

第 66 回総会シンポジウム

Ⅲ. 結核研究における遺伝子工学の応用

座長 徳 永 徹 (国立予防衛生研究所)

受付 平成 3 年 6 月 20 日

The 66th Annual Meeting Symposium

Ⅲ. APPLICATION OF GENE-TECHNOLOGY TO TUBERCULOSIS RESEARCH

Chairman : Tohru TOKUNAGA *

Symposists :

1. Establishment of a host-vector system in *Mycobacterium bovis* BCG : Yasuo Mizuguchi (University of Occupational and Environmental Health, Department of Microbiology)
2. Study on recombinant BCG : Takeshi Yamada (Nagasaki University, School of Dentistry)
3. Participation of γ/δ -T cells in the protection against mycobacterial infection : Yasunobu Yoshikai (Nagoya University, School of Medicine, Research Institute for Disease Mechanism and Control)
4. Genetic engineering of cytokine system on the tuberculosis research : Kiyoshi Takatsu (Kumamoto University, Medical School, Institute of Immunology)

(Received for publication June 20, 1991)

According to the recent progress of biotechnology, it has become theoretically possible to understand every biological phenomenon by the term of "gene". In mycobacteria, the first successful application of the technology was made in the field of Leprosy. Difficulty of cultivation of *M. leprae* stimulated to introduce the technology into the study field ; for instance, gene cloning of various kinds of leprosy bacillus protein were succeeded, and the existence of $\gamma\delta$ -type T cells responding to the proteins were reported. Following them, gene technology has been introduced into the research field of tubercle bacillus.

By this time, one of the most remarkable success of DNA technology in tuberculosis was seen in the field of "DNA probe diagnosis". PCR technique will be practically applied soon into this field. This topic of diagnosis should be included in this symposium, but it was excluded this time, simply because that the diagnosis techniques were the topics of the symposium of Tuberculosis Society Annual Meeting held in the last year.

The first two papers in this symposium deal with the applications of gene technology to the mycobacteria, and the second two to the host. Through these papers presented by young professors, the chairman hopes that we could learn new aspects of tuberculosis research, and that it could contribute to eradicate tuberculosis from the earth in the future.

* From the National Institute of Health, 2-10-35 Kamiosaki Shinagawa-ku Tokyo 141 Japan.

シンポジスト

1. BCG の宿主・ベクター系の樹立とその応用
水口 康雄 (産業医科大学・微生物学教室)
2. 抗酸菌の抗原性蛋白質の研究
山田 毅 (長崎大学歯学部)
3. ミコバクテリアの感染防御における γ/δ T 細胞の関与
吉開 泰信 (名古屋大学医学部・病態制御研究施設)
4. サイトカインの遺伝子工学とその応用
高津 聖志 (熊本大学医学部・免疫医学研究施設)

バイオテクノロジーの目覚ましい進展により、ヒトを含むすべての生物現象を、遺伝子のレベルで理解することが可能になってきた。今後当分の間、このような方向が医学生物学の一つの大きな主流となるだろう。

抗酸菌研究領域において、遺伝子工学の恩恵を最初に享受したのは、癩の研究である。癩菌が培養不能であること、しかしアルマジロやヌードマウスで増殖可能であることが、癩菌蛋白遺伝子のクローニングから、ストレス蛋白応答性の $\gamma\delta$ T 細胞の発見へと展開するエネルギー源となった。それを追う形で、結核菌研究への遺伝子工学の導入が進められてきたといっていよう。

現在結核の領域で遺伝子工学のもっとも顕著な応用例は「DNA プローブ診断」に見られる。なお種々改善の余地を残してはいるが、すでに診断キットが開発され、実用化の段階に達している。さらに PCR 法を用いて極く微量の結核菌を検出できる日も遠くないと思われる。この領域の問題も、このシンポジウムで取り上げたいと思ったが、昨年の本学会総会シンポジウムで「結核菌検査法の進歩」を取り上げたので、今回は除くことにした。

ここで取り上げた 4 題は、2 題が結核菌側の問題、あと 2 題が宿主側の問題を取り扱っている。菌側の問題については、結核菌蛋白遺伝子のクローニングが進んでおり、その遺伝子の構造からそれら蛋白のあるものが熱ショック蛋白であることも知られるようになった。しかしここでは問題を絞って、BCG への遺伝子導入による抗原変換技術によって新しいワクチンの開発を目指す研究を取り上げることとした。一方、宿主側の問題は極めて多方面にわたるが、感染防御に関わる宿主の細胞性エフェクターとして、細胞内寄生菌のストレス蛋白に対する $\gamma\delta$ T 細胞応答の問題と、液性サイトカインのネットワークの中の IL-5/IL-5 レセプターの問題とを取り上げることとした。4 人の演者として、それぞれの領域で世界の最先端を歩みつつある若い教授たちを並べ得たことを座長として喜びたい。

内容は各演者の抄録のとおりである。4 つの講演を通して、結核関連領域におけるこの 2, 3 年の遺伝子工学の目覚ましい展開の現状を学び、またそれが将来、地上の結核撲滅へと結び付くことを夢み、期待したいと思う。

第 66 回総会シンポジウム

Ⅲ. 結核研究における遺伝子工学の応用

1. BCG の宿主・ベクター系の樹立とその応用

水 口 康 雄 ・ 谷 口 初 美 ・ 有 働 武 三 ・ 秦 明 輝

産業医科大学・微生物学教室

後 藤 義 孝

宮崎大学農学部

徳 永 徹

国立予防衛生研究所

受付 平成 3 年 6 月 20 日

Ⅲ-1. ESTABLISHMENT OF A HOST-VECTOR SYSTEM IN
MYCOBACTERIUM BOVIS BCGYasuo MIZUGUCHI*, Hatsumi TANIGUCHI, Takezo UDOU, QIN Ming Hui,
Yoshitaka GOTO and Tohru TOKUNAGA

(Received for publication June 20, 1991)

The recombinant plasmids, pYT72 and pYT92, were generated from a mycobacterial plasmid, pMSC262, and a *Escherichia coli* plasmid, pACYC177. These plasmids were capable of replication, and of stable maintainance in *Mycobacterium bovis* BCG when introduced by electroporation technique. Efficiency of transformation was about 10^4 transformants/ μ g DNA, and was the highest in the phage sensitive mutants (S-10, S-20) isolated from BCG Tokyo strain. We have also isolated transformable mutants from rapidly growing bacterium, *M. smegmatis* strains Jucho and TMC1533.

By isolating deletion mutants from pYT72/92, we could determine the location of replication region of pMSC262 within a 2.3 kb *Pst* I - *Hind* III fragment. Using this fragment, we constructed "mini" shuttle plasmid pYT937 (5.9 kb in size) which possesses kanamycin and ampicillin resistance markers and replicates in both *E. coli* and *Mycobacterium*.

Nucleotide sequence analysis of the replication region revealed that there are 2 potential coding regions which contain more than 200 amino acids. The largest one (ORF1) which codes 311 amino acids, however, lacks Shine-Dalgarno like sequence in the upstream and therefore may not be functional. The other coding region (ORF2) contains 260 amino acids

* From the Department of Microbiology, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Iseigaoka, Yahatanishiku, Kitakyushu 807 Japan.

and was preceded by Shine-Dalgarno like sequence. Upstream of the ORF2, there were several repeat sequences which may be important in the plasmid replication. GC content of the 2.3 kb fragment was 69.8 %.

Key words : Host-vector system, *Mycobacterium bovis* BCG, Recombinant DNA technology, Transformation

キーワーズ : 宿主・ベクター系, 牛型結核菌 BCG, 遺伝子組換え技術, 形質転換

はじめに

抗酸菌の遺伝学の研究は以前から行われてきたが、大腸菌の宿主・ベクター系を用いたクローニングなどの、いわゆる遺伝子工学の技術を用いた研究が導入されるようになった 1985 年頃を境に、大きな変化と発展を遂げ、重要な発見が毎年のように報告されるようになってきた¹⁾。しかし大腸菌のシステムを用いる限り、抗酸菌の限られた遺伝子のみしか発現されず、多くの重要な遺伝子(群)、例えば多糖体や脂質の合成に関する遺伝子などの解析は不可能であることも同時に明らかになってきた。

クローン化された遺伝子が大腸菌で情報発現を行うためには、その遺伝子上流に存在するプロモーター部が大腸菌によって認識可能な構造でなければならない、抗酸菌の遺伝子の多くは大腸菌では働かない。したがって抗酸菌の遺伝子の構造や情報発現のメカニズム等を明らかにするには抗酸菌自体の宿主・ベクター系を開発する必要がある。

一方、抗酸菌特に BCG を宿主とするベクターが開発されれば、BCG に種々な微生物由来の感染防御抗原の遺伝子を組み込むことによって多用途ワクチンの開発の可能性が開かれることになる²⁾。このようなことから、いくつかの研究室で BCG や *M. smegmatis* を宿主とするベクター系の開発が試みられてきた^{3)~5)}。われわれも数年前から努力を重ねてきた結果、これらの菌および大腸菌の双方で複製可能なシャトルプラスミドを作成することができたので、その概略について報告する。

材料と方法

菌株、ファージおよび培地 : 抗酸菌としては *Mycobacterium bovis* BCG 東京株、*M. smegmatis* の ATCC 607, Jucho, TMC1533 株を含む教室保存株、大腸菌には K12 株の derivative である C600 株を主として用いた。マイコバクテリオファージとしては D29, L1, L2, L5 を使用した。抗酸菌用の培地としては小川培地および Middlebrook 7H9, 7H10 を用いた。

プラスミド : *M. scrofulaceum* W262C 由来のプラス

ミド, pMSC262 (サイズ約 17kb) および大腸菌のプラスミド pACYC177 を用いた。

ファージ感受性変異株の分離 : BCG を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のネトロソグアニジンで処理した後、7H10 培地でコロニーを作らせた。このコロニーをあらかじめ D29 ファージをまいた寒天培地にレプリカ法を用いて移し、増殖できなかったコロニーを拾って、再度ファージ感受性を調べる方法により変異株を分離した。

組換え DNA 技術 : プラスミドの菌体よりの分離、制限酵素による DNA の消化、DNA の組換え、形質転換などは通常の方法によった⁶⁾。制限酵素などの試薬は主として宝酒造より購入したものを使用した。BCG および *M. smegmatis* にプラスミドを導入するための形質転換法としては、島津 SH-1 もしくは Bio Rad 社 Gene Pulser を用いた電気穿孔法により行った。

DNA 塩基配列の決定 : M13 ファージを用いた dideoxy 法⁷⁾ によった。すなわち抗酸菌におけるプラスミドの複製に必要な部分を含む 2.5kb の DNA 断片を M13mp18 および M13mp19 ファージに接続、宝酒造の kilo sequence deletion kit を用いて種々の欠損変異株を分離し、各々について塩基配列を決定した。データの解析は日立ソフトウェアの DNASIS を用いて行った。

結 果

BCG よりファージ感受性変異株の分離 : 当初の予想では、抗酸菌を宿主とするベクター系を開発するためには、①宿主菌が導入される異種微生物由来の DNA を制限することのないようなものであること、②高率に DNA を取り込むことが出来るような形質転換法を確立すること、③抗酸菌内で安定に複製しかつ選択のためのマーカーを有するプラスミドを作成すること、の 3 つのハードルを越えねばならないことが考えられた。この点に関しては、*M. smegmatis* ATCC607 や Jucho 株は事実上すべてのマイコバクテリオファージに感受性であり DNA の制限系を持たない菌と考えられたが、BCG に関してはいくつものファージに対して感受性が低く、おそらく制限系を有しているものと思われた。そこで BCG から制限系を欠失した変異株を分離することを目

的としてニトロソグアニジンによる処理を行い、大多数のファージに対して感受性が ATCC607 と同様に上昇した変異株、S-10、および S-20 株を分離した。

組換えプラスミド pYT72/pYT92 の作成と BCG の形質転換：これまで知られている抗酸菌のプラスミドはいずれも選択のためのマーカーを持たないため、そのままではベクターとしては使用できない。ところが Snapper ら³⁾により BCG における形質転換には、電気穿孔法が有効であること、大腸菌の薬剤耐性遺伝子が BCG でも働き得ること、などが示されたので、われわれは *M. scrofulaceum* 由来のプラスミド、pMSC262 と大腸菌由来のカナマイシンおよびアンピシリン耐性遺伝子を有するプラスミド、pACYC177 から Fig. 1 に示すような組換えプラスミド pYT72 および pYT92 を作成し、BCG に対する形質転換を試みた。これらのプラスミドはいずれも同じ DNA 断片よりなるが、組み込まれた方向が逆になっている。

これらの組換えプラスミドを電気穿孔法により BCG S-10 株に導入してカナマイシン耐性の形質転換細胞が出現するか否かを調べたところ、Fig. 2 に示すように電気により穿孔を行ったサンプルからは多数のカナマイシン耐性のコロニーの出現が見られたが、プラスミドを加えても穿孔を行わなかったサンプルからは全く耐性菌の出

