

Biochemical Characterization of an Antigen-Specific Suppressor T Cell Factor Produced by Anti-Idiotypic T Cell Hybridoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8291

抗原特異的抑制因子の生化学的解析

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

松 下 栄 紀

(平成3年12月26日受付)

IgG 抗体産生系において抗原 (Keyhole limpet hemocyanin, KLH) 特異的であり、かつ遺伝的拘束性 (H-2^b) を有する抑制 T 細胞因子について、その生化学的解析を試みた。抗イディオタイプ (idiotype, Id) 陽性抑制 T 細胞ハイブリドーマ (34S-281) は、通常は静止ともいえる状態にあり抑制活性を有しないが、Id 陽性抑制 T 細胞因子あるいは一部の抗 KLH 抗体によって活性化され、上記の抑制因子を産生するようになる。この分泌性の抑制因子を陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過および逆相クロマトグラフィーを用いて精製した。またカラム操作後、抑制活性を有する分画を sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) あるいは等電点電気泳動法にて解析し、抑制因子の分子量および等電点を測定した。その結果、抗 Id 陽性抑制 T 細胞ハイブリドーマ由来の因子の分子量は 22-37 kilodalton (Kd) であり等電点は pH 6.0-6.1 であることが判明した。さらに、この抑制活性を上記の操作により 1.5×10^4 倍まで濃縮し得た。一方、活性化抗 Id 陽性抑制 T 細胞ハイブリドーマのメッセンジャー RNA (messenger RNA, mRNA) をラビット網赤血球ライセートを用いて得た蛋白質も、抗原特異的かつ遺伝的拘束を有する抑制活性を示し、SDS-PAGE および等電点電気泳動法を用いた解析で、ハイブリドーマから分泌される蛋白質と同様の分子量および等電点を示した。以上の結果は、この抑制因子が一本鎖から構成され、生物学的活性を示すには糖鎖の関与を必要としないことを示唆している。さらに、活性化および非活性化ハイブリドーマのそれぞれから mRNA を抽出し、これらと ³⁵S-メチオニンを含むアミノ酸を用いて試験管内で合成した蛋白質を二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に展開し比較した。この結果、活性化ハイブリドーマ由来の mRNA 産物では非活性化ハイブリドーマ由来のそれに比して、新たな2つのスポットが出現していることが判明した。したがって、これらのうち一方のスポットに相当する蛋白質が抗原特異的かつ遺伝的拘束を示す抑制細胞因子である可能性があると考えられる。

Key words anti-idiotypic suppressor T cell hybridoma, suppressor factor, KLH-specific, biochemical analysis

抗体産生の抑制は機能の異なるいくつかの抑制 T 細胞 (suppressor T cell, Ts) の相互作用により調節されており、特に、抗原特異的な Ts が抗原特異的かつ遺伝的拘束を有する抑制活性の発現に重要な働きを担っていることが知られている^{1)~3)}。これまでに、合成共重合体 L-glutamic acid³⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰ (GAT)、ハブテン 4-hydroxy-3-nitrophenyl-acetyl (NP)、azobenzenarsonate (ABA) および keyhole limpet hemocyanin (KLH) などの抗原を用いて抑制サーキットの解析がなされ、免疫応答の抑制活性発現に機能の異なる3つのタイプの Ts が関与することが明らかにされてきた⁴⁾。このうちの2つは、抗原結合活性を有するイディオタイプ (idiotype, Id) 陽性 Ts と、それと相補的レセプター構造を有する抗イディオタイプ (anti-idiotypic, anti-Id) 陽性 Ts であり、両者とも抑制サーキットの初期相において、抗原特異的で遺伝的拘束を有する抑制活性を媒介する。これらの細胞がインデューサー-Ts と呼ばれるのに対し、もう1つはエフェクター-Ts と呼ばれ、このタイプの T 細胞は抗原結合能を有するにもかかわらず、抗原非特異的で遺伝的拘束を示さない抑制活性に関与している。さ

らに、こういった抑制機能は Id 陽性 Ts および抗-Id 陽性 Ts から分泌される抑制因子 (リンフォカイン; suppressor T cell factor, TsF) によって発揮され、この抑制因子によって抗原特異性および遺伝的拘束性を有する抑制が発現することも明らかとなっている。

