

C: 形質転換細胞上の HLA 分子数

また、検出限界は L-neo と結合したビオチン化ペプ

チドの蛍光強度と形質転換細胞の自家蛍光の MESF の和とした。

## 7. HLA 分子との結合におけるペプチド間の競合

ペプチド間における HLA 分子への結合性の競合 (cold competition assay) は、以下の方法により測定した。まず、形質転換細胞 ( $3 \times 10^5$ /well) にビオチン化ペプチド ( $100 \mu\text{M}$ ) とビオチン化していないペプチド ( $200 \mu\text{M}$ ) を加え、4 時間  $37^\circ\text{C}$  で培養した後 5 回 PBS で洗浄し、さらにアビジン-フェコエリスリンを  $4 \mu\text{l}$  加え 30 分  $4^\circ\text{C}$  暗所で反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄しフローサイトメトリーにて蛍光強度を定量化した。

## 8. HLA タイピング

T 細胞株ドナーの HLA 型および形質転換細胞に導入されている遺伝子の HLA 型は、DR 特異的プライマーを用いた後に PCR 産物と塩基配列特異的オリゴヌクレオチドプローブとの反応性により決定した<sup>31)</sup>。

## 実験結果

### 1. HLA 分子との結合親和性におけるペプチド濃度の影響

HLA 分子との結合にペプチド濃度がどのような影響を与えるかを検討するために、DR 分子に結合することが既知のペプチドである HA 307-319 ペプチドと

CS 380-395 のペプチドを用いた実験を行った。図 1 で示すように形質転換細胞に結合したビオチン化ペプチドの蛍光強度は低濃度 ( $0-50 \mu\text{M}$ ) ではほぼ濃度に比例するが、高濃度 ( $>200 \mu\text{M}$ ) ではほぼ飽和状態に達した。一方、HLA 分子を発現していない Ltk- (L-neo) にはビオチン化ペプチドはほとんど結合しなかった。

### 2. ペプチドの結合親和性における HLA 分子発現量の影響

HLA 分子の発現量とペプチド結合量との関連を検討するために、DR 51 分子の発現量の異なる形質転換細胞 (DR 2 AB 5, DRS 8) とビオチン化ペプチドの結合実験を行った。図 2 A に示すように、DR 2 AB 5 は DRS 8 より多くの HLA-DR 51 分子を発現している。M 12 (1) (図 2 B) および M 12 (31) (図 2 C) のいずれを用いた場合にも、DR 2 AB 5 は DRS 8 より多くの合成ペプチドを結合した。この蛍光強度を MESF に換算すると、形質転換細胞上の HLA 分子の発現量とペプチド結合量とがほぼ比例することが明らかになった (図 3)。したがって HLA 分子の発現量の異なる形質転換細胞間でも、HLA 分子数で補正することにより HLA 分子とペプチドとの結合親和性を比較することが可能であると考えられた。

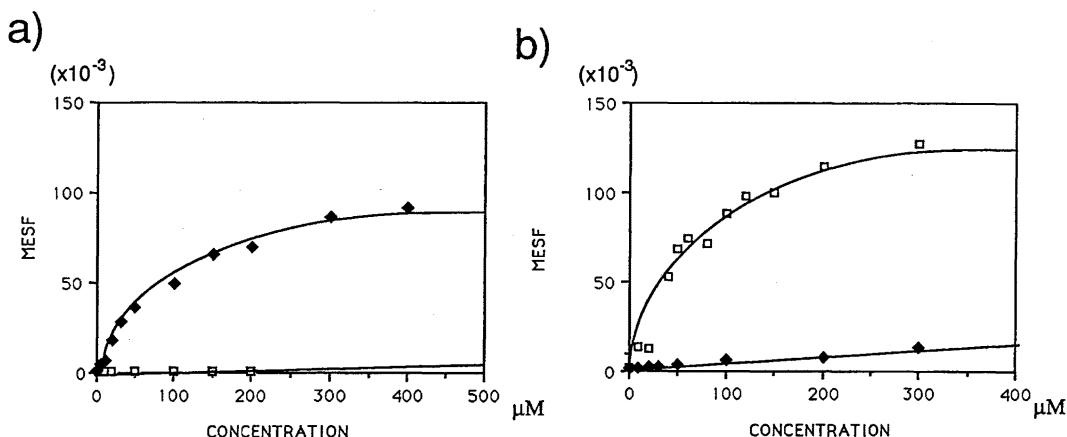


図 1 HLA 分子とペプチドとの結合における濃度依存性曲線

HLA-DR51 分子を発現した形質転換細胞 (DR2AB5) とビオチン化 HA307-319 ペプチド (図 1a) および HLA-DR4 分子を発現した形質転換細胞 (DR4-Dw15) とビオチン化 CS380-395 ペプチド (図 1b) を用いた HLA 分子とペプチドとの結合における濃度依存性曲線を示す。図 1a の◆は DRB5 \* 0102 の遺伝子を導入した形質転換細胞 (DR2AB5), □は L-neo, 図 1b の□は DRB1 \* 0405 の遺伝子を導入した形質転換細胞 (DR4-Dw15), ◆は L-neo を示す。