現は認められなかった。

この耐性菌の出現が形質転換によるものであり、単なる突然変異によるものでないことを確認するため、これらの菌におけるプラスミドの存在を確かめたところ、形質転換に用いたものと全く同じサイズのプラスミドが存在すること、制限酵素による切断のパターンも全く同じであることが判明した。またカナマイシン耐性はきわめて安定であり、継代培養を繰り返しても感受性の菌はほとんど出現しないことも明らかになった。

以上のことから、pMSC262 と pACYC177 より作成した組換えプラスミド pYT72/92 は BCG および大腸菌の両方で複製が可能であること、大腸菌のカナマイシン耐性遺伝子が BCG でも情報発現が可能であること、BCG における複製はきわめて安定であり、また複製の過程において DNA にほとんど変化は起こっていないらしいこと、などのことが明らかになった。

またこれらの形質転換細胞が示す薬剤耐性のパターンを見ると、カナマイシン、ネオマイシン、パロモイシン、リビドマイシン、およびブチロシンに耐性であり、一方ゲンタミシンおよびアミカシンには感受性を示すなど、pACYC177 を保持する大腸菌の耐性パターンと全く同じであることが判明した。

次に BCG 東京株およびこれより分離した S-10、S

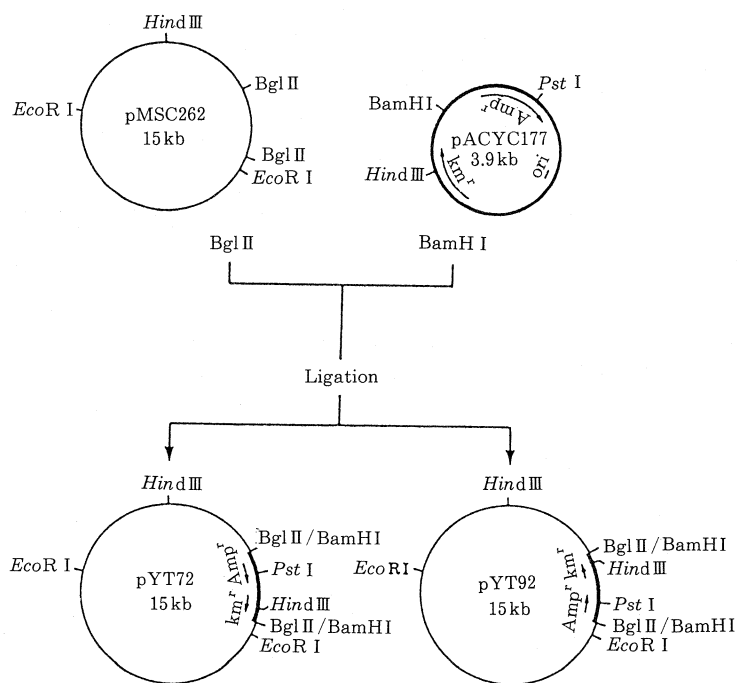


Fig. 1. Construction of pMSC262 :: pACYC177 recombinant shuttle plasmids

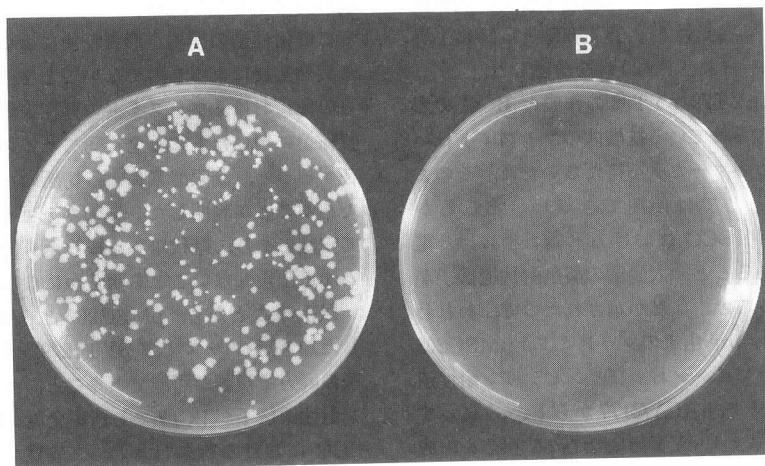


Fig. 2. Transformation of BCG S-10 with shuttle plasmid pYT72 with (A) and without (B) electroporation

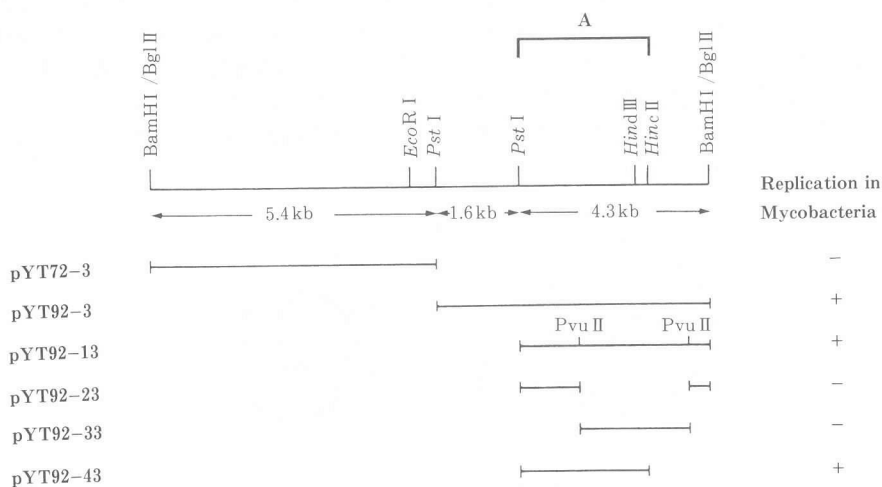


Fig. 3. Deletion mapping of the replication region of pMSC262

—20株、パスツール株について形質転換の効率を比較した。その結果、すべての株が形質転換能を持つことが判明したが、その率はS-10およびS-20が最も高く、ついで東京株が続き、パスツール株については理由は不明であるが最も低いことが知られた。また初期の頃はS-10株を用いてもプラスミドDNA 1 μ g 当たり $10^2 \sim 10^3$ の形質転換細胞が得られる程度であったが、BCGの前培養の日数や電気穿孔を行う際の条件を種々検討した結果、プラスミドDNA 1 μ g 当たりの効率を 10^4 程度に高めることが可能となった。

M. smegmatis における形質転換：宿主菌としての

BCGは発育が遅く、コロニーの出現までに3週間程度を必要とするため、*M. smegmatis* を宿主として用いることができればいろいろ便利なが期待できる。そこでATCC607, Jucho, TMC1533などの菌株を用いて形質転換を試みたが、いずれの菌からも全く形質転換細胞は得られないことが判明した。しかし、JuchoおよびTMC1533株からSnapper[®]が開発した方法を用いて変異株を分離したところ、いずれもpYT72に対して高頻度に形質転換が行われることが見いだされた。このようにして得られた菌株をそれぞれJ15C, TMC1533Cと命名した。

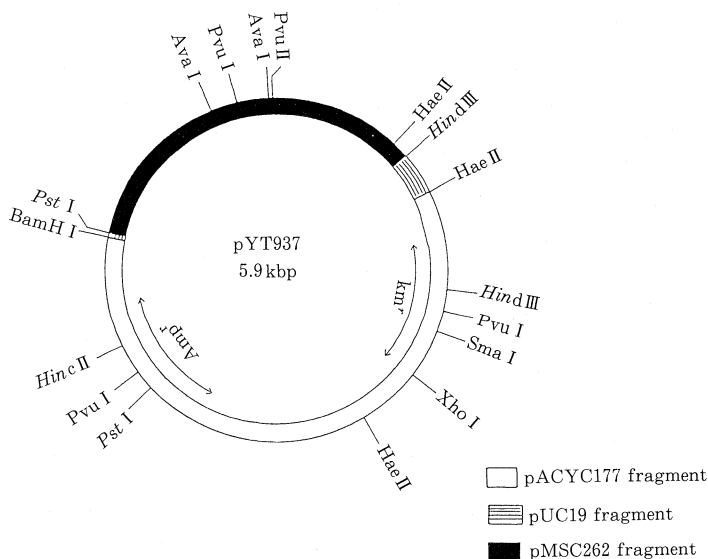


Fig. 4. The structural map of shuttle plasmid pYT937

Km^r : kanamycin resistance gene

Amp^r : ampicillin resistance gene

抗酸菌における複製開始領域の同定とミニプラスミドの作成：以上のように BCG および *M. smegmatis* の変異株を用いることにより、pYT72/pYT92 を高い頻度で導入することが可能となった。またこれらの菌で組換えプラスミドは安定に複製され得ることが判明した。しかしながら、これらのプラスミドは、そのサイズが約 17 kb と大きいこと、また各種の制限酵素感受性点を多数有するなど、そのままではベクタープラスミドとして使いづらい。

そこで次に、抗酸菌で複製するのに必要な最小限の領域を pMSC262 のなかから取り出し、このものを用いて、より小さくしかも使いやすいベクタープラスミドを作成することを試みた。方法としては、pYT72 および pYT92 から制限酵素感受性部位を利用して種々の欠損変異株を分離し、大腸菌で増殖させた後、BCG に導入し、これらのプラスミドの複製能を調べることにより必要な部分の同定を行う方法を取った。

その結果、Fig. 3 に示すように、まず A 領域として表示した *Pst* I - *Hinc* II の約 2.5kb の中に複製に必要な領域が含まれることが判明した。さらにこの中の *Hinc* II - *Hind* III の約 0.2kb は不必要であることが判明したが、残りの 2.3kb のうち、複製のために必要な最小限度の領域がどの程度の長さを持たねばならないかは今のところ不明であり、今後の検討が必要である。

いずれにせよ抗酸菌における複製に必要な領域が、こ

の2.3kbの中に存在することが特定できたので、このDNA断片を使ってベクタープラスミドを作成することとし、最終的に Fig. 4 に示すようなプラスミド pYT937 を作成した。このものは、抗酸菌の中で複製するのに必要な pMSC262 由来の2.3kbの断片と pACYC177、およびその両者を結合するための pUC19 の断片よりなるが、全体として5.9kbの大きさである。また大腸菌および抗酸菌の両方で複製可能、かつ大腸菌ではアンピシリン耐性とカナマイシン耐性が、抗酸菌ではカナマイシン耐性が選択のためのマーカーとして使用可能である。現在このベクターを使用していろいろな微生物由来の遺伝子を抗酸菌に導入し、これらの遺伝子の情報発現について検討中である。

複製開始領域の構造：つぎにこの抗酸菌での複製に必要な領域の構造を決定する作業を行った。塩基配列の決定はM13 フェージを用いた dideoxy 法で行った。その結果、*Pst* I-*Hinc* II 断片の長さは 2,504 bp であり、不要な部分を除いた領域、*Pst* I-*Hind* III は 2,294 bp であることが判明した。また GC 含量は 69.8 % と抗酸菌特有の高い GC 比を示した。

この領域内に遺伝子として働いている可能性をもつオープンリーディングフレーム (ORF) を探したところ、2 個見いだされたが、そのうち最も大きいものはアミノ酸にして 311 個、分子量 33.8 kd の蛋白をコードする大きさを有していた。ただし、この ORF は上流部分に

Shine-Dalgarno 様配列を持たず実際に稼働しているか否かは不明である。

第2のORFはアミノ酸にして260個、分子量28.9kdの蛋白をコードする大きさを有し、上流部分に Shine-Dalgarno 様構造を持っていることが判明した。したがって実際に働いている可能性があるものと思われた。またこの遺伝子のさらに上流部分には数多くの繰り返し構造 (direct repeat, inverted repeat) が見いだされた。プラスミドの複製開始点にはこのような繰り返し構造が多くみられるといわれており、おそらくこの部分が pMSC262 における複製の開始点であろうと思われる。

なお抗酸菌のプラスミドで同様にシャトルプラスミドとして用いられ、複製開始点の構造が明らかにされている *M. fortuitum* 由来の pAL5,000 と、われわれのプラスミドの間に構造上の類似点があるか否かについて検討したが、全くホモロジーは認められなかった。

考 察

遺伝子工学の手法を用いた抗酸菌の研究は近年大きな進歩を遂げているが、これらの研究はその内容からいって、大きく次の3つのカテゴリーに分けられるように思われる。

その1は抗酸菌の遺伝子の構造や機能に関する研究である。これまでに結核菌、BCG を含む牛型菌、らい菌などから数多くの蛋白抗原遺伝子が分離され、その構造が決定されてきた¹⁾。その中には、抗酸菌の感染・免疫に重要な役割を演じている可能性が高い、いわゆるストレス蛋白の遺伝子なども含まれている。また最近では、superoxide dismutase や *aroA*⁹⁾¹⁰⁾ などの機能がわかった酵素蛋白遺伝子もクローニングされ、その構造が明らかにされつつある。