免疫調節機構を分子レベルで解明するため、我々は KLH を免疫した C57BL/6 マウス由来の脾細胞と BW5147 胸腺腫細胞とを細胞融合させ、KLH 特異的な T 細胞ハイブリドーマを作製した⁵⁾。これらのハイブリドーマを検索し2つのタイプのインデューサー-Ts、つまり KLH 特異的な Id 陽性 Ts ハイブリドーマ (34S-18) およびそれと相補的なレセプター構造を有する抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマ (34S-281) を同定し得た。Id 陽性 Ts ハイブリドーマは KLH 結合能を有するのに対し、抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマは KLH 結合能を持たないが、その細胞表面に KLH 様構造を有すると考えられた⁶⁾。また、34S-18 の培養液中には、抗原 (KLH) 特異的かつ遺伝的拘束 (H-2^b) 性を示し抗体産生を抑制するモノクローナルな TsF (KLH-specific TsF; TsF₁) が分泌され、この因子が、抗体産生

Abbreviations: Anti-Id, anti-idiotypic; DNP, 2,4-dinitrophenol; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; GAT, L-glutamic acid-L-alanine-L-tyrosine; Id, idiotype; IEF, isoelectric focusing; Kd, kilodalton; KLH, keyhole limpet hemocyanin; OD, optical density; OVA, ovalbumin; PBS, phosphate buffered saline; PFC,

を測定する系である溶血素産生細胞 (plaque-forming cell, PFC) の溶血反応において、生体内および試験管内での、2,4-dinitrophenol (DNP) に対する二次の IgG 抗体産生を抑制することが明らかになった。さらに、この TsF₁ は 45kilodalton (Kd) と 28Kd の 2 本のポリペプチド鎖から構成され、45Kd の鎖に抗原結合能があり、28Kd の鎖は I-J 陽性分子で遺伝的拘束性を伝達することが明らかとなった⁷⁾。

一方、抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマ (34S-281) は通常は静止の状態にあり何らの抑制活性をも示さないが、34S-18 由来の KLH 特異的 TsF₁ あるいは抑制活性を有するいくつかの抗 KLH 抗体 (抗 KLH-26 抗体) で活性化され、新しい抑制因子 (TsF₂) を産生し、抗原が存在せずとも抗原特異的かつ遺伝的拘束を示す抗体産生の抑制を行うことが明らかとなった^{8,9)}。しかし、この 34S-281 の分泌する TsF₂ の分子構造はいまだ明らかにされていない。そこで、この TsF₂ の生化学的解析を試みるにあたり、活性化された 34S-281 ハイブリドーマを無血清培養液で培養したが、この条件下でも TsF₂ 産生能が消失せず、この TsF₂ によって抗 KLH IgG 抗体産生が抑制されることを確認し得た。これは培養上清より TsF₂ を精製するにあたり培養液中の他の蛋白質のコンタミネーションを避けるために非常に有利なことである。

今回、抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマから分泌される TsF₂ の生化学的特性およびその分子学的解析を行ったので報告する。

材料および方法

I. 実験動物

C57BL/6 マウス (主要組織適合抗原 H-2^b) および BALB/c マウス (主要組織適合抗原 H-2^d) (日本エスエルシー、浜松) を使用した。

II. 抗 原

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) (カルビオケム-ベーリング社、サンディエゴ、米国) および Ovalbumin (OVA) (シグマ社、セントルイス、米国) をアルカリ下でそれぞれ 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid とカップリングさせた (DNP-KLH, DNP-OVA)。

III. 抑制 T 細胞ハイブリドーマ

マウス胸腺腫細胞 (BW5147) と C57BL/6 マウスの KLH 刺激 T 細胞との融合株を使用した^{9,10)}。Id 陽性 Ts ハイブリドーマ (34S-18) および抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマ (34S-281) を 10% ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 培養液 (ギブコ社、グランドアイランド、米国) にて培養した。