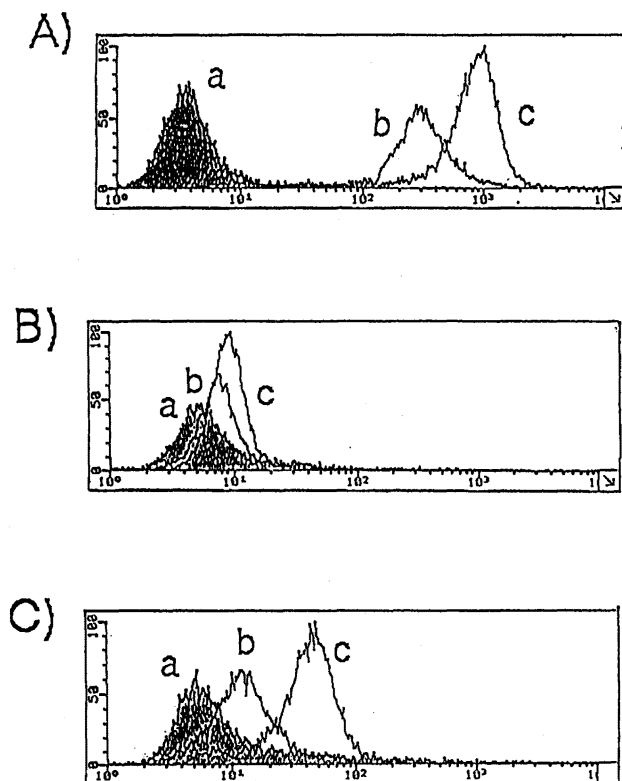


図2 フローサイトメトリーを用いた結合親和性の解析

A)は抗DR単クローン抗体を用いて染色したL-neo細胞(a)とDRB5 \* 0102の発現量の異なる形質転換細胞であるDRS8(b)とDR2AB5(c) B)はDRB5 \* 0102と低親和性のM12(1)のビオチン化ペプチド, c)はDRB5 \* 0102と高親和性のM12(31)のビオチン化ペプチドを示す。

### 3. ビオチン化ペプチドと非ビオチン化ペプチドのHLA分子に対する結合親和性の比較

ペプチドをビオチン化することによりHLA-DR分子への結合親和性が変化するかどうかを検討するためにCS 380-395を用いてビオチン化ペプチドと非ビオチン化ペプチドとの競合実験を行った。図1bの濃度曲線を用いてビオチン化ペプチドと非ビオチン化ペプチドとの結合親和性が同じときの競合の理論値を推定した(表1)。その結果、濃度曲線から得られた理論値と実験により得られた実測値とはほぼ同じ値を示した。また同様の実験を図1aの濃度曲線を用いてHA 307-319で行い同様な結果を得た。したがって、少なくともCS 380-395, HA 307-319ペプチドを用いた場合、ビオチン化することによってHLA分子との結合親和性が変化することがなかった。

### 4. DRB1 \* 0405およびDRB5 \* 0102分子におけるM12蛋白由来のペプチドとの結合親和性の違い

M12蛋白由来の31種のペプチドでDR4 (DRB1 \* 0405) およびDR51 (DRB5 \* 0102) 分子の結合親和性を比較した(表2)。DR51分子の方がDR4分子よりも多くのM12由来のペプチドを結合し得た。またDR51分子, DR4分子のいずれもM12蛋白のN末端部分あるいは中間部分に対応するペプチドを強く結合し得た。また, DR4ではM12(22)に強く結合したがM12(31)のペプチドとは結合していなかった。またDR51ではM12(31)のペプチドに強く結合したがM12(22)のペプチドとは結合しなかった。

### 5. DRB1 \* 0405およびDRB5 \* 0102分子におけるM12蛋白由来のペプチドの競合

M12蛋白由来の31種のペプチドのうち結合親和性の高い非ビオチン化ペプチドを用いてビオチン化ペプ

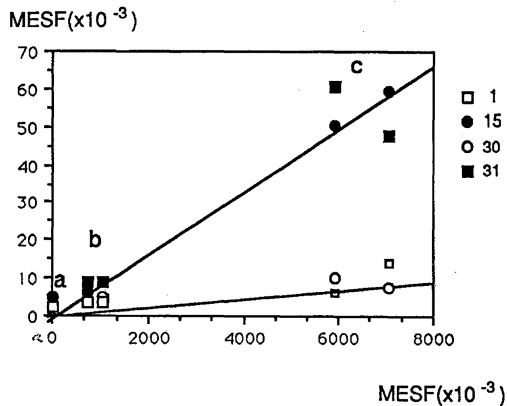


図3 DRB5 \* 0102 の発現量とビオチン化ペプチドとの結合  
DRB5 \* 0102 の遺伝子を導入した形質転換細胞で DRB5 \* 0102 に高親和性である M12(15), M12(31) のビオチン化ペプチドと低親和性である M12(1), M12(30) ビオチン化の DRB5 \* 0102 分子の発現量に対する蛍光強度の実験を行った。x 軸はフィコエリスリン標識の抗 HLA 単クローン抗体を用いた蛍光強度を示し、Y 軸はビオチン化ペプチドを用いた蛍光強度を示している。また a は L-neo, b は DRS8, c は DR2AB5 で行われた実験値である。また ■ は M12(31) ○ は M12(30) □ は M12(1) ● は M12(15) を示した。

チドとの競合実験を行った (表 2)。DRB1 \* 0405 分子で結合したペプチドのうち M12 蛋白由来のペプチドすべてが CS 380-395 のビオチン化ペプチドと競合した。同様に DRB5 \* 0102 分子で結合したペプチドのうち実験を行ったすべてのペプチドすべてが HA 307-319 のビオチン化ペプチドと競合した。したがってこれらのペプチドと HLA 分子の結合部位は同一の部位であると考えられる。