また、現在のところは全く解析されていないが、近い将来、結核菌やらい菌の病原性を支配する遺伝子や感染防御に関与する遺伝子の研究、薬剤耐性を支配する遺伝子などについても研究が行われるようになるものと思われる。

これまでに解析された抗酸菌の蛋白抗原遺伝子は、いずれも大腸菌の宿主・ベクター系を用いて分離されたものであるが、抗酸菌の遺伝子は大腸菌の宿主・ベクター系のみで解析するには限界があることも次第に明らかになってきた。すなわち、①大腸菌の系で情報発現が行われるのは、抗酸菌の遺伝子の中でも限られた少数のものだけである、②使用コドンなどの関係から、大量の遺伝子産物を作らせるにも不適である、③複数の遺伝子の情報発現に必要な多糖体や脂質の合成に関与する遺伝子の研究にも向いていない、などである。

そこで、これらの欠点を補うため、第2の研究の方向

として抗酸菌自体を用いた宿主・ベクター系の作成が試みられ、これまでにいくつかのものが報告されてきた^{3)~5)}。抗酸菌の宿主・ベクター系はさらにBCGをベースとする多用途ワクチンの開発にもつながることから大いに注目を引いているが、BCGをベースとする多用途ワクチンで最も可能性が高いのは、らいのワクチンである。

近年 Convit ら¹¹⁾によって、らい菌の死菌とBCG生菌の投与によりらいの病状が好転したという報告がなされ、らい菌を使ったワクチンの可能性が示されている。もしこのような組合せがほんとうにらいのワクチンとして有効であれば、その必要性はきわめて大きいことになる。しかし未だに培養ができないらい菌から感染防御に必要な抗原を大量に得ることは困難であり、もし遺伝子をBCGに組み込むことにより安価かつ有効なワクチンを作成することができればきわめて有用であろう。

第3の研究領域としては菌種特異的なDNAプローブなどを用いた抗酸菌の分類および同定に関するものが挙げられる。これらの技術を用いることにより、迅速かつ正確な同定が可能になることが予測されている。

このような背景から、われわれもこの数年来、抗酸菌および大腸菌の両菌で複製可能なベクターの開発について検討を行ってきたが、本報告に述べたように抗酸菌のプラスミド pMSC262 と大腸菌のプラスミド pACYC 177 から作成した組換えプラスミドがこの要求を満足させることを見いだした。

さらに、pMSC262 のなかで抗酸菌で複製するのに必要な領域を同定し、この部分を用いて小さいシャトルプラスミド pYT937 を作成することができた。今後はこのプラスミドを用いて、種々の微生物由来の遺伝子を抗酸菌に組み込み、これらの遺伝子の情報発現について検討を行っていく予定である。

文 献

- 1) 水口康雄：抗酸菌の遺伝、医学細菌学、5：1～39, 1990.
- 2) Bloom, B. R. : Learning from Leprosy : A perspective on immunology and the third world, J Immunol, 173 : i-x, 1986.
- 3) Snapper, S. B., Lugosi, L., Jekkel, A. et al. : Lysogeny and transformation in mycobacteria : Stable expression of foreign genes, Proc Natl Acad Sci, 85 : 6987-6991, 1988.
- 4) Raney, M. G., Rauzier, J., Lagranderie, M. et al. : Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum* : Construction of a "mini" *Mycobacterium*-*Escherichia coli* shuttle vector, J Bacteriol,

- 172 : 2793–2797, 1990.
- 5) Lazraq, R., Clavel-Sérès, S. and David, H. L. : Transformation of distinct mycobacterial species by shuttle vectors derived from the *Mycobacterium fortuitum* pAL5000 plasmid, *Current Microbiol*, 22 : 9–13, 1991.
- 6) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
- 7) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci*, 74 : 5463–5467, 1977.
- 8) Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S. et al. : Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*, *Molecular Microbiol*, 4 : 1911–1920, 1990.
- 9) Thangaraj, H. S., Lamb, F. I., Davis, E. O. et al. : Identification sequencing, and expression of *Mycobacterium leprae* superoxide dismutase, a major antigen, *Infec Immun*, 58 : 1937–1942, 1990.
- 10) Gabre, T., Jones, C., Charles, I. et al. : Cloning and characterization of the *aro A* gene from *Mycobacterium tuberculosis*, *J Bacteriol*, 172 : 6774–6782, 1990.
- 11) Convit, J., Urlich, M., Aranzazu, N. et al. : The development of a vaccination model using two microorganisms and its application in leprosy and leishmaniasis, *Lep Rev*, 57 (suppl. 2) : 263–273, 1986.

第 66 回総会シンポジウム

Ⅲ. 結核研究における遺伝子工学の応用

2. 抗酸菌の抗原性蛋白質の研究

松 尾 和 浩 ・ 山 口 隆 司 ・ 山 崎 晤 弘

味の素中央研究所

寺 坂 邦 広

結核予防会大阪支部

永 井 定

大阪市立大学医学部

田 坂 博 信

広島大学医学部

阿 部 千代治

結核予防会結核研究所

戸 塚 昌 攻

精華女子短期大学

雪 竹 英 治 ・ 小 林 浩 明
大 原 直 也 ・ 山 田 毅

長 崎 大 学 歯 学 部

受付 平成 3 年 6 月 20 日

Ⅲ— 2. STUDY ON RECOMBINANT BCG

Kazuhiro MATSUO, Ryuji YAMAGUCHI, Akihiro YAMAZAKI, Kunihiro TERASAKA,
Sadamu NAGAI, Hironobu TASAKA, Chiyoji ABE, Masayuki TOTSUKA,
Hideharu YUKITAKE, Komei KOBAYASHI,
Naoya OHARA and Takeshi YAMADA*

(Received for publication June 20, 1991)

For the purpose to establish the system to express foreign antigen from *Mycobacterium bovis* BCG. We have cloned, sequenced and expressed genes for secreting proteins, α antigen, MPB64, MPB57 and MPB70 from *M. bovis* BCG. The upstreams and structural genes were characterized. The gene for α antigen of *Mycobacterium kansasii* was also characterized. The gene for α antigen of *M. kansasii* (k- α) was chosen for the further study at first. This gene was fused with shuttle plasmid PIJ666-PAL5000 obtained from T. Kisser and transfected to *M. bovis* BCG (Tokyo). Transformant was obtained by a selection with kanamycin. It was able to secrete k- α antigen.

* From the Nagasaki University, School of Dentistry, 7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki 852 Japan.

DNA-containing a B-cell epitope (Glu-12-Leu-Asp-Arg-Trp-Glu-Lys-Ile-19) of human immunodeficiency virus type 1 P17 gag was fused to this vector at C terminal of k- α . Using this vector, we have succeeded to express foreign antigen in *M. bovis* BCG. The products were analyzed in one or two dimensional electro-phoresis. The results thus obtained will be reported elsewhere.

Key words : Secreting proteins

キーワード : 分泌蛋白質

緒 言

BCG 生ワクチンの分泌蛋白質遺伝子と難病の予防抗原の遺伝子をつなぎベクターに挿入し BCG 生ワクチンに感染させ、これをヒトに接種すればヒトの体内で外来抗原を絶え間なく分泌することになる。この系は抗原を精製する必要はなく、その上 BCG 菌のアジュバント効果と相乗作用を発揮し有効なワクチンとなるであろう。

分泌させることの意味は3つある。1) 外来の抗原を BCG 菌が破壊する可能性を除去する。2) 外来の抗原が毒性を発揮して BCG 菌を殺す可能性を除去する。3) マクロファージ内で菌体から分泌される蛋白質は MHC class I の pass way で抗原提示される可能性が高い¹⁾²⁾。これはキラーT細胞に識別される。ウイルス感染症の予防ワクチンを作るのに重要な系となるであろう。以上述べた目的を達成するため、まず分泌蛋白質の抗原遺伝子をクローニングし、その構造を解析する研究を始めた。

方 法

菌株 : *Mycobacterium bovis* BCG 東京株, *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 は Sauton 培地で培養した。*Escherichia coli* JM109 は L broth で培養した。BCG 形質転換の実験にはアルブミン-デキストロースと 0.05 % Tween 80 を含む Middle Brook 7H9 ブイオンを用いた。

試薬 : 制限酵素ライゲーションキット, *Kpn* I リンカーは宝酒造株式会社 (日本) から購入した。パーオキシダーゼ結合の羊の抗ウサギ IgG と抗マウス抗体は Dako 株式会社 (デンマーク) と Bio-Rad Laboratories から購入した。

プローブの作製 : 精製抗原の N 末端アミノ酸配列の決定には、470 gas-phase protein sequencer (Applied Biosystems Inc.) を使用した。これをコードするオリゴヌクレオチドは 370A DNA synthesizer (Applied Biosystems Inc.) によって合成した。これを ³²P でラベルした。約 100pmol のプローブと 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.66

μ M ATP, 100 μ C (γ -³²P) ATP 15U の T4 ポリヌクレオチドキナーゼを含む 30 μ l の反応液を 37°C 2 時間反応させた。

サザンハイブリダイゼーション : 分離精製した DNA 約 3 μ g を制限酵素で完全消化し 0.8 % アガロースゲル電気泳動により分離した後 0.5N NaOH, 1.5 N NaCl で変性し、ジーンスクリーン、ナイロンメンブレンフィルターに移した。このフィルターを 37°C 16 時間乾燥させた後 10⁶ cpm の ³²P プローブを含む 5 $\times$ SSC (1 $\times$ SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ソーダ, 5 $\times$ デンハルト溶液, 0.1 % SDS) に浸した。55°C 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後フィルターを 2 $\times$ SSC-0.1 % SDS で 15 分 50°C で洗浄し、さらに 0.1 $\times$ SSC-0.1 % SDS で 15 分 48°C で洗浄した。乾燥後オートラジオグラフィーを行った。

DNA クローニング : 制限酵素で切断した DNA 断片を 0.8 % アガロースゲル電気泳動で分離した後必要な長さの断片を DE81 紙に吸着させ、これを 50mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄し 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 2M NaCl で溶出した。この DNA 断片をクロロホルムとフェノールで処理した後、エタノールで沈殿させた。プラスミッドベクター PVC18 を適当な制限酵素で処理し、バクテリアのアルカリフォスファターゼで脱リン酸を行った。これにライゲーションキッド DNA 断片を挿入した。形質転換は宝酒造 KK のコンピーテント *E. coli* JM109 に行った。0.1mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) と 0.004 % 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside とアンピシリンを含むプレート上で増殖させた。アンピシリン耐性の白いコロニーを分離した。このコロニーから ³²P でラベルしたプローブとハイブリッドを作るものを分離した。

DNA 塩基配列決定 : クローニングした DNA 断片を PUC18 にサブクローニングした後、ダイデオキシ法にて塩基配列を決定した。

発現 : 遺伝子に合成アダプターを両端に結合させた後、pKK 233-2 に挿入した。

免疫学的方法 : ポリクロナル抗体は 500 μ g の蛋白質を

Freund incomplete アジュバントとともにウサギに4回、4週間間隔で皮下に注射して得た。

モノクロナル抗体: BALB/C 4週マウスに100 μ gの蛋白質を Freund Incomplete アジュバントとともに足底の皮下に注射した。2週間後にもう一度同じく注射した。1カ月後リン酸バッファー中の蛋白質を腹腔に注射した。3日後に脾細胞をとりポリエチレングリコールでミエローマ細胞と融合させた。

ウエスタンブロット: TE (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) 緩衝液中の菌体を超音波処理し12,000rpm, 15分で遠心し溶出液を得た。これを15% SDS-PAGE にて電気泳動した後ニトロセルロースメンブレンフィルターに移した。30mM Tris-HCl (pH 7.4)-75mM NaCl-1%牛血清中で振盪し非特異的吸着をブロックした。その後、希釈血清で8°C 3時間処理した。次いでパーオキシダーゼ結合の羊の抗ウサギ IgG と反応させた。最後に4-chloro-1-naphthol 0.02% H₂O₂ と反応させた。

分泌ベクター: 大腸菌と抗酸菌のシャトルベクター (PIJ666-PAL5000) ライブラリーは T. Kisser から分与された。

HIV-1 P17^{gag} B細胞エпитープ分泌ベクター: P17蛋白質の一次構造は既に発表されている。この蛋白質のいろいろな領域をコードするDNAを合成した。このDNAをPVR292の *Bam* HI-*Pst* I サイトに挿入した。このベクターはこの遺伝子を *E. coli* EQ192 の中で β -ガラクトシダーゼの融合蛋白として発現させることができる。抗-P17^{gag}モノクロナル抗体を使用しウエスタンブロットによりこの融合蛋白質の発現を確認した。