IV. 抗-Id 陽性抑制 T 細胞ハイブリドーマの活性化

抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマの活性化法は、従来の方法に基づいた^{8,9)}。1×10⁷ 個の 34S-281 細胞を 3×10⁶ 個の 34S-18 細胞から得た培養上清 (KLH-TsF₁) あるいはモノクローナル抗 KLH-26 抗体 (1 μg/ml) と 4℃、1 時間培養の後、洗浄して KLH-TsF₁ あるいは抗 KLH 抗体を取り除き、10 μg/ml ウシインスリン (シグマ社)、10 μg/ml ヒトトランスフェリン (シグマ社) および 10⁻⁸ M ハイドロコルチゾン (シグマ社) を加えた無血清 RPMI 培養液にて培養した。72 時間後その培養上清を回収し TsF₂ として解析を行った。

V. 抑制 T 細胞因子の抑制活性の測定法

抑制活性の測定は従来の方法に従った¹⁰⁾。C57BL/6 および BALB/c マウスにそれぞれ 100 μg の DNP-KLH あるいは DNP-OVA を 1×10⁸ の百日咳菌ワクチン (千葉血清研究所、千葉) と共に免疫を施す。4 週後にそれらのマウスの脾細胞を取り出して単細胞浮遊液とし、この脾細胞 (1.6×10⁶) を 48 穴プレート (Coster 3548, コースター社、ケンブリッジ、米国) を用いて 10% 非働化ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 溶液 0.4 ml に 0.01 μg/ml の DNP-KLH または DNP-OVA を加えて Mishell-Dutton 培養系 (37℃, 0.5% CO₂) の中で 5 日間培養した。培養開始時に上記の KLH-TsF₂ を含む培養上清を 20 μl/well 加え、抑制活性は DNP をカップリングさせた羊赤血球を用いた抗-DNP IgG PFC 数で算出した。なお、各精製過程での抑制活性を、培養上清に含まれる IgG 産生抑制活性の 50% 抑制を示す濃度を 1 単位とした上で、50% 抑制を示す希釈濃度の逆数から単位で表示した。

VI. クロマトグラフィー

クロマトグラフィーを用いた実験はすべて Pharmacia fast protein liquid chromatography (FPLC) system (ファルマシア LKB 社、ウプスラ、スウェーデン) を使用した。

活性化 34S-281 ハイブリドーマの培養上清 (15 リットル) を、Mono Q 陰イオン交換カラムを用いて分画し、抑制因子の濃縮を行った。各分画の抑制活性を上記方法にて測定し、活性のある分画 (培養上清 10 リットル相当) をさらに Superose 6 カラムを用いてゲル濾過を行った。また、陰イオンカラムでの抑制活性のある分画の一部を用いてクロマトフォカシング (Mono P カラム使用) を行った。さらに、ゲル濾過にて抑制活性を有する分画 (培養上清 4.6 リットル相当) を逆相クロマトグラフィーにて精製し、sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) にて分画した。各分画は直ちに電氣的に溶出させ、それぞれの抑制活性を測定した。また、各分画に含まれる蛋白濃度は、dual beam flowthrough UV-absorptiometer (Single path monitor UV-1, ファルマシア LKB 社) を使用し、280nm の吸光度から算出した。

(A) 陰イオン交換クロマトグラフィー: 活性化 34S-281 ハイブリドーマの培養上清を 20mM トリス緩衝液 pH 7.0 で透析し、あらかじめ同じ緩衝液にて平衡化した Mono Q prepacked column HR5/5 に吸着させた後、1M NaCl を含む 20mM トリス緩衝液 pH 7.0 で 1ml/min の速度で 0M から 1M の直線勾配にて溶出した。

(B) クロマトフォカシング: Mono Q 陰イオンカラムで抑制活性を有した分画の一部 (培養上清 50ml 相当) を 25mM トリス緩衝液 pH 7.1 で透析後、同緩衝液で平衡化した Mono P prepacked column HR5/20 に流し、Polybuffer 74, pH 5.0 を抽出液として 0.7ml/min の速度で溶出した。各分画の pH を pH メーター F 8E (堀場、東京) で測定した。

(C) ゲル濾過: Mono Q 陰イオンカラムで分画した抑制活性を有する分画を、あらかじめリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) にて平衡化した Superose 6 prepacked column HR10/30 を用いて、0.5ml/min の速度でゲル濾過を