#### 6. M 蛋白および合成ペプチド特異的 T 細胞株の増殖反応

DR 4 サブタイプ (DRB1 \* 0405/0406) を持つ健康人の PBL からリコンビナント M 蛋白を用いて特異的 T 細胞株を樹立した。個々の M 蛋白由来のペプチドを抗原とし、自己の PBL を抗原提示細胞としてこの T 細胞株の増殖反応を測定したところ M12 (4), M12 (14), M12 (22), M12 (26) で有意の増殖反応が見られた。次に合成ペプチド M12 (4), M12 (14), M12 (22), M12 (26) を用いて PBL からペプチド特異的 T 細胞株をそれぞれ樹立し、これらの T 細胞株の拘束分子を形質転換細胞を用いて決定した。M12 (4), M12 (14), M12 (26) のペプチドから得られた特異的 T 細胞株は DRB1 \* 0406 拘束性であり、M12 (22) のペプチドから得られた特異的 T 細胞株は DRB1 \* 0405 拘束性であった (図 4)。また DRB1 \* 0406 を持つ健康人 (DRB1 \* 0406/0803) の PBL からは M12 (4), M12 (26) 特異的 T

表1 ビオチン化ペプチドと HLA 分子との結合に対する非ビオチン化ペプチドによる競合実験

| Doses of peptide incubated with L cell transfectant |                                           |                                            |                                            |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| biotinylated peptide<br>$\mu\text{M}$               | non-biotinylated peptide<br>$\mu\text{M}$ | observed value<br>(MESF $\times 10^{-3}$ ) | Expected value<br>(MESF $\times 10^{-3}$ ) |
| 150                                                 |                                           | 100                                        |                                            |
| 120                                                 |                                           | 98                                         |                                            |
| 100                                                 |                                           | 88                                         |                                            |
| 60                                                  |                                           | 75                                         |                                            |
| 50                                                  | 100                                       | 33                                         | 33                                         |
| 20                                                  | 100                                       | 10                                         | 13                                         |
| 20                                                  | 80                                        | 25                                         | 18                                         |
| 20                                                  | 40                                        | 25                                         | 25                                         |

DRB1 \* 0405 (DR 4) の遺伝子を導入した形質転換細胞 (LDR 4-Dw 15) に CS 380-395 のビオチン化ペプチドと非ビオチン化ペプチドを同時に加え 4 時間培養しアビジン-フィコエリスリンを加えフローサイトメトリーで定量化した。理論値としては加えたビオチン化ペプチドと非ビオチン化ペプチドとの合計と等モルのビオチン化ペプチドの MESF にビオチン化ペプチドと非ビオチン化ペプチドの合計した量のうちのビオチン化ペプチドの量の割合を掛けた値である。

表2 DRB1 \* 0405 及び DRB5 \* 0102 分子と M12 タンパク由来のペプチドとの結合親和性の比較

| NO. | POSITION | SEQUENCE OF PEPTIDES        | DR31*0405 (DR4) |                                 | DR35*0102 (DR51) |                                 |
|-----|----------|-----------------------------|-----------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|
|     |          |                             | R.B.U.          | CS 380-395 (%)<br>OF INHIBITION | R. B. U.         | HA 307-319 (%)<br>OF INHIBITION |
| 1   | 1-25     | DHSDLVAEKQRLEDLGQKFERIKQR   | *               | —                               | 0.3              | 83                              |
| 2   | 15-36    | LGQKFERIKQRSELYLQYYDN       | 2.2             | 70                              | 1.1              | —                               |
| 3   | 37-59    | KSNQYKGDWYVQQLKMLNRDLEQ     | 2.8             | 60                              | 4.8              | 28                              |
| 4   | 50-72    | LKMLNRDLEQAYNELSGEAHKDA     | 1.0             | 72                              | 1.2              | 81                              |
| 5   | 62-83    | NELSGEAHKDALGKLGIDNADL      | *               | —                               | *                | —                               |
| 6   | 73-96    | LGKLGIDNADLKAKITELEKSVEE    | 1.0             | 95                              | *                | —                               |
| 7   | 97-120   | KNDVLSQIKKELEEAEDIQFGRE     | *               | —                               | *                | —                               |
| 8   | 112-136  | EKDIQFGREVHAADLLRHKQEI AEK  | 0.9             | 69                              | 0.3              | 81                              |
| 9   | 128-151  | RHKQEI AEKENVISKLNGELQPLK   | 0.1             | 95                              | 0.4              | 81                              |
| 10  | 152-175  | QKVDETDNRNLQKEKQKVL SLEQQL  | *               | —                               | *                | —                               |
| 11  | 165-187  | KQKVL SLEQQLAVTKENAKKDFE    | 0.1             | —                               | 2.3              | 85                              |
| 12  | 177-200  | VTKENAKKDFELAALGHQLADKEY    | 1.1             | 50                              | 1.3              | 76                              |
| 13  | 190-212  | ALGHQLADKEYNAKIAELESKLA     | 0.7             | 75                              | 0.4              | 82                              |
| 14  | 202-225  | AKIAELESKLADAKKDFELAALGH    | 0.7             | 90                              | 0.5              | 72                              |
| 15  | 216-239  | KDFELAALGHQHAHNEYQAKLA EK   | 0.6             | 80                              | 3.2              | 76                              |
| 16  | 229-253  | HNEYQAKLA EKFDGQIKQLEE QKIL | 0.1             | 84                              | *                | —                               |
| 17  | 243-266  | IKQLEE QKIL DASKRG TARDLEA  | *               | —                               | *                | —                               |
| 18  | 256-292  | SRKGTARDLEAVRQAKKATEAELN    | *               | —                               | 3.1              | 92                              |
| 19  | 282-300  | KAELAKVTEQKQILDASKR         | 0.1             | 84                              | *                | —                               |
| 20  | 327-346  | NKISEASRKGLRRDLASRE         | *               | —                               | *                | —                               |
| 21  | 301-325  | GTARDLEAVRKAKAQVEAALKQLEE   | 0.3             | 72                              | 0.9              | 55                              |
| 22  | 347-367  | AKKQVEKDLANLTAELDKVKE       | 1.7             | 60                              | *                | —                               |
| 23  | 368-389  | EKQISDASRQLRRDLARSE         | *               | —                               | 0.5              | 85                              |
| 24  | 316-340  | VEAALKQLEE QNKISEASRKGLRRD  | *               | —                               | *                | —                               |
| 25  | 357-378  | NLTAELDKVKEEKQISDASRQG      | *               | —                               | *                | —                               |
| 26  | 389-409  | AKKQVEKALEEANSKLAALEK       | 0.6             | 55                              | 1.4              | 84                              |
| 27  | 400-420  | ANSKLAALEKINKELEESKKL       | 0.3             | 85                              | *                | —                               |
| 28  | 410-430  | LNKELEESKKLTEKEKAELQA       | *               | —                               | *                | —                               |
| 29  | 421-440  | TEKEKAELQAKLEAEAKALK        | *               | —                               | *                | —                               |
| 30  | 431-451  | KLEAEAKALKEQLAKQAEELA       | *               | —                               | 0.3              | 78                              |
| 31  | 441-460  | EQLAKQAEELAKLRAGKASD        | *               | —                               | 3.2              | 62                              |