結 果

1. BCG 菌の α 抗原³⁾

精製 α 抗原のN末端30個アミノ酸配列は Phe Ser Arg Pro Gly⁵ Leu Pro Val Glu Tyr¹⁰ Leu Gln Val Pro Ser¹⁵ Pro Ser Met Gly Arg²⁰ Asp Ile Lys Val Gln²⁵ Phe Gln Ser Gly Gly³⁰であった。これに対するプローブを2つ合成した。

プローブ I 5'-TTCTCGCGCCCCGGCCTGCCGGTTCGAGTACCTGCAGGTCCCGTCGCCGTGCATGGG-3' (Phe-1からGly-19に相当する)

プローブ II 5'-GGCCGCGACATCAAGGTGCAGTTCAGTCCGGG-3' (Gly-19からGly-29に相当)

各々のプローブの5'末端をポリヌクレオチドキナーゼを使用し³²Pでラベルした。BCG菌のDNAを *Bam* HI, *Kpn* I, *Pst* I で完全消化し0.8%アガロースゲルで展開し、プローブ I あるいはIIでハイブリダイゼーションした。プローブ I およびIIのいずれでもハイブリダイズする5.2kbpの *Kpn* I断片を切り出しク

ローニングした。この全塩基配列を決定した。これから全アミノ酸配列を推定した。N末端のアミノ酸配列が一致した。40個の分泌シグナルペプチドを持つ283個のアミノ酸からなる蛋白質であった。これはミコプラズマの分泌シグナルペプチドを持つ蛋白質については最初の報告であった。リボソーム結合部位、大腸菌プロモーターコンセンサス配列に似た構造も見られた。3つ目のレターのG+C含量は86%と高い値を示した。大腸菌の分泌ベクターに挿入し、発現させることができる。

2. *M. kansasii* の α 抗原⁴⁾

BCG菌の α 抗原をプローブとして *M. kansasii* の α 抗原遺伝子をクローニングした。40個のアミノ酸からなる分泌シグナルペプチドを有する325個のアミノ酸からなる蛋白質であることが明らかとなった。BCG菌の α 抗原と比べるとDNAレベルで84.8%, アミノ酸レベルで89.1%の相同性を有することも分かった。疎水性を比べると2カ所で異なる領域があることが分かった。これはおそらく抗原性の異なる所であろう。

3. BCG のMPB64⁵⁾

MPB64のN末端30個のアミノ酸を決定した。Ala¹-Pro-Lys-Thr-Tyr⁵-His-Glu-Glu-Leu-Lys¹⁰-Gly-Thr-Asp-Thr-Gly-Gln-Ala-Tyr-Gln-Ile²⁰-Gln-Met-Ser-Asp-Pro-Ala-Tyr-Asn-Ile-Asn³⁰これをコードする3つのプローブを合成した。

プローブ I : GACCCGGCCTACAACATC(Asp²⁴-Asn³⁰に相当)

プローブ II : GACCCGGCCTACAACATCAAC(Glu⁷-Gly¹⁵に相当)

プローブ III : GACACCGGCCAGGCCTACCAGATCCAGATG (Asp³-Met²²に相当) 3つのプローブいずれとも結合する4.4kbpの *Kpn* I断片をクローニングし全塩基配列を決定した。22個のアミノ酸からなる分泌シグナルペプチドが見られた。618個の塩基からなる分泌蛋白遺伝子である。分子量22,400と計算された。コドン第3番目の塩基のG+C含量は78.5%と高い値を示す。大腸菌の発現ベクターに挿入し発現させた。

4. BCG のMPB57⁶⁾

BCGの培養ろ液にみられる分子量約10kDaの蛋白質である。このN末端20個のアミノ酸とこれをコードするヌクレオチドプローブ I とプローブ II は次のとおりである。

Ala¹-Lys-Val-Asn-Ile-Lys-Pro-Leu-Glu-Asp¹⁰-Lys-Ile-Leu-Val-Gln-Ala-Asn-Glu-Ala-Glu²⁰

プローブ I : GTGCAGGCCAACGAGGCCGAG(Val¹⁴-Glu²⁰に相当)

プローブ II : AAGGTGAACATCAAGCCGCTGGA

GGACAAGATCCTGGTGCAGGCCAACGAGGC
(Lys²-Ala¹⁹に相当)

いずれのプロープとも結合する9.0kbpのPst I断片をクローニングし全塩基配列を決定した。分泌シグナルペプチドを持たない。300 bpの遺伝子である99個のアミノ酸をコードする分子量10,818と計算された。大腸菌の発現ベクターで発現させた。

5. BCG菌のMPB70⁶⁾

N末端アミノ酸に相当するプロープを合成した(GT C CAG GGC ATG GAG CAG GAC CCG GT)。これと結合する3.6kbpのSal I断片をPUC19にクローニングし全塩基配列を決定した。30個のアミノ酸からなる分泌シグナルペプチドを有する。成熟蛋白質は163個のアミノ酸からなる分子量16305を有する。シグナルペプチドは疎水性が非常に高い。

6. 分泌ベクターの構築⁷⁾

PUC18のHinc IIサイトにクローニングした*M. kansasii*の α 抗原遺伝子(PKA20)を分泌ベクター構築に利用した。これを抗酸菌-大腸菌のシャトルベクターに挿入した。シャトルベクターPIS18をKpn Iで切断した。一方、PKA20をHinc IIで切断した後Kpn Iリンカーを両端につないだ。2つのプラスミドを融合し13.2kbの分泌ベクターを作製した。このベクターをBCG菌東京株にエレクトロポレーションにより導入した。形質転換体はカナマイシン耐性菌として選択分離した。形質転換体をソートン培地で培養した。4週培養後、培養液を硫酸で濃縮し透析後SDS PAGEでみると、30kDa付近に濃いバンドが見られた。*M. kansasii*の α 抗原に対する抗体をBCG菌体で吸収して得られる血清を用い、ウエスタンブロットで調べると30kDa付近に明瞭なバンドが見られた。培地から α 抗原をFPLC Superose 12カラムで精製した。そのN末端アミノ酸を決定した。*M. kansasii*の抗原のN末端アミノ酸配列と一致し、BCG菌のN末端アミノ配列とは一致しない。以上の事実から*M. kansasii*抗原がBCG菌から分泌されたことが証明された。

次にHIV-I gag P17の細胞エピトープを、この組換えBCG菌で発現させる実験を行った。P17の全アミノ酸配列は既に知られている。数個~10数個のアミノ酸に相当するヌクレオチドを合成し、ベクターガラクトシダーゼ遺伝子に融合し大腸菌で発現させた。これと市販のモノクロナル抗体と反応させた。反応する領域がB細胞エピトープである。Glu-12-Ile19にエピトープの1つがある。これを α 抗原のC末端近くに挿入した。このような遺伝子をシャトルベクターのKpn Iサイトに挿入した。BCG菌東京株に導入し得られた形質転換体をソートン培地で培養した。培地中の蛋白質をウエスタンブロットで調べると、エピトープを融合した α 抗原

が発現していることが明らかとなった⁸⁾。

考 察

クローニングした遺伝子の産物は、いずれも細胞学的に特徴のあるものである。 α 抗原は抗酸菌に広く分布している。遅延型皮膚反応を惹起する。フィブロネクチンと結合することが明らかとなり、病原性に重要な役割を演じていることが示唆されている。これに対する抗体が小児の髄膜炎患者の血清に検出されることが分かり診断にも利用し得ることが分かった⁹⁾。よく似た蛋白質の一群があることが最近分かってきた¹⁰⁾。これらを1つのファミリーとみなすと、全分泌蛋白質の約30%に及び抗酸菌の増殖に重要な役割を演じている可能性を示唆している。MPB64は結核菌群に見られるものである。診断に利用し得ることが示唆された。最近MPB64の塩基配列に基づいてPCR法にて診断に有効であることが示された¹¹⁾。MPB57は抗酸菌に広くみられるものである。塩基配列から熱ショック蛋白質であることが分かった。

BCG菌と*M. kansasii*の α 抗原のN末端アミノ酸配列を比べると、BCG菌の¹⁶Pro-Ser¹⁷が*M. kansasii*では¹⁶Ala-Ala¹⁷となっている。果たして、分泌ベクターが異種抗原を分泌したかを知ることができた。またBCG菌と*M. kansasii*の α 抗原は血清学的に交叉反応を示すが、種特異的に反応するエピトープもある。これによって異種抗原の分泌を確認することができた。この論文で示した分泌ベクターは、ウイルス抗原のエピトープを発現することが示された。組換えワクチンとして利用され得ることが示された。

文 献

- 1) Moore, M. W., Carbone, F. R., Bevan, M. J. : Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation, Cell, 54 : 777-785, 1988.
- 2) Peters, P. J., Neefjes, J. J., Oorschot, V. et al. : Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments, Nature, 349 : 669-676, 1991.
- 3) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A. et al. : Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular α antigen, J Bacteriol, 170 : 3847-3854, 1988.
- 4) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A. et al. : Cloning and expression of the gene for the cross-reactive α antigen of *Mycobacterium kansasii*, Infect Immun, 58 : 550-556, 1990.

- 5) Yamaguchi, R., Matsuo, K., Yamazaki, A. et al. : Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 57 : 283-288, 1989.
- 6) Yamaguchi, R., Matsuo, K., Yamazaki, A. et al. : Immunogenic protein MPB57 from *Mycobacterium bovis* BCG : molecular cloning, nucleotide sequence and expression, *FEBS LETTERS*, 240 : 115-117, 1988.
- 7) Terasaka, K., Yamaguchi, R., Matsuo, K. et al. : Complete nucleotide sequence of immunogenic protein MPB70 from *Mycobacterium bovis* BCG, *FEMS Microbiol Letters*, 58 : 273-276, 1989.
- 8) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A. et al. : Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria, *Infect Immun*, 58 : 4049-4054, 1990.
- 9) 梶田祐司, 永井崇雄, 浅野喜造他 : 血清反応による結核性髄膜脳炎の早期診断の可能性, *小児臨床*, 39 : 1308-1312, 1986.
- 10) Wiker, H. G., Sletten, K., Nagai, S. et al. : Evidence for three separate genes encoding the proteins of the mycobacterial antigen 85 complex, *Infect Immun*, 58 : 272-274, 1990.
- 11) Kaneko, K., Onodera, O., Miyatake, T. et al. : Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR), *Neurology*, 40 : 1617-1618, 1990.

第 66 回総会シンポジウム

Ⅲ. 結核研究における遺伝子工学の応用

3. ミコバクテリアの感染防御における γ/δ T 細胞の関与

吉 開 泰 信

名古屋大学医学部・病態制御研究施設

受付 平成 3 年 6 月 20 日

Ⅲ-3. PARTICIPATION OF γ/δ -T CELLS IN THE PROTECTION
AGAINST MYCOBACTERIAL INFECTION

Yasunobu YOSHIKAI *

(Received for publication June 20, 1991)

To search for a potential role of T cell receptor (TcR) γ/δ T cells in host-defense against mycobacterial infection, we analyzed the kinetics, repertoire, specificity and function of γ/δ T cells in the peritoneal cavity, lymph node (LN) and spleen during an intraperitoneal infection with a sublethal dose (5×10^5) of viable BCG in mice. The number of bacteria in the organs increased to a maximal level by 28 days after infection, and thereafter decreased gradually. Of the $CD3^+$ cells in PEC on day 7 after infection, approximately 25% were $CD4^-CD8^-$, most of which express TcR γ/δ on their surface. On the other hand, the PEC on day 28 contained an increased number of α/β T cells which were $CD4^+CD8^-$ or $CD4^-CD8^+$ and the proportion of γ/δ T cells was reciprocally decreased. The kinetics of γ/δ and α/β T cells in the LN and spleen during BCG infection are much the same as that seen in the PEC. The early appearing γ/δ T cells preferentially used V $\gamma 1$ /V $\delta 6$ although the repertoire of these T cells are diversified. The γ/δ T cells in PEC on day 7 remarkably proliferated and produced γ IFN and IL-2 in response to sonicated BCG or PPD derived from *Mycobacterium tuberculosis* but not to 65 kd heat shock protein (HSP) derived from *M. bovis*. These results suggest that γ/δ T cells precede α/β T cells in appearance during mycobacterial infection and the early appearing γ/δ T cells may participate in the protection at the early stage against the mycobacterial infection.

Key words : γ/δ T cells, BCG, Protective immunity, Mycobacterial infection

キーワード : γ/δ T 細胞, BCG, 感染防御, マイコバクテリア感染症

* From the Laboratory of Germfree Life, Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University School of Medicine, Nagoya 466 Japan.