行った。

(D) 逆相クロマトグラフィー: Mono Q および Superose 6 カラムで精製した, 抑制活性を有する分画に0.1%トリフルオロ酢酸を加え, これをあらかじめ0.1%トリフルオロ酢酸含有蒸留水で平衡化した Pro-RPC HR5/2 column に吸着させた後, 0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル溶液を用いて (0から75%の直線勾配), 0.5ml/min の速度で溶出した。

VII. メッセンジャー RNA (messenger RNA, mRNA) の精製と無細胞蛋白合成

mRNA の抽出は Chirgwin の方法に従った¹¹⁾。1×10⁸ の抗 Id 陽性 Ts ハイブリドーマ細胞を2つに分け, 一方は培養液で (非活性化), 他方はモノクローナル抗 KLH 抗体で (活性化) インキュベーションした。非活性化および活性化ハイブリドーマ細胞をそれぞれ 4M guanidinium thiocyanate 溶液でホモジネートし, 18G 注射針で DNA を切断した。ホモジネートした溶液を 5.7M CsCl 液に重層し, スウィングローター-HITACHI RPS40T (日立, 東京) にて 36000rpm, 20℃, 12時間, 超遠心分離を行った。RNA を含む沈澱物をフェノール/クロロホルム処理にて除蛋白した後, オリゴ dT-セルロースカラムに通し, 吸着した mRNA を 10mM トリス緩衝液 pH7.5で抽出した。この時の mRNA の収率は3%であった。

ラビット網状赤血球ライセートは Pelham の方法で用意した¹²⁾。無細胞蛋白合成系は以下に行った。網状赤血球ライセート 47.4μl と Ts ハイブリドーマの mRNA 3μg を含む反応系に 216μCi ³⁵S-メチオニン (15μCi/ml, アマシャム社, バッキンガムシャー, 英国) を混合し, 30℃, 1時間インキュベーションした後, 20mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) にて反応を止めた。mRNA 翻訳産物の特異的放射活性は, mRNA 1μg に対し 3×10⁸cpm であった。また, mRNA 翻訳産物の抑制活性を調べるため, 非標識メチオニンで, 同様の無細胞蛋白合成を行った。

VII. ゲルからの抑制T細胞因子の抽出

無細胞蛋白合成産物および逆相カラムで分画した抑制活性を有する分画を SDS-PAGE¹³⁾ または等電点電気泳動法 (isoelectric focusing, IEF)¹⁴⁾ にて解析した。SDS-PAGE のゲルを 1cm 間隔で切断し各々のスライスを 200μl の PBS と共に透析膜チューブに入れ, 12時間, 100V の電圧で電氣的に抽出した。その後, 試料を PBS で透析した後, 抑制活性を希釈倍率を変えて測定した。抽出した試料のアッセイ系における最終濃度は 50μl/ml (20μl/well) とした。IEF のゲルは同様に 1cm のスライスにし, 37℃, 12時間, 200μl の蒸留水でインキュベーションした。これらの抽出物は PBS で透析した後, 上記の方法と同