\*は検出限界以下 —は not determined

細胞株を、また DRB1 \* 0405 を持つ健常人 (DRB1 \* 1502/0405) 2 名からは M12 (22) 特異的 T 細胞株を得ることが出来た。

#### 7. DR4 サブタイプを発現した形質転換細胞を抗原提示細胞として用いた T 細胞増殖反応

M12 (4) ペプチドを用いて DRB1 \* 0406 を持つ健常人の PBL から M12 (4) 特異的 T 細胞株を樹立したところ、上述したように DRB1 \* 0406 に拘束された T 細胞株が得られた。これらの T 細胞株のペプチド特異的応答性を DR4 サブタイプ (DRB1 \* 0401, 0402, 0403, 0404, 0405) を発現した形質転換細胞を

抗原提示細胞として測定した結果、自己の HLA である DRB1 \* 0406 分子以外に DRB1 \* 0403 あるいは DRB1 \* 0404 分子存在下で抗原特異的増殖反応を示す株が存在した (表3)。一方、DRB1 \* 0403 を持つ健常人 (DRB1 \* 0403/—) の PBL から得られた DRB1 \* 0403 に拘束された T 細胞株は自己の HLA である DRB1 \* 0403 以外に DRB1 \* 0406 分子の存在下で増殖反応を示した。

#### 8. DRB1 \* 0406 分子における結合親和性の測定

DRB1 \* 0406 分子を発現する形質転換細胞を用いて M12 蛋白由来のペプチドとの結合親和性を測定し、

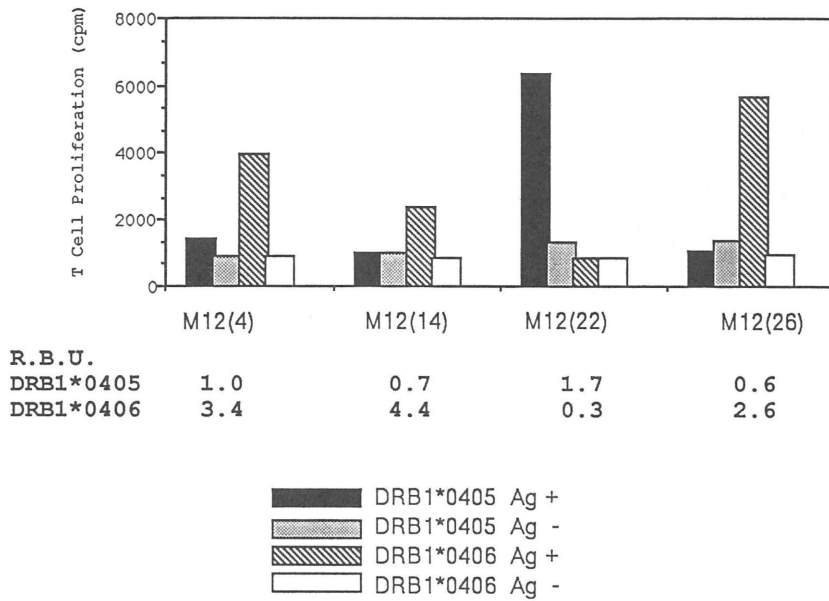


図 4 M12 ペプチド特異的 T 細胞株の拘束分子の決定

M12 ペプチドである M12(4), M12(14), M12(22), M12(26) を用いて M12 特異的 T 細胞株を樹立しその拘束分子を形質転換細胞を用いて決定した(方法 6 の項を参照のこと)。抗原はそのペプチド特異的 T 細胞株を樹立したペプチドを  $2\mu\text{M}$  をもちいた。また図の下にはそれぞれのペプチドでの R. B. U. を記載した。