はじめに

生体防御機構の中心的役割を担う T リンパ球は、T 細胞レセプター (TcR) を介して抗原を認識する。TcR は α/β 型と γ/δ 型に分けられる。 α/β 型 TcR は末梢の大部分の CD4 または CD8 陽性 T 細胞に発現され、自己の主要組織適合性抗原 (MHC) に結合した抗原を認識する。一方、 γ/δ 型 TcR は個体発生の早期の胸腺細胞や末梢に少数存在する CD4⁻CD8⁻ T 細胞、および腸管上皮間リンパ球や表皮内 T リンパ球に発現されている。

γ/δ 型 TcR のリガンドや γ/δ 型 TcR を発現する T 細胞の機能については長年不明であったが、最近、65 kd ストレス蛋白質 (HSP) を含むマイコバクテリア抗原を認識する γ/δ 型 T 細胞が見出され、マイコバクテリア感染症における感染防御機構に γ/δ 型 T 細胞が重要な役割を果たしている可能性が考えられている¹⁾。われわれは γ/δ 型 T 細胞のマイコバクテリア感染防御機構における役割を検討する目的で、マウスにおける BCG 感染症での γ/δ 型 T 細胞の動態、特異性、およびその機能について検討したので報告する。

材料と方法

(1) 動物

7~8 週齢の BALB/c 雌マウス (SLC) を用いた。

(2) 菌株

教室保存の *M. bovis* BCG パスツール株を Difco 社の Middlebrook 7H9 培養液で 2 週間培養し、 5×10^5 の BCG 生菌をマウスの腹腔内に投与した。

(3) 細胞調整

マウスの腹腔内にハンクス液を投与して腹腔滲出細胞を回収した。 $2 \times 10^6/\text{ml}$ の腹腔滲出細胞をナイロンウールカラムに通して、非付着性細胞を回収した。さらに非付着性細胞を抗 CD4 モノクローナル抗体 (mAb)、抗 CD8mAb と補体で処理することによって CD4⁻CD8⁻ T 細胞分画を得た。

(4) Flow cytometry 解析

腹腔滲出細胞およびリンパ節細胞を FITC-抗 CD 3 mAb, PE-抗 CD 4 mAb, Biotin-抗 CD 8 mAb, および DuoCHROME-streptavidin で染色後、FACSscan で解析した。抗 Thy 1.2mAb, 抗 TcR α/β mAb, 抗 TcR γ/δ mAb も染色に用いた。

(5) PCR 法

脾臓細胞より、mRNA を抽出し、さらに cDNA を作製した。各 V γ , V δ に対するプライマーと C γ または C δ プライマーを用いて PCR を行った。増幅した遺伝子を Southern blott 法にて解析した。

(6) T リンパ球増殖反応

CD4⁻CD8⁻ T 細胞を同系の放射線照射脾臓細胞と

M. tuberculosis 由来の PPD, 超音波処理 BCG ライセートまたは *M. bovis* 由来のレコンビナント 65kd HSP と 3 日間培養して、³(H)-thymidine の取り込みを調べた。また、培養上清中のサイトカイン活性を ELISA 法または Bioassay にて検討した。

(7) 細胞障害活性

CD4⁻CD8⁻ T 細胞を抗 CD 3mAb 存在下で ⁵¹Cr ラベルした P 815 細胞と培養し、6 時間後の培養上清中の ⁵¹Cr を測定した。

結 果

(1) 臓器内菌数の変化

5×10^5 BCG を腹腔内に投与して 1 週間から 10 週間後までの腹腔内、肝臓および肺の生菌数を測定したところ、各臓器ともに感染 4 週間目で菌数がピークに達し、その後、徐々に減少した。(Fig. 1)

(2) γ/δ 型 T 細胞の動態

感染 1 週間後の腹腔内およびリンパ節で、CD4⁻CD8⁻ γ/δ 型 T 細胞の比率が有意に増加したが、その後徐々に減少した。感染 4 週間になると CD4⁺ または CD8⁺ α/β 型 T 細胞が増加した。(Fig. 2)

(3) γ/δ 型 T 細胞の特異性

感染 1 週間後の腹腔滲出細胞より、ナイロンウール非付着性 T 細胞を集め、さらに抗 CD 4mAb, 抗 CD 8 mAb と補体で処理して CD4⁻CD8⁻ T 細胞とした。こ

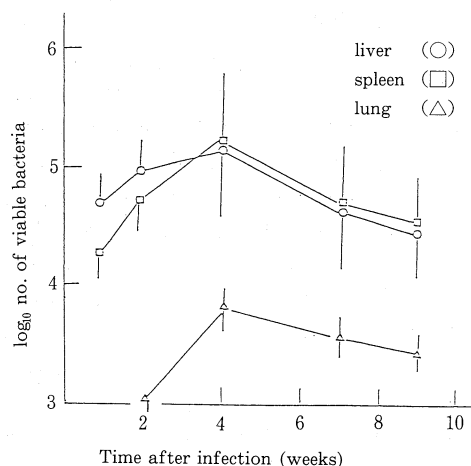


Fig. 1. Kinetics of bacterial growth in liver (○), lung (△), and spleen (□) at various times after an intraperitoneal inoculation with 5×10^5 viable BCG. Each symbol and vertical line indicate the mean $\pm$ the range of standard deviations for three mice, respectively.

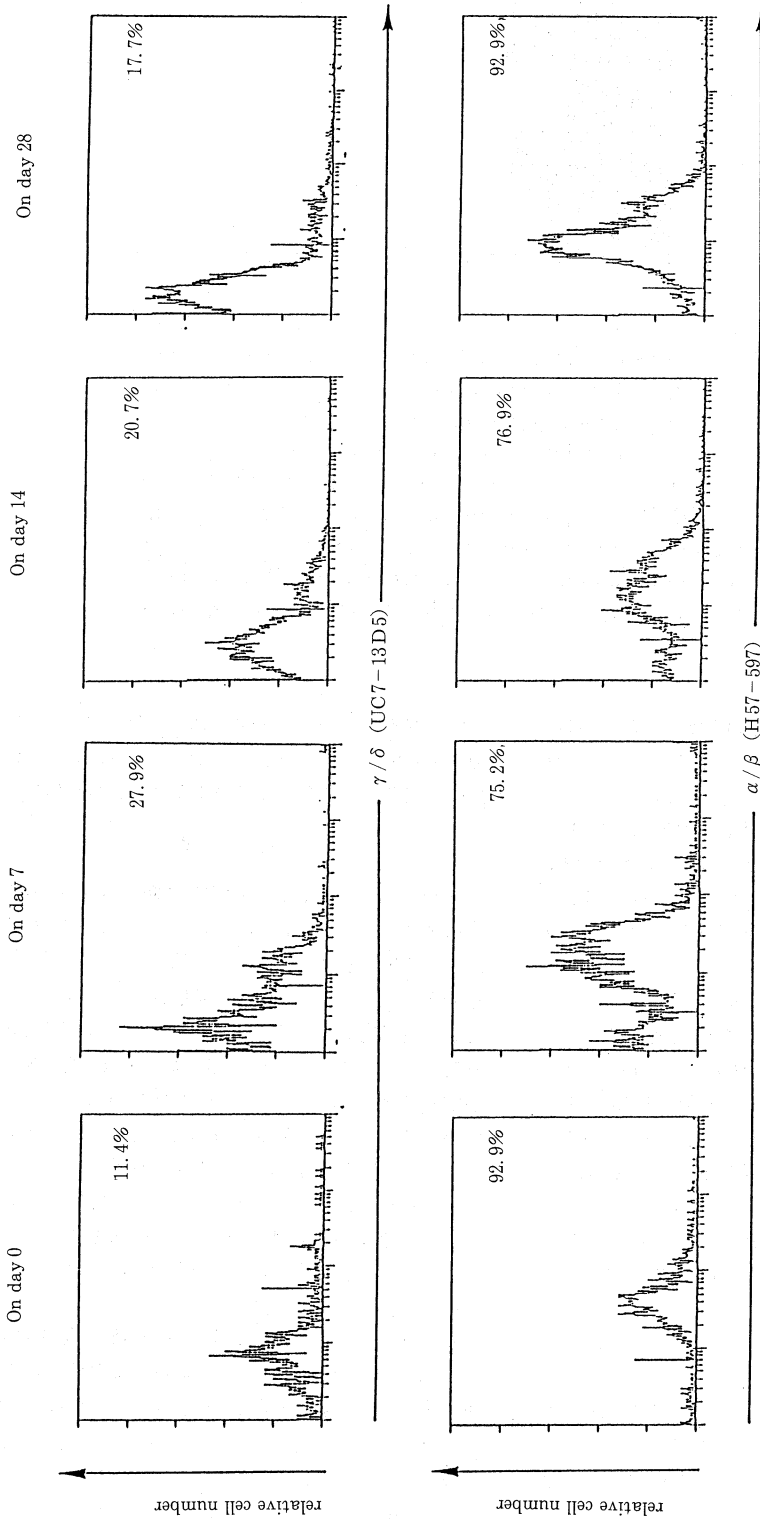


Fig. 2. Expression of TcR on T cells in peritoneal exudate cells of mice inoculated with viable BCG. Cells were double stained with biotin-conjugated anti-Thy 1.2 mAb followed by PE-streptavidin, and either anti-TcR γ/δ mAb (UC7-13D5) or anti-TcR α/β mAb (H57-597) with second layer FITC-labeled anti-hamster IgG antibody. Analysis gate was set on Thy 1.2-positive cells, and expression of TcR γ/δ or TcR α/β heterodimer was displayed as a single histogram.

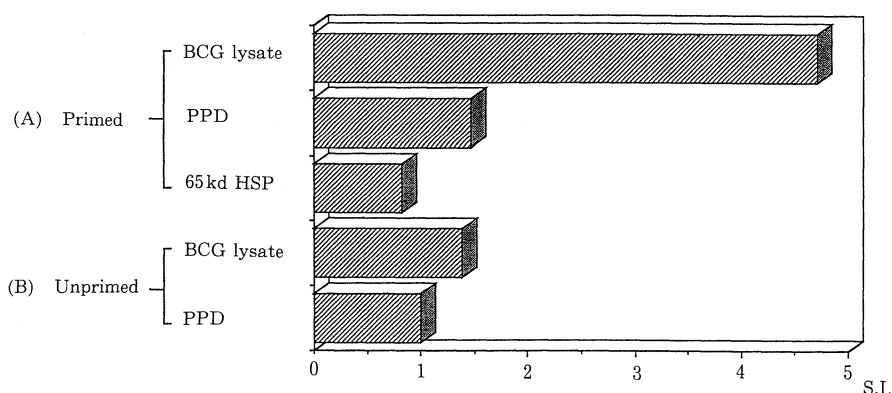


Fig. 3. Proliferation assay of γ/δ T cells in response to BCG lysate, PPD or 65 kd HSP. LN cells were passed through nylon wool column and then treated with anti-CD4 and anti-CD8 mAb followed by guinea pig complement. Purified DN cells (5×10^5) from mice inoculated with BCG 7 days previously (A) and from unprimed mice (B) were incubated with PPD at $30 \mu\text{g}/\text{ml}$, 65 kd HSP at $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ or BCG lysate at $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ in the presence of irradiated (3000 rad) syngeneic splenocytes (1×10^4). ^3H -thymidine uptake was determined after 72 hr incubation. Stimulation index was calculated with mean cpm of triplicate.