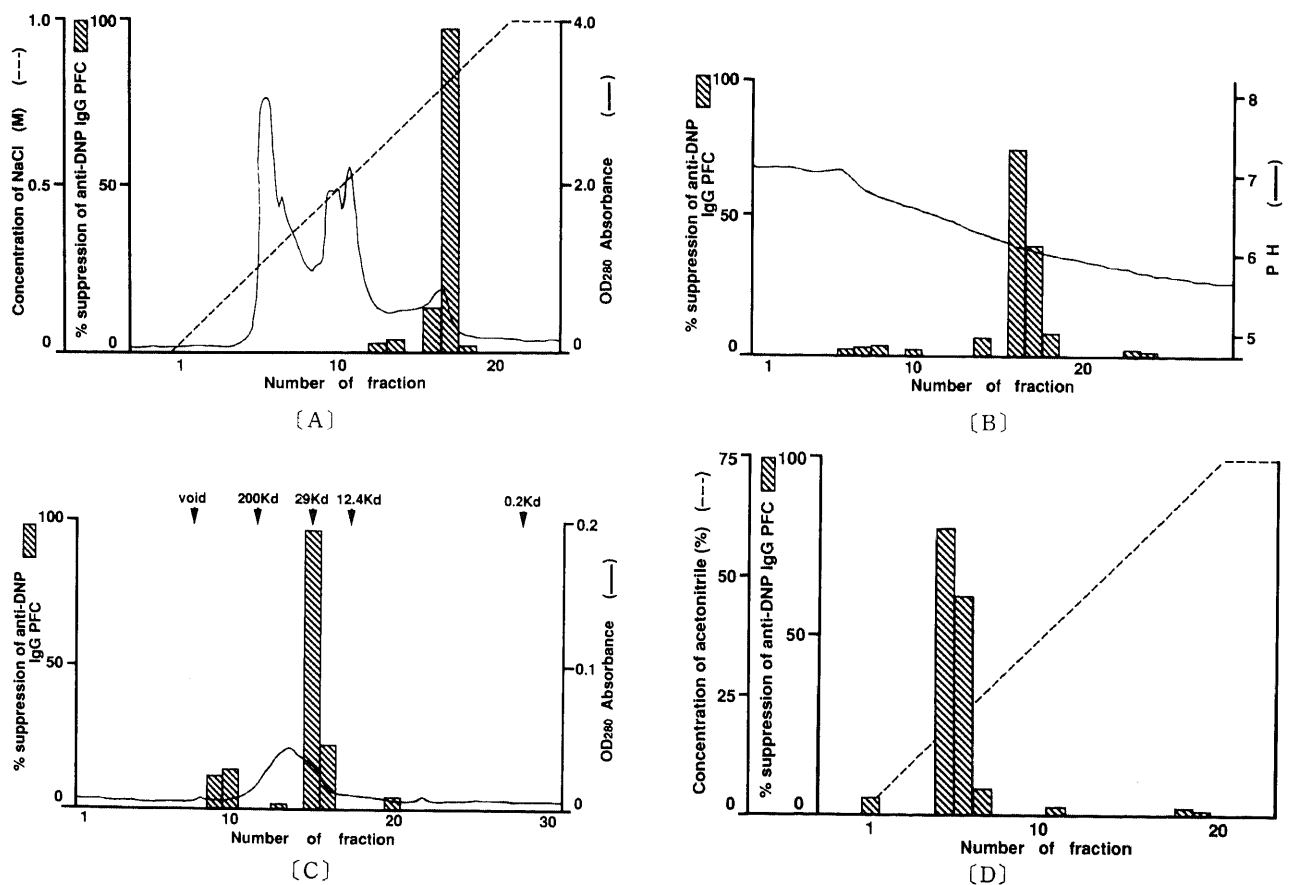


Fig. 1. Fractionation of TsF by chromatographical steps. Each fraction of every chromatography was tested for its suppressive activity in the *in vitro* anti-DNP IgG PFC responses. The activity was expressed as % suppression of IgG responses (hatched column). 【A】 Anion exchange chromatography of Mono Q column (HR5/5). The activity of NaCl (broken line) and OD₂₈₀ (solid line) are shown. 【B】 Chromatofocusing of Mono P column (HR5/20). The pH gradient value made by Polybuffer (solid line) was determined in every fraction. 【C】 Gel filtration of Superose 6 column (HR10/30). Molecular weights were determined by standard proteins, and OD₂₈₀ (solid line) is shown. 【D】 Reversed phase chromatography of Pro-RPC column (HR5/2). Concentration of acetonitrile (broken line) is included to show the gradient pattern.