表 3 DR 4 サブタイプ間におけるアミノ酸配列の違いとそれぞれの遺伝子を導入した形質転換細胞を抗原提示細胞として用いた時の M 12(4) 特異的 T 細胞株の増殖反応

|                    |                                                      | DRB 1*0401                 | 0402          | 0403            | 0404           | 0405          | 0406           | L-neo         |
|--------------------|------------------------------------------------------|----------------------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| Amino Acid Residue | 37                                                   | Y                          | Y             | Y               | Y              | Y             | S              |               |
|                    | 57                                                   | D                          | D             | D               | D              | S             | D              |               |
|                    | 67                                                   | L                          | I             | L               | L              | L             | L              |               |
|                    | 70                                                   | Q                          | D             | Q               | Q              | Q             | Q              |               |
|                    | 71                                                   | K                          | E             | R               | R              | R             | R              |               |
|                    | 74                                                   | A                          | A             | E               | A              | A             | E              |               |
|                    | 86                                                   | G                          | V             | V               | V              | G             | V              |               |
|                    |                                                      | T cell proliferation (cpm) |               |                 |                |               |                |               |
|                    |                                                      | DRBI*0401                  | 0402          | 0403            | 0404           | 0405          | 0406           | L-neo         |
| a)                 | Line from donor                                      |                            |               |                 |                |               |                |               |
|                    | DRB 1*0406/0803                                      | 318<br>(1.8)               | 615<br>(1.1)  | 7324<br>(7.8)   | 1030<br>(1.0)  | 925<br>(0.9)  | 9574<br>(12.2) | 689<br>(1.0)  |
|                    | DRB 1*0406/0405                                      | 2806<br>(1.2)              | 1091<br>(0.6) | 13320<br>(5.5)  | 12083<br>(4.4) | 3477<br>(2.8) | 8258<br>(5.2)  | 2811<br>(1.0) |
|                    | DRB 1*0406/0405                                      | 763<br>(0.9)               | 1237<br>(1.4) | 12181<br>(13.7) | 953<br>(1.1)   | 1431<br>(1.6) | 3982<br>(4.4)  | 892<br>(1.0)  |
|                    | DRB 1*0403/-                                         | 746<br>(0.9)               | 1092<br>(0.7) | 5143<br>(2.8)   | 925<br>(0.8)   | 1049<br>(0.8) | 5887<br>(6.2)  | 943<br>(0.8)  |
|                    | Binding affinity                                     |                            |               |                 |                |               |                |               |
| b)                 | R. B. U.                                             | 1.2                        | 1.2           | 2.1             | 2.4            | 1.0           | 3.4            |               |
| c)                 | Value of HLA-peptide comple<br>MESF $\times 10^{-3}$ | 5.3                        | 18.0          | 4.4             | 53.5           | 28.8          | 43.2           |               |

a) ( ) は stimulation index

b) M 12(4) ペプチドとの結合親和性

c) DR 4 サブタイプのそれぞれの形質転換細胞の 1 細胞当たりの M 12(4) ペプチドでの蛍光強度(MESF)

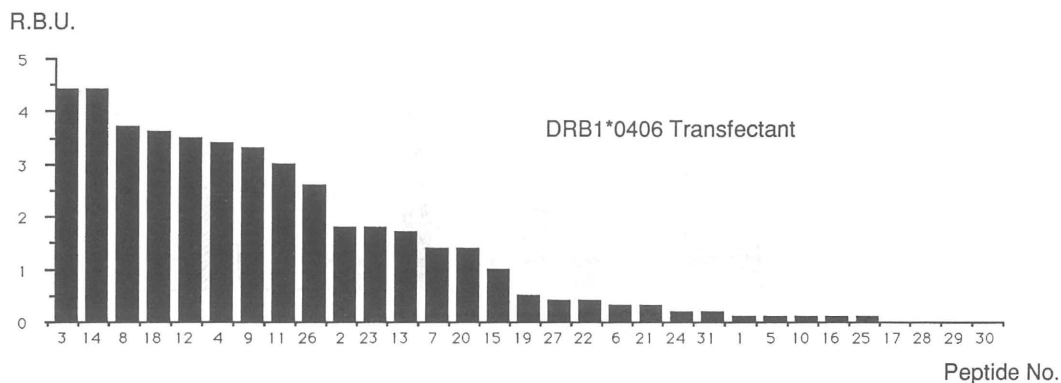


図5 DRB1 \* 0406 分子と M12 ペプチドとの結合親和性

DRB1 \* 0405 の結合親和性と比較したところ (表2, 図5), 全体的に DRB1 \* 0406 とこれらのペプチドとは高い結合親和性を示した。さらに DRB1 \* 0406 を持つ健康人の PBL から特異的 T 細胞株を得ることができた M12 (4), M12 (14), M12 (26) のペプチドはいずれも高い結合親和性を有していた。しかしながら, DRB1 \* 0405 拘束性 T 細胞株の得られた M12 (22) についてみれば DRB1 \* 0405 との結合親和性は高かったが DRB1 \* 0406 との結合親和性は低かった。

#### 9. DR 4 サブタイプ間の M12 (4) ペプチドとの結合親和性の差異

DR 4 サブタイプ (DRB1 \* 0401-0406) 間におけるアミノ酸の多型が M12 (4) ペプチドとの結合親和性に影響を与えるかを DR 4 サブタイプをそれぞれ発現した形質転換細胞を用いて比較した (表3)。M12 (4) ペプチドとの結合親和性は DRB1 \* 0406 で最も高く, 続いて DRB1 \* 0404, DRB1 \* 0403 と高かった。それぞれの形質転換細胞により DR 4 分子の発現量が異なっていたため, 細胞の蛍光強度は DRB1 \* 0404 で最も高く DRB1 \* 0406, 0405 と続き DRB1 \* 0403 の形質転換細胞で最も低かった。

#### 考 察

最近, HLA クラス II DR 分子と外来抗原ペプチドとの結合親和性を調べる実験はいくつか報告されてきた<sup>2)(3)(5)-7)(9)-21)(27)</sup>。これらの方法は主として精製した DR 分子と<sup>125</sup>I でラベルしたペプチドを用いて HLA-ペプチド複合体の量を測定する方法<sup>6)(11)(17)-19)</sup>と細胞表面上の HLA 分子とビオチン化ペプチドの複合体の量