の分画の約 90 % 以上が γ/δ 型 T 細胞であった。CD4⁻CD8⁻ T 細胞を自己の抗原呈示細胞の存在下で BCG ライセート ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$), PPD ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$), および 65 kd HSP ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 3 日間培養後に、 ^3H -thymidine の取り込みを調べたところ、この γ/δ 型 T 細胞は BCG ライセートに強く反応し、PPD に対しても有意の反応性を示したが、65 kd HSP に対する反応性は認められなかった。(Fig. 3)

(4) γ/δ 型 T 細胞のレパートアー

BCG 感染症で出現してくる γ/δ 型 T 細胞のレパートアーを脾臓細胞を用いて PCR 法にて解析した。BCG 感染 1 週間後では、V γ 1/2, V δ 1, V δ 3 および V δ 6 を発現する γ/δ 型 T 細胞が増加してきた。BCG ライセートに反応する γ/δ 型 T 細胞は、V γ 1/2, V δ 3, V δ 5, V δ 6 を発現しており、ポリクローナルな γ/δ 型 T 細胞が反応することが明らかとなった。一方、PPD 反応性 T 細胞は、V γ 1/2, V δ 6 を発現する γ/δ 型 T 細胞が優位となった。(Fig. 4)

(5) γ/δ 型 T 細胞の機能

① サイトカイン産生能

γ/δ 型 T 細胞を BCG ライセートと培養した後、培養上清中 γIFN , IL-2 活性を ELISA 法または CTLL-2 を用いた Bioassay 法で調べたところ、高い γIFN 活性, IL-2 活性を認めた。(Fig. 5)

② 細胞障害活性

γ/δ 型 T 細胞の抗 CD 3 mAb 存在下の P815 腫瘍細胞に対する re-directed cytotoxicity を調べたところ、強い細胞障害活性を有していることが明らかになった。

考 察

今回の結果より、BCG 感染早期より γ/δ 型 T 細胞が増加することが明らかになった。この γ/δ 型 T 細胞は、CD4⁻CD8⁻ であり、V γ 1/2, V δ 1, V δ 3, V δ 6 を発現していた。 γ/δ 型 T 細胞は、マイコバクテリア抗原に特異的であり、ポリクローナルな反応性を示し、PPD に対しては、V γ 1/V δ 6 型 T 細胞の選択的な増殖が認められた。マイコバクテリア抗原には、 γ/δ 型 T 細胞のリガンドが多種類含まれているのかもしれない。この γ/δ 型 T 細胞は強い細胞障害活性を示し、また γIFN や IL-2 などのサイトカイン産生能を有していた。BCG 感染早期に出現する γ/δ 型 T 細胞は、マイコバクテリア感染症の早期の感染防御機構として重要な役割を担っているものと考えられる。

γ/δ 型 TcR は、個体発生早期の胸腺細胞や表皮や腸管、子宮の上皮間に存在するリンパ球に発現されており、進化度の低い「primitive T cells」と考えられている。その機能については、不明な点が多いが、外界の異物と直接接する上皮間に存在する γ/δ 型 T 細胞は、第一線の生体防御機構や免疫監視機構として重要な役割を担っているものと推定される²⁾。

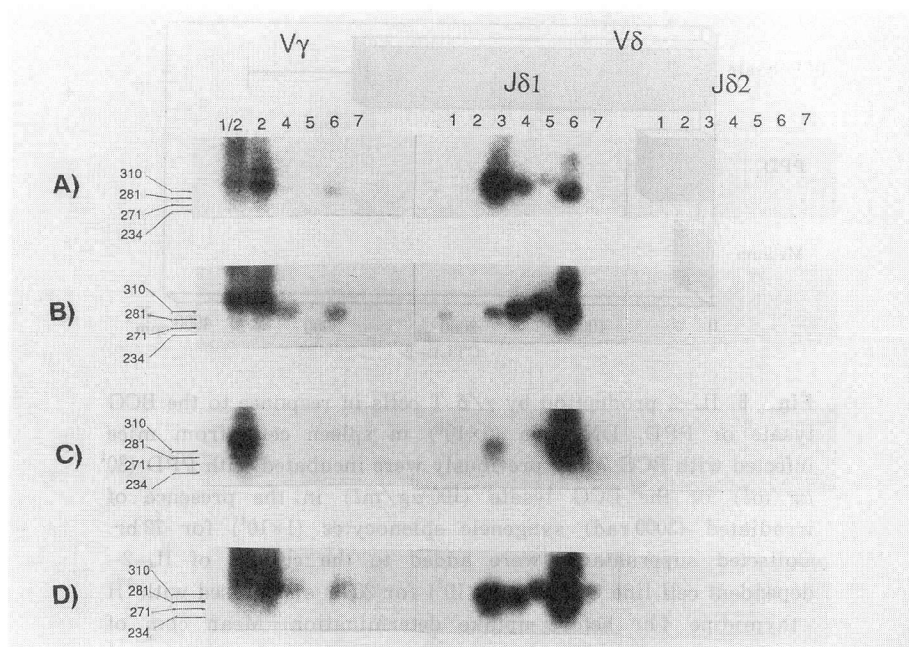


Fig. 4. $V\gamma$ and $V\delta$ gene usage in splenocytes derived from unprimed mice (A), mice infected with BCG 7 days previously (B), and in these cells incubated with PPD (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (C) or BCG lysate (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (D) for 72 hr. Total RNA was extracted from splenocytes. PCR analysis were performed as described in Materials and Methods. A 10 μl sample of each reaction mixture was electrophoresed on a 1.8% agarose gel, and Southern blot analysis of PCR amplified cDNA were performed using $C\gamma_2$, $J\delta_1$ and $J\delta_2$ probes.

最近、一部の γ/δ 型 T 細胞がマイコバクテリア抗原やマイコバクテリア由来の 65kd ストレス蛋白質を認識することが報告されている。Janis らは *Mycobacterium tuberculosis* 死菌をマウスの皮下に投与したところ、局所リンパ節での $\text{CD3}^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ 細胞が感染前に 1.6%であったのが、感染 7~10 日目には 10.4%までに増加することを見いだした。

この細胞群には免疫沈降法によって 32kd と 35kd の γ 鎖と 43kd と 45kd の δ 鎖が発現されていたが、 $C\gamma_4$ 由来の γ 鎖はほとんど検出されなかった。おそらく、 $V\gamma_4$ - $J\gamma_1$ - $C\gamma_1$ または $V\gamma_2$ - $J\gamma_2$ - $C\gamma_2$ 由来の γ 鎖が発現されていると考えられる。これらマイコバクテリア特異的 γ/δ 細胞は IL-2R を発現しており、IL-2 に反応する。また可溶性マイコバクテリア抗原に対する反応性は MHC クラス II に対する抗体でブロックされないことより、クラス II 分子はこの γ/δ 型 T 細胞の抗原認識には必要ではないものと考えられる。

CD4 や CD8 に対する抗体を投与されたマウスではマ

イコバクテリアの感染によって γ/δ 型 T 細胞が 20~25 倍に増加する。またマイコバクテリア二次感染では γ/δ 型 T 細胞は増加を認めていない³⁾。 γ/δ 型 T 細胞は α/β 型 T 細胞より早期の感染防御機構に重要な役割を担っているものと考えられ、私どもの今回の結果もこれを支持するものである。

Augustin らはマウスの肺に存在する T リンパ球のうち、8~20%が γ/δ 型 T 細胞であることを報告している。*Mycobacterium tuberculosis* 由来の PPD を吸入させることによって肺内の γ/δ 型 T 細胞数が有意に増加した。IL-1, IL-2, IL-3 ならびに TPA と ionomycin によって enrich された γ 型 T 細胞の TCR は $V\gamma_4$ ・ $V\delta_1$ または $V\delta_6$ 由来であった。彼らはさらにこれら γ/δ 型 T 細胞が 42°C で熱ショックを与えた自己細胞にも有意に反応することを見いだした⁴⁾。HSP の構造は原核細胞から真核細胞に至るまで保持されており、 γ/δ 型 T 細胞は病原性微生物由来の HSP のみならず、感染などのストレスを受けた自己細胞の HSP を認

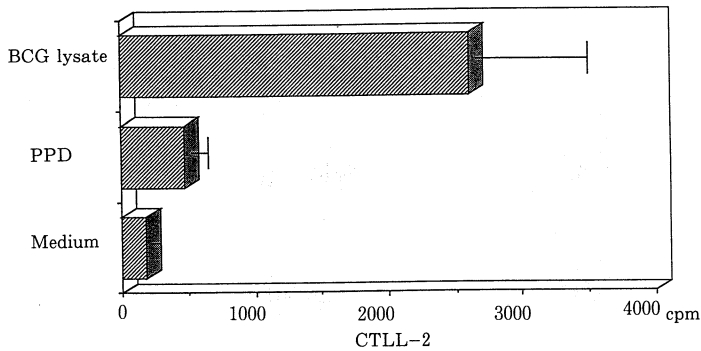


Fig. 5. IL-2 production by γ/δ T cells in response to the BCG lysate or PPD. DN cells (5×10^6) in spleen cells from mice infected with BCG 7 day previously were incubated with PPD (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or the BCG lysate (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of irradiated (3000 rad) syngeneic splenocytes (1×10^4) for 72 hr. Collected supernatants were added to the culture of IL-2-dependent cell line CTLL-2 (5×10^3) for 20 hr and pulsed with ^3H -thymidine 4 hr before uptake determination. Mean cpm of triplicate cultures $\pm$ SD.

識し、排除することによって感染防御機構として働いているものと考えられる。

われわれはBCGと同様に細胞内寄生性細菌である *Listeria monocytogenes* のマウスの感染症モデルにおいても α/β 型T細胞の出現に先んじて γ/δ 型T細胞が活性化されること、これらの γ/δ 型T細胞はBCG由来の recombinant 65KDHSP に反応することを見いだした⁵⁾。さらに、感染されたマクロファージはBCG由来の 65kd HSP にクロスする HSP を発現していることより、これら感染早期に活性化され γ/δ 型T細胞は感染によってストレスを受けた自己細胞を認識し、直接またはほかのエフェクター細胞を介して早期の感染防御機構として働いている可能性が大きいと考えている。

マイコバクテリア由来の HSP に特異的な γ/δ 型T細胞の存在は、マイコバクテリアの感染症のみでなく、すべての異物の侵入に対する生体防御機構を考える上で重要である。高等動物の生体防御機構は、食細胞を中心とした非特異的防御機構と、 α/β 型T細胞を中心とした免疫系による特異的防御機構に大きく分けられる。感染などによってストレスを受けた自己細胞を排除する γ/δ 型T細胞は、生体防御の連続的バリアーを構築する重要な防御因子の一つであり、非特異的防御機構と特異的防御機構の橋渡しの役割を担うと考えられよう^{6,7)}。

結 語

マウスのBCG感染症において γ/δ 型T細胞が α/β

型T細胞に先んじて活性化することを見いだした。この感染早期に出現する γ/δ 型T細胞は $\text{CD4}^+ \text{CD8}^-$ であり $\text{V}\gamma 1/2$, $\text{V}\delta 1$, 3, 6 を表現していた。 γ/δ 型T細胞はBCGライセートやPPDに対する特異性を有しており、これらマイコバクテリア抗原に反応して γIFN や IL-2 などのサイトカインを産生することが分かった。 γ/δ 型T細胞はマイコバクテリア感染症の初期防御機構として重要な役割を担っているものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御協力を賜った九州大学生体防御医学研究所・免疫部門、井上文彦先生、松崎吾朗先生、野本亀久雄先生に深謝致します。

文 献

- 1) Brenner, M. B., Strominger, J. L. and Krangel, M. S. : The $\gamma\delta$ T cell receptor, *Adv Immunol*, 43 : 133-192, 1988.
- 2) Raulet, D. H. : Antigenes for $\gamma\delta$ T cells. *Nature*, 339 : 342-343, 1989.
- 3) Janis, E. M., Kaufman, H. E., Schwartz, R. H. et al. : Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis* science, 244 : 713-716, 1989.
- 4) Augustin, A., Kubo, R. T. and Sim, G. K. : Resident pulmonary lymphocytes expressing

- the $\gamma\delta$ T cell receptor, *Nature*, 340 : 239-241, 1989.
- 5) Ohga, S., Yoshikai, Y., Takeda, Y. et al. : Sequential appearance of γ/δ -and α/β -bearing T cells in the peritoneal cavity during an i. p. infection with *Listeria monocytogenes*, *Eur J Immunol*, 20 : 533-538, 1990.
- 6) Inoue, T., Yoshikai, Y., Matsuzaki, G. et al. : Early appearing γ/δ -bearing T cells during infection with *Bacillus Calmette Guérin*, *J Immunol* 146 : 2754-2762, 1991.
- 7) Yuki, H., Yoshikai, Y., Kishihara, K. et al. : Clonal anergy in self-reactive α/β T cells is abrogated by heat shock protein-reactive γ/δ T cells in aged athymic nude mice, *Eur J Immunol*, 20 : 1475-1482, 1990.

第 66 回総会シンポジウム

Ⅲ. 結核研究における遺伝子工学の応用

4. サイトカインの遺伝子工学とその応用

高 津 聖 志

熊本大学医学部・免疫医学研究施設

受付 平成 3 年 6 月 20 日

Ⅲ-4. GENETIC ENGINEERING OF CYTOKINE SYSTEM
ON THE TUBERCULOSIS RESEARCH

Kiyoshi TAKATSU *

(Received for publication June 20, 1991)

Murine IL-5 is an acidic glycoprotein with a molecular mass of 40 to 50 kda that consists of homodimer of which monomer comprises 113 amino acid residues. Murine IL-5 has pleiotropic activities on various target cells. IL-5 acts on committed B cells to induce differentiation into Ig-producing cells and on common progenitors for Ly-1⁺ pre-B cells and Ly-1⁺ macrophages to support their growth. It also supports growth and/or differentiation of eosinophil precursor and mature eosinophil.

IL-5 specifically binds to its receptor (IL-5R) with high and low affinity. IL-5 signals appears to be transduced through the high affinity IL-5R that is composed of two different polypeptide chains; α chain and β chain. The IL-5R α chain cDNA encodes p60 that binds IL-5 with low affinity. The IL-5R β chain, p130/p140 does not bind IL-5 by itself, but binds to α chain/IL-5 complex to convert them to the high affinity IL-5R. The β chain was identified as the IL-3R homologue, AIC2B. Both α and β chain of IL-5R belong to a cytokine receptor superfamily.