様にして抑制活性を調べた。

K. 二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (2-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)

非平衡 pH 勾配電気泳動法の方法は O'Farrell に従った¹⁵⁾。一次元は pH 3.5-10 と pH 5-7 のアンフォラインを同等量用い、pH 勾配を作製した。無細胞蛋白合成産物 30 μ l (mRNA 0.45 μ g に相当) を、溶解緩衝液 (9.5M 尿素, 2% NP-40, 2% アンフォライン, 5% 2-メルカプトエタノール) 30 μ l と混合し、500V で 4 時間、電気泳動した。二次元はゲルを SDS-PAGE 試料緩衝液に 1 時間、37°C でインキュベーションした後、還元条件下で SDS-PAGE (12%ゲル) を行った。ゲルはメタノール/酢酸/トリクロロ酢酸/水 (30:10:10:50) で固定し、EN⁺HANCE (New England Nuclear, ボストン, 米国) でソーキングした。オートラジオグラフィーには Kodak X 線フィルム (XAR-5, イーストマンコダック社, ロチェスター, 米国) およびインテンシファイヤーを使用した。

成 績

I. 活性化抗-Id 陽性 Ts 由来 TsF₂ の抗体産生系における特異性の検討

抗原 DNP-KLH に対する二次抗-DNP IgG 抗体を検出する試験管内での培養系を用いて、抗-Id 陽性 Ts より産生される TsF₂ の抑制活性の特異性を調べた。DNP-KLH あるいは DNP-OVA で免疫した C57BL/6 の脾細胞および DNP-KLH で免疫した BALB/c マウスの脾細胞の培養系に、活性化した抗

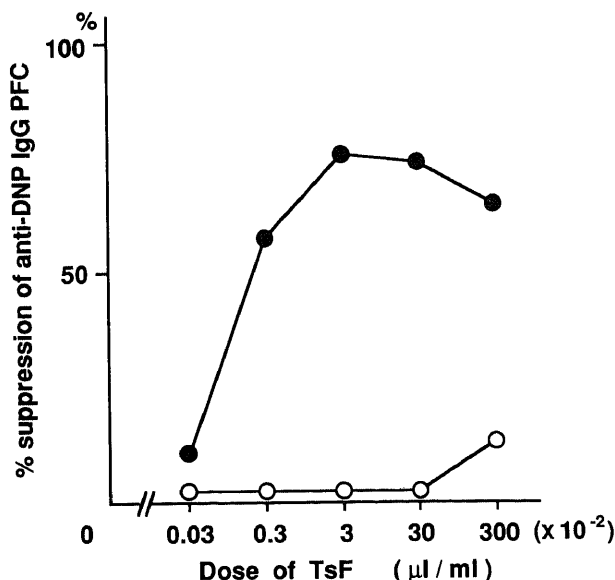


Fig. 2. Specific suppressive activity of TsF enriched by the Mono Q column. With 15l of culture supernatant from activated Ts hybridomas as starting materials TsF was enriched in 1ml and the activity was assayed as described in *Materials and Methods*. Various doses of the Mono Q fraction 17 was added to the culture of C57BL/6 spleen cells primed with DNP-KLH (●) or BALB/c spleen cells primed with DNP-KLH (○). Data show % suppression of anti-DNP IgG PFC responses. The mean PFC numbers and standard deviations of control response in each group were 1510 $\pm$ 20 (DNP-KLH, C57BL/6) and 8000 $\pm$ 1140 (DNP-KLH, BALB/c). TsF activity was enriched about 1200 times in this particular experiment.

-Id 陽性 Ts ハイブリドーマの培養上清を濃度を変えて添加し、二次追加抗原刺激を加えた後、抗-DNP IgG 抗体産生を PFC にて測定した。表 1 に示す如く、DNP-KLH で免疫した C57BL/6 脾細胞を用いた場合、用量依存性の抗-DNP IgG 産生抑制を認めたが、DNP-OVA 免疫 C57BL/6 および DNP-KLH 免疫 BALB/c 脾細胞を用いた場合にはハイブリドーマ培養上清による抗体産生抑制は認められなかった。これらのことは、抗-Id 陽性 Ts 由来の抑制因子が抗原特異性および遺伝的拘束性を有する事を示している。なお、非活性化状態での抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマの培養上清は抗体産生に全く影響を与えなかった。