を蛍光強度としてフローサイトメトリーで測定する方法<sup>2)(3)(13)(20)(21)</sup>が用いられている。後者においては異なった HLA クラス II 分子 (DR, DQ, DP) を同時に発現している B 細胞株が利用されているため, どの HLA 分子と結合したのかについて疑問が残されていたが, 本研究では単一の HLA 分子を発現した形質転換細胞を用いることで特定の HLA 分子へのペプチドの結合量を測定する系を開発した。またビオチンが Lys の ε-アミノ基に結合した場合<sup>19)(20)</sup>, これが HLA との結合に影響を与える可能性があるが, 今回 N 末端のみにビオチンを導入することによってペプチドの立体障害を最小限にすることができた。さらに細胞表面上の HLA 分子の発現量が異なるためペプチドとの結合量を異なる細胞間で比較するのが困難であったが, 本研究で細胞表面上の HLA 分子数によって補正することで異なった細胞を用いた HLA 分子とペプチドとの結合親和性の比較を試みた。図3に示したように, HLA 分子の発現量の増加に比例して HLA 分子のペプチドとの結合量が増加することから HLA 分子の発現量の異なった形質転換細胞間で HLA 分子とのペプチドの結合親和性を比較することが可能であると考えられた。次にビオチン化することによって HLA-ペプチドの結合性に影響がみられるかどうかを検討するために非ビオチン化ペプチドによる競合実験を行った。ビオチン化した HA 307-319, CS 380-395 ペプチドと HLA 分子の結合は非ビオチン化ペプチドで競合し, 実際に非ビオチン化ペプチドでビオチン化ペプチドと HLA 分子の結合を抑制した値が濃度依存性曲線から求めた理論と一致することからビオチン化による結合親和性の変化は小さいものと考えられた。また DRB1 \* 0405 分子と CS 380-395 との結合は M12 ペプチドに

よって競合することから M 12 ペプチドが CS 380-395 と HLA DRB 1 \* 0405 分子の同じ部位, おそらくは結晶解析<sup>9)</sup>により示されたグループに結合していると考えられた。また, 健康人 (DRB 1 \* 0405/0406) の PBL からリコンビナント M 12 蛋白を用いて樹立した T 細胞株では M 12 (4), M 12 (14), M 12 (26) および M 12 (22) のペプチドに特異的に増殖反応を示した。これらのペプチドで PBL から特異的な T 細胞株を樹立し拘束分子を決定したところ, M 12 (4), M 12 (14), M 12 (26) は DRB 1 \* 0406 で M 12 (22) は DRB 1 \* 0405 であった。また DRB 1 \* 0406 を持つ健康人からは M 12 (22) 特異的な T 細胞株を, あるいは DRB 1 \* 0405 を持つ健康人からは M 12 (4), M 12 (14), M 12 (26) のそれぞれのペプチド特異的な T 細胞株を樹立することが出来なかった。これらのペプチドでの HLA-DR 4 分子との結合親和性を調べたところ M 12 (4), M 12 (14), M 12 (26) は DRB 1 \* 0406 分子に M 12 (22) は DRB 1 \* 0405 分子に高い結合性を示し (図 4, 表 2), M 12 (22) は DRB 1 \* 0406 分子とは低い結合性を示した。このことから, T 細胞の増殖反応を起こすペプチドは HLA 分子との結合親和性が高いと推測できる。

抗原特異的な T 細胞は自己の HLA 分子により抗原提示を受け非自己の HLA 分子では抗原提示されないことが知られている。しかしながら今回, DRB 1 \* 0406 を持つ健康人から得られた DRB 1 \* 0406 拘束性 M 12 (4) 特異的な T 細胞株は抗原提示細胞として自己の HLA 分子である DRB 1 \* 0406 とそれ以外の DRB 1 \* 0403 あるいは DRB 1 \* 0404 に反応する株が得られた。また DRB 1 \* 0403 を持つ健康人から得られた DRB 1 \* 0403 拘束性 M 12 (4) 特異的な T 細胞株についても自己の HLA である DRB 1 \* 0403 と非自己の HLA 分子である DRB 1 \* 0406 を抗原提示分子としても増殖反応を示す株が得られた。同様の報告は WEYAND<sup>32)</sup>ら, ECKELS<sup>7)</sup>らや DEMOTZZ<sup>6)</sup>らによってなされている。DEMOTZ らは破傷風毒素のペプチドを用い  $\beta$  86 のバリンとグリシンの違いによりペプチドと HLA 分子との結合には違いが存在しても, DRB 1 \* 1101 拘束性の T 細胞クローンが DRB 1 \* 1104 をも拘束分子とすることができることから  $\beta$  86 は T 細胞レセプターによる認識には影響しないと報告している。われわれはこの M 12 (4) ペプチドや M 12 (4) 特異的な T 細胞株を用いて HLA 分子の多型がペプチドとの結合親和性や T 細胞の認識にどのような影響をあたえるかを検討してみた。DRB 1 \*