Key words : IL-5, B cells, Eosinophils, Receptor

キーワード : インターロイキン 5, B細胞, 好酸球, 受容体

はじめに

結核菌感染によりマクロファージの活性化がまず起こり、活性化されたマクロファージは、IL-1を始めとする多くのサイトカインを産生するとともに感染の一次防御に関わると思われる。結核菌由来の抗原ペプチドに

特異的なT細胞はマクロファージ膜表面上の自己MHCクラス2抗原と抗原ペプチドにより活性化され、IL-2を始めとする多くのサイトカインを産生するとともにサイトカインに対するレセプターを発現する。

エフェクターT前駆細胞はサイトカインによる再刺激に応答して増殖し、最終的にエフェクター細胞に機能分

* From the Kumamoto University Medical School, Institute for Medical Immunology
Department of Biology, 2-2-1 Honjo, Kumamoto 860 Japan.

化する。近年結核菌抗原の遺伝子単離がなされ、リコンビナント抗原が利用可能になるにつれそれに応答するT細胞亜集団(γ/δ 型)の存在が明らかになってきた。このように、結核菌に対する生体防御の研究も、細胞工学や遺伝子工学の進歩につれ、新たな展開をみせるに至っている。

われわれは、IL-5をヒト型結核菌の死菌体で免疫されたマウスの脾細胞をPPDとともに培養した上清中に見いだし、抗原刺激であらかじめ活性化されたマウスB細胞を抗原特異的IgG産生細胞に成熟・分化させる活性因子として同定しその遺伝子を単離した。その後リコンビナントIL-5を用いた解析から、IL-5はB細胞のみならずT細胞活性化の補助因子としても作用し、骨髄の好酸球前駆細胞から好酸球生成を選択的に促進するサイトカインであることも明らかになってきた。

IL-5遺伝子の発現が結核性胸膜炎患者の胸水中T細胞で容易に検出できるのみならず、HTLV-1感染ヒトT細胞、寄生虫感染患者のT細胞、アレルギー性好酸球増多症患者のT細胞などでも検出されることなどから、アレルギー性疾患や結核とIL-5の異常産生の関連が注目を集めるようになってきている。

IL-5の多彩な機能を理解するにはIL-5レセプター(IL-5R)の分子論的解析が不可欠である。IL-5はIL-5特異的なレセプターに結合すること、高親和性と低親和性の2種類のIL-5受容体が存在するが、IL-5シグナルは高親和性受容体を介してなされること、IL-5受容体複合体は少なくとも2種類のタンパク質から構成されること、などが明らかになっている。ここでは過去17年間にわたり展開されてきたIL-5とそのレセプターの研究に焦点を絞り、まとめてみたい。

1. IL-5研究の歴史的背景

1974年、われわれは結核死菌(Tbc)感作マウスの脾細胞をツベルクリン(PPD)で刺激した培養上清中(PPD-Sup)に、T細胞不在下に2,4-dinitrophenyl(DNP)感作B細胞の抗DNP-IgG産生細胞への分化を増強する液性因子を見いだした。その後*in vitro*培養系でこの現象を確認し、その液性因子をTRFと呼んだ。Tbc感作T細胞と胸腺腫細胞BW5147との融合によりTRFのみを産生する株化T細胞B151K12(B151)を樹立し、TRFがユニークなリンホカインであることを初めて証明した。TRFがマウス慢性B白血病細胞(BCL₁)をIgM産生細胞に分化させることが分かったので、そのアッセイ系を利用しB151培養上清よりTRFを精製した。精製B151-TRFをラットに免疫し、ラット抗TRF単クローン抗体(TB13)を作製した。TB13抗体を用いた親和性カラムを用いてB151培養上清よりTRFを精製したが、精製B151-TRFの分子量

は約46kDaであり還元により23kDaになった。このことから、B151細胞の産生するTRFは2量体より構成されていることが分かった。

われわれはKinashiらと共同でマウスTRFをコードするcDNAのクローニングをしその全塩基配列を決定した。当初TRFはB細胞に選択的に作用すると考えていたが、組み替えDNA由来TRFがB細胞のみならず、多種類の細胞に多彩な機能を発現させることよりTRFをIL-5と呼ぶことを提唱した。分泌型IL-5は113アミノ酸残基よりなるコアペプチドにN-型糖鎖が結合したものの2量体よりなる。IL-5のアミノ酸配列はマウスIL-3、マウスGM-CSFやマウスIFN- γ との部分的な相同性を除き、既存のリンホカインの構造とは異なった。

ヒトIL-5cDNAがマウスIL-5cDNAをプローブにATL-2細胞から単離された。ヒトとマウスIL-5cDNAのコーディング領域の塩基配列とアミノ酸配列を比較すると、それぞれ77%および70%の相同性がある。ヒトおよびマウスIL-5の染色体DNAの全構造も決定されているが、IL-5の染色体遺伝子は4個のエクソンと3個のイントロンから構成され、転写開始部位の上流域にTATA様配列(26塩基対)とCAAT様配列(73塩基対)が存在し、5'フランキング領域にヒトGM-CSF、マウスIL-4、ヒトIFN- γ およびヒトIL-2と強い相同性を示す部位が存在する。ヒトおよびマウスIL-5遺伝子はそれぞれ5番目および11番目の染色体上(GM-CSFやIL-3なども同一の染色体上)にマップされている。

マウス各種株化細胞でのIL-5 mRNAの発現をNorthernプロット法により調べたところ、(i) B151細胞は構成的に1.7kb IL-5 mRNAを発現しており、その発現はPMAにより増強される、(ii) 株化T細胞や胸腺腫細胞はPMAやCon A刺激によりIL-5 mRNAを発現する。(iii) 株化マクロファージ、株化骨髄単球性細胞、B白血病細胞、骨髄腫細胞などではマイトゲンなどで刺激してもその発現がみられない、(iv) Tbc感作T細胞はPPDやCon Aによる刺激によりIL-5 mRNAを強く発現することが明らかになった。正常T細胞をCon AやPMAで刺激してもIL-5 mRNAの発現はあまり強くみられない。このように、IL-5とIL-2のmRNAはそれぞれ抗原刺激したT_H細胞で発現されるが、Tbc感作や寄生虫感染は生体内でIL-5産生性T細胞の生成を増強し、試験管内で正常T細胞をCon A刺激した場合はIL-2産生細胞を選択的に刺激する。

MosmannはヘルパーT細胞を、産生するリンホカインの種類により2種類(T_H1とT_H2)に分けることを提唱した。それによると、T_H1はIL-2、IFN- γ

を T_H2 はIL-4, IL-5, IL-10を産生する。この考え方は、われわれの実験事実をよく説明できる。

分泌型IL-5の分子量は45~50kDaであり、還元条件下で約25~30kDaになることより、活性型IL-5遺伝子産物もT細胞由来IL-5と同様ホモダイマーであることが分かった。N-型糖鎖の結合を阻害し翻訳させたIL-5も生物活性を保持していたことより、分泌型IL-5分子上の糖鎖は生物活性の発現に必須でないことが分かる。単量体IL-5は生物活性を示さなかった。

2. IL-5の生物活性

IL-5は種々の標的細胞の増殖や分化を調節する多機能性サイトカインである。IL-5は活性化B細胞の抗体産生細胞への増殖や分化を促進し、IgA産生の促進因子として作用し、Ly-1⁺陽性早期B細胞の増殖を支持する活性に加えて、B細胞表面にIL-2レセプター α 鎖の発現を誘導させるなど、マウスB細胞への作用はよく知られている。また、好酸球の増殖・分化に極めて重要な役割をしていることが知られてきている。最近、肥満細胞がFc ϵ Rを介する刺激やイオノマイシンを介する刺激によりIL-5を産生することが示され、また好塩基球からのヒスタミン放出がIL-5により促進されることが分かってきた。即時型アレルギー反応におけるIL-5の関与が注目されてきているゆえである。

Tominagaらは骨髓細胞培養系を駆使してIL-5依存性に増殖する8種類の早期B細胞株を樹立した。細胞株は形態学的にリンパ球であり、その表面マーカーはsIgM⁺, cIgM⁺, Ly-1⁺, B220⁺, IL-2R⁺, Lyb-2⁺, Ia⁺であった。J_Hプローブを用いてサザン法で調べたところ、IgH鎖遺伝子は胚細胞型であった。このようなLy-1⁺B系細胞株の生存には、生後3週以前のマウス骨髓細胞をWhitlock-Witteの培養条件で増殖性の細胞を骨髓支持細胞(ST2)上でIL-5存在下に培養することが必須であった。J8とJ10株を5-azacytidineで処理しST2上でIL-5と培養すると、前者はsIgM⁺, Ly-1⁺B細胞に後者はMac-1⁺, Ly-1⁺のマクロファージになった。また別の細胞株(J1, J8, J13)をST2上でIL-5と1年以上培養すると、IgH遺伝子は不均一な再構成パターンを示し、細胞表面に μ 鎖の発現がみられ、 μ 鎖-および λ 5-mRNAを発現していたことより、親株がpre-B細胞に分化したことが分かる。

興味あることに、それらの細胞群はc-fms mRNAを発現していた。そこで、細胞をST2とIL-5の代わりにST2とGM-CSFで培養したところLy-1⁺, sIgM⁺, Mac-1⁺となり、非特異的エステラーゼ陽性でラテックス粒子を貪食し、形態学的にもマクロファージになった。これらの事実は骨髓系とLy-1⁺B細胞の

分化経路が極めて密接な関連があり、IL-5依存性クローンはLy-1⁺ pro-B細胞からB細胞やマクロファージへの分化における多能性の前駆細胞であることを示している。

生体内でのB細胞や好酸球の分化におけるIL-5の関与を探るため、メタロチオネインプロモーターに連結したマウスIL-5遺伝子を用い、IL-5トランスジェニック(Tg)マウスを作製した。IL-5 TgマウスではIL-5 transgeneの発現が脾臓と肝臓でみられ、血中IL-5値が正常マウスの1,600倍以上であり、血中IgMとIgAは正常マウスの3~5倍の高値を示し、IgMクラス自己抗体が検出された。また脾臓にLy-1⁺, IL-5受容体陽性B細胞亜集団(正常マウスではみられない)が検出された。また血中で著明な好酸球増多(>40%)がみられ、脾臓、肝臓、筋肉などの組織内への好酸球の浸潤が認められた。

興味あることに、IL-5 Tgマウスは見かけ上正常であった。寄生虫感染、アレルギー、炎症などにおける危急の際の好酸球の動員、遊走、活性化などにIL-5が重要な役目を果たしていると考えられるが、疾病の発症には付加的な微小環境がサイトカインが必要なかもしれない。

3. IL-5レセプター

純度の高いリコンビナントIL-5精製標品を用い、IL-5反応性細胞の細胞表面に存在するIL-5レセプター(IL-5R)の同定を試みた。放射標識IL-5を用いた結合試験により、IL-5応答性マウス慢性B白血病細胞株(BCL₁)やIL-5依存性に増殖する早期B細胞株(T88-M)の膜表面上にはIL-5に特異的なレセプターが存在すること、IL-5結合部位は高親和性および低親和性の2種類存在し、IL-5シグナルは高親和性結合部位を介して細胞内に伝達されることなどが分かった。放射標識IL-5を用いた化学架橋実験から、高親和性IL-5Rは約60kDaと約120~130kDaの少なくとも2種類のタンパク質より構成されていることが示された。

T88-M細胞の膜画分でラットを免疫し、ラット抗IL-5R mAbs, H7 (IgG2a, κ)とT21 (IgG1, κ)を作製した。両抗体はIL-5のT88-M細胞への結合を特異的に阻害する。

細胞染色法により、H7 mAbはIL-5Rを発現している細胞株と反応するが、FDC-P1 (IL-3依存性細胞株), MTH (IL-2依存性細胞株)などのIL-5R陰性細胞とは反応しないことが分かった。H7 mAbとT88-M細胞との反応は大過剰のIL-5により抑制された。免疫沈降実験により、H7 mAbはIL-5Rを発現している細胞表面上の分子量60kDa分子と反応することが分かり、その免疫沈降は大過剰の非標識IL-5によ

り特異的に抑制をうけた。以上より、H7 mAb が細胞表面に存在する IL-5 結合性の分子量 60 kDa タンパク質を認識するものであると結論した。

H7 mAb を用いて、正常リンパ系細胞での IL-5R 陽性細胞の分布を調べたところ、B細胞、好酸球および骨髄細胞の表面上に IL-5R が検出された。興味あることに、(i) 腹腔内 B細胞の 70%以上が IL-5R を発現しているのに脾臓内 B細胞では約 8%しか発現していない、(ii) 腹腔内 $Ly-1^+$ B細胞のほとんどが IL-5R を発現しているのに脾臓内 B細胞には $Ly-1^+$ B細胞も少ないしそれらのほとんどは IL-5R 陰性であった。ちなみに腹腔内および脾臓内の IL-5R⁺ B細胞の約 3 個に 1 個が IL-5 に応答して IgM 産生細胞に分化した。IL-5 Tg マウスや寄生虫感染マウスの腹腔内より好酸球を精製し IL-5R を調べたところ、マウス好酸球上には高親和性および低親和性 IL-5R の存在が確認され、その性状はマウス B細胞上のそれとほとんど同じであった。