0406 拘束性の M 12 (4) 特異的な T 細胞株は DRB 1 \* 0403 を抗原提示分子とした場合, すべての株で増殖反応を示したが, DRB 1 \* 0404 を抗原提示分子として用いた場合, 増殖反応を示す株と示さない株が存在した。これは M 12 (4) ペプチドはすべての DR 4 サブタイプと複合体を形成し, 形質転換細胞での複合体の量は DRB 1 \* 0404 が最も多かったことから, この現象は M 12 (4) と DRB 1 \* 0404 との複合体を形成しないためではなく, この M 12 (4) と DRB 1 \* 0404 との複合体を認識できる T 細胞株と認識できない T 細胞株が存在しているためだと考えられる。また DRB 1 \* 0403 を持つ健康人の PBL から得られた DRB 1 \* 0403 拘束性の M 12 (4) 特異的な T 細胞株も DRB 1 \* 0406 は認識できたが DRB 1 \* 0404 を認識することが出来なかった。DR 4 サブタイプ間でのアミノ酸の多型をみると DRB 1 \* 0406 と DRB 1 \* 0403 とは 37 番目残基のセリンとチロシンの違いしか存在せず, また DRB 1 \* 0403 と DRB 1 \* 0404 とは 74 番目のアラニンとグルタミン酸の違いしか存在していない (表 3)。DRB 1 \* 0403 と DRB 1 \* 0406 の違いを多くの T 細胞株が認識できないことより, 37 番目のアミノ酸 (セリン, チロシン) の違いよりもむしろ 74 番目のアミノ酸 (アラニン, グルタミン酸) の違いの方が T 細胞の認識に強い影響を与えていると考えられる。最近報告された DR の結晶解析から推定すると 37 番目のアミノ酸残基は DR 分子の底面部の  $\beta$  シートに存在しており T 細胞はこの部分の違いを認識することができず, これに対し 74 番目残基は DR 分子の壁面を構成する  $\alpha$  ヘリックスに存在するため, T 細胞による認識に影響するのではないかと推測された。しかしながら, M 12 (4) ペプチドの DR 4 サブタイプ間 (DRB 1 \* 0401-0406) におけるペプチドとの結合親和性を比較すると細胞上の HLA 分子とペプチドの複合体の量は DRB 1 \* 0404 (53.5) が最も高く, 続いて DRB 1 \* 0406 (43.2), DRB 1 \* 0405 (28.8) と続き, DRB 1 \* 0403 (4.4) が最も低かった。これを HLA 分子の発現量で補正したところ M 12 (4) への結合親和性は DRB 1 \* 0406 (3.4) が最も高く, DRB 1 \* 0404 (2.4), DRB 1 \* 0403 (2.1) の順となった (表 3)。HLA-DR 4 分子のアミノ酸の多型がこのペプチドとの結合親和性に影響を与えていると考えられる。

このことから, M 12 (4) ペプチドを用いた HLA 分子との結合親和性および T 細胞による認識性を比較することで, HLA 分子のアミノ酸残基 1 個のみの違いによっても抗原ペプチドとの結合度, T 細胞認識の

いずれもが変化するが、その変化の程度は相違するアミノ酸残基の部位によって異なることが明らかになった。

今後、HLA 分子とペプチドとの結合親和性をさらに解析することにより、これまで蛋白で行われた HLA に相関したヒトの外来抗原に対する免疫応答をより明らかにできることが期待される。

## 総 括

著者は、HLA 分子とペプチドとの結合親和性を定量化するために DRB 1 \* 0405 および DRB 5 \* 0102 の遺伝子を導入した形質転換細胞を用いた系を樹立した。この系を用いて DR 4 サブタイプ間の多型が HLA 分子とペプチドとの結合および T 細胞の増殖反応にどのような影響を与えるかを調べた。そして DR- $\beta$  鎖の 37 番目の変異はペプチドと HLA 分子との結合に大きな変化がない場合は T 細胞の認識に影響を与えないこと、また DR- $\beta$  鎖の 74 番目の多型が結合に大きな変化がない場合でも T 細胞の認識に関与していることを明らかにした。

稿を終るにあたり、直接御指導、御校閲を賜りました、笹月健彦教授に心より感謝いたします。また、研究の機会を与えて頂きました岡増一郎教授に感謝いたします。形質転換細胞を提供していただきました J. BODOMER 教授、R. KARR 教授、R. LECHLER 教授に感謝します。また、研究の遂行に御協力頂いた、熊本大学大学院医学研究科免疫識別講座の西村泰治教授、また木村彰方助教授、上川路信博助手、董瑞平学兄、森一博博士、藤田由香利女史をはじめとする遺伝学教室の方々に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Auffray C and Strominger JL: Molecular genetics of the human major histocompatibility complex. *Adv. Hum. Genet.* 15: 197-247, 1986.
- 2) Bordignon PP, Fu X, Lanzavecchia A and Karr RW: Identification of HLA-DR  $\alpha$  chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J. Exp. Med.* 176: 1779-1784, 1992.
- 3) Busch R, Mark hill C, Hayball JD, Lamb JR and Rothbard JB: Effect of natural polymorphism at residue 86 of the HLA-DR  $\beta$  chain on peptide binding. *J. Immunol.* 147: 1292-1298, 1991.
- 4) Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger LJ and Wiley DC: Three-dimensional structure of human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33-39, 1993.
- 5) Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali AA, Lane WS and Strominger JL: Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178: 27-47, 1993.
- 6) Demotz S, Barbey C, Corradin G, Amoroso A and Lanzavecchia A: The set of naturally processed peptides displayed by DR molecules is tuned by polymorphism of residues 86. *Eur. J. Immunol.* 23: 425-432, 1993.
- 7) Eckels DD, Geiger MJ, Sell TW and Gorski JA: Involvement of class II  $\beta$  chain amino acid residues 85 and 86 in T-cell allorecognition. *Human Immunol.* 27: 240-253, 1990.
- 8) Fujisawa K: Functional difference between HLA-DR and HLA-DQ molecules in mixed lymphocyte reaction. *Fukuoka Acta medica* 80: 49-59, 1989.
- 9) Hammer J, Valsasini P, Tolba K, Bolin D, Higelin J, Takacs B and Sinigaglia F: promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 74: 197-203, 1993.
- 10) Kilgus J, Jardetzky T, Gorga JC, Trzeciak A, Gillesen D and Sinigaglia F: Analysis of the permissive association of a malaria T cell epitope with DR molecules. *J. Immunol.* 146: 307-315, 1991.
- 11) Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI: Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-phase synthesis of Peptides. *Analytical. Bio. Chemical.* 34: 595-598, 1970.
- 12) Krieger JI, Karr RW, Grey HM, Yu WY, O'Sullivan D, Batovsky L, Zheng ZI, Colon SM, Gaeta FCA, Sindney J, Albertson M, Guercio MF, Chesnut RW and Sette A: A single amino acid change in DR and antigen define residues critical for peptide-MHC binding and T cell recognition. *J. Immunol.* 146: 2331-2340, 1991.
- 13) Kropshofer H, Max H and Kalbacher H: Evidence for co-binding of self- and allopeptides to human class II major histocompatibility antigen DR1 by energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 403-407, 1993.
- 14) Mark Hill C, Jone D, Hayball, Ann a. Allison and Rothbard JB: Conformational and structural characteristics of peptides binding to HLA-DR molecules. *J. Immunol.* 147: 189-197, 1990.
- 15) Nelson CA, Petzold SJ and Unanue ER: Identification of two distinct properties of class II major histocompatibility complex-association peptides. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 90: 1227-1231, 1993.
- 16) Newton-Nash DK and Echeles DD: Differential effect of polymorphism at HLA-DR1  $\beta$  chain position 85 and 86 on binding and recognition

of DR1-restricted antigenic peptides. *J. Immunol.* 150: 1813-1821, 1993.

17) O'Sullivan D, Sindey J, Appella E, Walker L, Phillips L, Colon S M, Miles C, Chesnut R W and Sette A: Characterization of the specificity of peptide binding to four DR hyplo type. *J. Immunol.* 145: 1779-1808, 1990.

18) O'Sullivan D, Sindey J, Guerico MFD, Colon SM and Sette A: Truncation analysis of several DR binding epitopes. *J. Immunol.* 146: 1240-1246, 1991.

19) O'Sullivan D, Arrhenius T, Sidney J, Guercio MD, Alberton M Wall M, Oseroff C, Southwood S, Colon SM, Gaeta CA and Sette A: On the interaction of promiscuous antigenic peptide with different DR alleles. *J. Immunol.* 147: 2663-2669, 1991.

20) Rothbard JB, Busch R, Howland K, Bal V, Fenton C, Taylor WR and Lamb JR: Structural analysis of a peptide-HLA class II complex: identification of critical interactions for its formation and recognition by T cell receptor. *Int. Immunol.* 1: 479-486, 1989.

21) Rothbard JB, Rothbard B, Bal V, Trowsdale J, Lechier RI and Lamb JR: Reversal of HLA restriction by a point mutation in an antigenic peptide. *Int. Immunol.* 1: 487-495, 1989.

22) Sasazuki T, Kaneoka H, Nishimura Y, Kaneoka R, Hayama M and Ohkuni H: An HLA linked immune suppression gene in man. *J. Exp. Med.* 153: 297-313, 1980.

23) Sasazuki T, Kohno Y, Iwamoto I, Tanimura M and Nito S: Association between an HLA haplotype and low responsiveness to tetanus toxoid in man. *Nature* 272: 359-361, 1978.

24) Sasazuki T, Nishimura Y, Kikuchi I, Hirayama K, Tsukamoto K, Yasunami M, Matsushita S, Muto M, Sone T and Hirose T: HLA-linked immune suppression gene maps within HLA-DQ sub-

region. Regulation of immune gene expression: 197-206, The Human Press. Inc U. S. A, 1986.

25) Sasazuki T, Ohta N, Kaneoka R and Kojima S: Association between an HLA haplotype and low responsiveness to shistosomal worm antigen in man. *J. Exp. Med.* 152: 314-318, 1980.

26) Schwartz RH: T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of MHC-complex. *Annu. Rev. Immunol.* 3: 237, 1985.

27) Sidney J, Oseroff C, Southwood S, Wall M, Ishioka G, Koning F and Sette A: DRB1 \* 0301 molecules recognize a structural motif distinct from the one recognized by most DR $\beta$  alleles. *J. Immunol.* 149: 2634-2640, 1992.

28) Singaglia F, Guttinger M, Kilgus J, Doran D M, Matil H, Etlinger H, Trzeciak A, Gillespie D and Pink J R L: A malaria T-cell epitope recognized in association with mouse and human MHC class II molecules. *Nature* 336: 778-781, 1988.

29) Trowsdale J, Young JAT, Kelly AP, Austin PJ, Carson S, Meunier H, So A, Erlich HA, Spielman RS, Bodmer J and Bodmer WF: Structure, sequence and polymorphism in HLA-D region. *Immunol. Rev.* 85: 5-43, 1985.

30) Yasunami M: Structural analysis of human major histocompatibility complex class II genes. *Fukuoka Acuta Medica* 79: 153-167, 1988.

31) Kimura A, Dong R P, Harada H and Sasazuki T: DNA typing of HLA class II gene in B lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. *Tissue Antigen*, in press

32) Weyand CM and Goronzy JJ: Mapping of allospecific T-cell recognition sites encoded by the HLA-DR4  $\beta$ -chain. *Human Immunol.* 24: 133-143, 1989

(受付 1994-1-5)