1) マウス IL-5R 遺伝子の単離

標的細胞上の IL-5R 数は細胞あたり $10^2 \sim 10^3$ 個であり IL-5R 分子を単離することはむずかしい。そこでわれわれは H7 と T21 mAbs を用いた発現クローニング法によりマウス IL-5R cDNA のクローニングを試みた。IL-5 依存性早期 B細胞株 Y16 のポリ (A)⁺ RNA より cDNA ライブラリーを作成し動物発現ベクター CDM8 に組みこんだ。約 200 万種類のクローンから成るライブラリーを作成し、COS7 細胞に遺伝子導入した。IL-5R を発現している細胞を H7 & T21 mAbs と 2 次抗体としてヤギ抗ラット IgG 抗体を用いたパンニング法によってスクリーニングした。最終的に選択されたクローンを個別に分析し、pIL-5R.8 クローンを得た。pIL-5R.8 の cDNA インサートをプローブに用い、cDNA ライブラリーを再スクリーニングし、pIL-5R.8 とは異なる 3 種類 (pIL-5R.13, pIL-5R.2, pIL-5R.39) の cDNA クローンを単離した。

単離した cDNA の全塩基配列を決定したが、pIL-5R.8 と pIL-5R.13 は 415 アミノ酸よりなる 1 種類の蛋白質をコードでき、予想されるアミノ酸配列にはシグナルペプチドを含む 2 カ所の疎水性の高い領域があり、IL-5R は I 型膜タンパク質であることが分かった。成熟型 IL-5R は細胞質外ドメイン (322 残基)、膜貫通領域 (22 残基)、細胞質内ドメイン (54 残基) の合計 398 アミノ酸残基よりなり、その分子量は 45,284 ダルトンと計算された。マウス IL-5R の細胞質外ドメインはこれまでに報告されている他のサイトカインレセプターのそれに類似しており、2 組のシステイン残基と、膜貫通部の近傍に "WSXWS" モチーフが存在した。IL-5R はサイトカインレセプター遺伝子ファミリーに属していると考えられた。

IL-5R は前記コンモモチーフ配列の前に IL-5R に特有の構造を有するが、ヒト IL-6R のような Ig ドメイン様の構造は持たない。IL-5R の細胞質内ドメインのアミノ酸配列は比較的ユニークである。チロシンキナーゼやプロテインキナーゼの catalytic domain の構造や、高頻度のセリン残基は存在しない。しかしながらプロリンクラスターを含む膜貫通部分に続くアミノ酸配列はヒト GM-CSF レセプター、ラットプロラクチンレセプターやヒト成長ホルモンレセプターなどと類似の構造が保持されている。

pIL-5R.2 および pIL-5R.39 のヌクレオチド配列は pIL-5R.8 とほとんど同じであったが、それぞれ膜貫通部分をコードすると予想される塩基配列の小部分が欠失しており、その結果フレームシフトがみられた。欠失部分の 5' 側は 2 つのクローンで一致しており、これらの cDNA は alternating splicingにより起こると推測される。IL-5R のほかに、IL-4, IL-7, 成長ホルモンなどのレセプターにも膜結合型と分泌型レセプター cDNA の存在が報告されている。分泌型 IL-5R cDNA の存在は分泌型レセプターが免疫反応や造血系において何らかの調節作用を持っていることを推測させる。

IL-5R の存在が確認されている細胞群に限って、5.0-kb と 5.8-kb の 2 種類の IL-5R mRNA の発現が観察され、その発現量は IL-5 結合試験で求められた低親和性 IL-5R 数に比例していた。5.0-kb と 5.8-kb mRNA の発現比は IL-5R 陽性株細胞の間で違いがあった。なぜ 2 種類のサイズの IL-5R mRNA の発現があるか現在のところ説明ができない。分泌型 IL-5R の発現を PCR 法で検索したところ、Y16 以外の株細胞でも、膜結合型と分泌型レセプターのそれぞれに対応する mRNA のバンドが検出された。

pIL-5R.8 cDNA を COS7 細胞で発現させ IL-5 結合試験をしたが、COS7 細胞は $K_d = 2.0 \text{ nM}$ の低親和性結合のみ示した。高発現ベクター系 pCAGGS に pIL-5R.8 のインサート部分を挿入し (pCAGGS-5R), COS7 細胞で発現させたところ、pIL-5R.8 導入細胞に比し約 70 倍の IL-5R を発現したが、やはり 1 種類の低親和性結合 ($K_d = 9.6 \text{ nM}$) しか検出されなかった。

pCAGGS-5R を遺伝子移入した COS7 細胞を放射標識 IL-5 と反応させ化学架橋実験を行ったところ、約 97 kD の IL-5/IL-5R の架橋複合体が認められた。また複合体の形成は非標識 IL-5 の過剰添加により消失した。ヨード標識 COS7 細胞の膜画分を H7 mAb で免疫沈降させると、約 60 kD の膜タンパク質が検出された。

以上より、単離した cDNA によってコードされるタンパク質は早期 B細胞株上に検出された、IL-5R の主な構成成分である約 60 kDa の膜タンパク質によく一致した性状を示し、この cDNA が IL-5R をコードする

と結論した。

高親和性 IL-5R は 60kDa のタンパク質 (p60) と約 130kDa のタンパク質 (p130) より構成される。われわれは p130 が線維芽細胞では発現しておらず造血系細胞で発現していると予測し、FDC-P1 細胞 (IL-5 に全く反応しない) に pCAGGS-5R と pSV2neo を導入し選択培地で増殖する細胞株 (FDC-5R) を樹立した。それらは Kd=6nM の低親和性レセプターと Kd=30pM の高親和性 IL-5R を発現していた。親株の FDC-P1 や pSV2neo のみを導入した細胞は IL-5 に全く反応しないのに対し、FDC-5R は IL-5 に反応して増殖するようになった。このことより単離した cDNA は機能的 IL-5R の構成成分であることが証明された。

以上より高親和性 IL-5R の構築には、それ自身では IL-5 を結合しない p130 (FDC-P1 では発現されている) が必須であり、それが H7 抗原 (p60) と会合し機能的な高親和性 IL-5R を構築すると考えるとよく説明できる。これまで樹立された IL-5 反応性細胞株の多くのものが IL-3 にも反応することや、Rolink らが樹立した抗 IL-5R (R52.120) mAb が IL-5 や IL-3 依存性細胞の増殖を阻害するなどの知見、機能的 IL-5R の構成成分が IL-3 依存性細胞株に構成的に発現していることなどを考えあわせ、われわれは高親和性 IL-5R は IL-5 結合分子 (p60) と IL-3R 関連分子 (p130) より構成されていると考えている。

おわりに

本稿においては、筆者らが行った IL-5 と IL-5R の同定とその遺伝子単離について述べた。IL-5 は B 細胞のみならず好酸球の増殖と分化を誘導する。そのシグナルは細胞表面上の IL-5R を介してなされる。いかなる機構で IL-5 シグナルが細胞内へ伝達されるのか不明の点も多い。われわれは IL-5R 分子 (p60) の遺伝子単離をしたが、それ単独の発現では低親和性 IL-5R しか発現しない。われわれは最近 p60 と会合する p130 の同定をした。それは IL-3R 類似分子 (AIC2B) であり、それ単独では IL-5 への結合能を示さなかった。したがって p130 は IL-5/p60 の結合を安定化させ、低親和性から高親和性 IL-5R に変換させると考えている。COS7 細胞に p60 cDNA と p130 cDNA を co-transfection すると高親和性 IL-5R の発現はみられるが、IL-5 に対する応答性はみられない。このことより IL-5 のシグナル伝達系には未だ同定されていない第3の分子の関与が考えられる。

IL-5 とそのレセプター系をはじめ、サイトカインとそのレセプターシステムが抗核核免疫にいかなる役割を果たすのか、現時点では明らかでないが、近い将来に必

ず解明されるものと思われる。

ここで述べた IL-5 と IL-5R に関する研究は、熊本大学医学部免疫医学研究施設生物学部門において多くの共同研究者と行ったものである。また国内・国外の多くの共同研究者との研究のまとめでもある。ここに共同研究者に心から謝意を表したい。

文 献

- 1) Takatsu, K., Haba, S., Aoki, T. et al. : Enhancing factor on anti-hapten antibody response released from PPDs-stimulated *Tubercle bacilli*-sensitized cells. *Immunochimistry*, 11 : 107-19, 1974.
- 2) Takatsu, K., Tominaga, A. and Hamaoka, T. : Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). I. Functional characterization of a TRF-producing helper T cell subset and genetic studies on TRF production, *J Immunol*, 124 : 2414-2422, 1980.
- 3) Takatsu, K., Tanaka, K., Tominaga, A. et al. : Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). III. Establishment of T cell hybrid clone continuously producing TRF and functional analysis of released TRF, *J Immunol*, 125 : 2646-2654, 1980.
- 4) Harada, N., Takahashi, T., Matsumoto, M. et al. : Production of a monoclonal antibody useful in the molecular characterization of murine T-cell-replacing factor/B-cell growth factor II, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 : 4581-4585, 1987.
- 5) Kinashi, T., Harada, N., Severinson, E. et al. : Cloning of cDNA for T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II, *Nature*, 324 : 70-73, 1986.
- 6) Honjo, T. and Takatsu, K. : Interleukin 5. "Peptide Growth Factors and their Receptors" (Handbook of Experimental Pharmacology) (eds. Sporn, M. B. Roberts, A.), pp. 609-632, Springer-Verlag, 1990.
- 7) Tominaga, A., Matsumoto, M., Harada, N. et al. : Molecular properties and regulation of mRNA expression for murine T cell-replacing factor/IL-5, *J Immunol*, 140 : 1175-1181, 1988.
- 8) Mossmann, T. R., Coffman, R. L. : Two types of mouse helper T cell clone, Immu-

- nology Today, 8 : 223-227, 1987.
- 9) Takatsu, K., Tominaga, A., Harada, N. et al. : T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5) : Molecular and functional properties, Immunol Rev, 102 : 107-135, 1988.
 - 10) Yamaguchi, Y., Suda, T., Suda, J. et al. : Purified interleukin-5 (IL-5) supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors, J Exp Med, 167 : 43-56, 1988.
 - 11) Takatsu, K., Kikuchi, Y., Takahashi, T. et al. : Interleukin 5, a T-cell-derived B-cell differentiation factor also induces cytotoxic T lymphocytes, Proc Natl Acad Sci USA, 84 : 4234-4238, 1987.
 - 12) Matsumoto, R., Matsumoto, M., Mita, S. et al. : Interleukin 5 induces maturation but not class-switching of surface IgA-positive B cells into IgA-secreting cells, Immunology, 66 : 32-38, 1989.
 - 13) Sonoda, E., Matsumoto, R., Hitoshi, Y. et al. : Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with IL-5 for IgA production, J Exp Med, 170 : 1415-1420, 1989.
 - 14) Tominaga, A., Nishikawa, S-I., Mita, M. et al. : Establishment of IL-5 dependent early B cell lines by long-term bone marrow cultures, Growth Factors, 1 : 135-148, 1989.
 - 15) Katoh, S., Tominaga, A., Migita, M. et al. : Conversion of Ly-1⁺ B lineage cells into Ly-1⁺ macrophages in long-term bone marrow culture, Develop Immunol, 1 : 113-125, 1990.
 - 16) Tominaga, A., Takaki, S., Koyama, N. et al. : Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor (IL-5) gene develop eosinophilia and autoantibody production, J Exp Med, 173 : 429-437, 1991.
 - 17) Mita, S., Harada, N., Naomi, S. et al. : Receptors for T cell-replacing factor (TRF) /Interleukin 5 (IL-5) : Specificity, quantitation and its implication, J Exp Med, 167 : 863-878, 1988.
 - 18) Mita, S., Tominaga, A., Hitoshi, Y. et al. : Characterization of high-affinity receptors for interleukin 5 (IL-5) on IL-5-dependent cell line, Proc Natl Acad Sci USA, 86 : 2311-2315, 1989.
 - 19) Yamaguchi, N., Hitoshi, Y., Mita, S. et al. : Characterization of the murine interleukin 5 receptor by using a monoclonal antibody, Int Immunol, 2 : 212-219, 1990.
 - 20) Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Mita, S. et al. : Distribution of mouse interleukin 5 receptor-positive B cells : Expression of IL-5 receptor on CD5 (Ly-1)-positive B cells, J Immunol, 144 : 4218-4325, 1990.
 - 21) Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Korenaga, M. et al. : *In vivo* administration of antibody to murine IL-5 receptor inhibits eosinophilia of IL-5 transgenic mice, Int Immunol, 3 : 135-139, 1991.
 - 22) Takaki, S., Tominaga, A., Hitoshi, Y. et al. : Molecular cloning and expression of the murine interleukin 5 receptor, EMBO J, 9 : 4367-4373, 1990.