II. TsF₂ の生化学的特性と精製

KLH 特異的 TsF₂ の生化学的特性の解析と精製をクロマトグラフィーの手法を用いておこなった。無血清培養液で抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマを培養し、その培養上清をまず陰イオン交換クロマトグラフィーに通し、TsF₂ の濃縮を試みた。1M NaCl で 0M から 1M の直線的塩勾配を用いて溶出を行い、各分画 (1ml) を PBS で透析した後、各々の抑制活性を測定した。図 1A に塩勾配と 280nm の吸光度 (optical density, OD₂₈₀) および PFC 法を用いた抗-DNP IgG 産生抑制 (%抑制) を示す。その結果、分画 17 (塩濃度 0.8~0.85M) に主な TsF 活性を認め、その抑制様式は図 2 に示す如く遺伝的拘束を示した。また、陰イオン交換カラムにより、TsF 活性は培養上清に

Table 1. Specific suppression by TsF derived from the activated Ts hybridoma

TsF ₂ (Culture Supernatant) μl/ml	Anti-DNP IgG PFC/10 ⁶ Culture Cells ^a		
	C57BL/6 DNP-KLH	BALB/c DNP-KLH	C57BL/6 DNP-OVA
None	1370 $\pm$ 160 ^b	2130 $\pm$ 260	790 $\pm$ 110
400	110 $\pm$ 20	2200 $\pm$ 140	670 $\pm$ 20
200	370 $\pm$ 160	2690 $\pm$ 100	830 $\pm$ 60
100	450 $\pm$ 60	2250 $\pm$ 140	770 $\pm$ 180
50	1120 $\pm$ 40	2150 $\pm$ 230	880 $\pm$ 120
25	1320 $\pm$ 310	2130 $\pm$ 220	830 $\pm$ 60

a. The assay for TsF activity was described in *Materials and Method*. Various doses of culture supernatant from the activated Ts hybridoma were added to the culture of C57BL/6 spleen cells primed with DNP-KLH, with DNP-OVA or BALB/c spleen cells primed with DNP-KLH.

b. The data show mean PFC numbers $\pm$ standard deviations.

Table 2. Enrichment of TsF by several chromatographical steps

Purification Steps	Total Activity ^a (U)	Specific Activity ^b (U/protein)	Purification (fold)	Recovery of TsF (%)
Cult. Sup.	1.4 $\times$ 10 ⁵	2.1 $\times$ 10 ²	1	—
Mono Q	9.2 $\times$ 10 ⁴	2.6 $\times$ 10 ⁵	1.2 $\times$ 10 ³	66
Superose	4.1 $\times$ 10 ⁴	1.7 $\times$ 10 ⁶	8.1 $\times$ 10 ³	29
Pro-RPC	1.4 $\times$ 10 ⁴	3.1 $\times$ 10 ⁶	1.5 $\times$ 10 ⁴	10

a. The end point of suppressive activity was determined by functional assay with various doses of samples in the *in vitro* secondary anti-DNP IgG PFC responses as described in *Materials and Methods*. One unit (U) of suppressive activity corresponds to TsF giving 50% suppression of anti-DNP IgG PFC responses of C57BL/6 mice. 4.6 liters of culture supernatants were used as starting materials.

b. Protein concentration was determined by OD₂₈₀.

対し、1200倍に濃縮された(表2)。次に TsF_2 の等電点を決定するため、陰イオン交換カラムで分画した分画17の一部で、Mono P カラムを用いたクロマトフォカシングを行った。図1Bに pH 勾配と抗-DNP IgG PFC の%抑制活性を示した。分画16 (pH 6.0-6.1) で主に抑制活性を認め、その抑制様式は抗原特異的かつ遺伝的拘束性を有していた。さらに、 TsF_2 の分子量をゲル濾過法および SDS-PAGE により測定した。Mono Q カラムで分けた分画17の試料を Superose 6 カラムにかけ、各分画の抑制活性を測定した。図1Cに示す如く分画15に抑制活性を認め、その分画の分子量は標準蛋白と比較して、22から 37Kd に相当すると考えられた。その抑制様式は同様に抗原特異性を示し、抑制活性は培養上清に対し8100倍に濃縮されていた(表2)。次に TsF 活性を有する Superose 6 カラムでの分画15をさらに逆相クロマトグラフィーにて精製した。抽出はアセトニトリル直線濃度勾配にて行った。結果を図1Dに示す。抑制活性は主に分画5および6に認められ、そのアセトニトリル濃度は15~22.5%であった。抑制様式は図3に示す如く、やはり遺伝的拘束性を有していた。また、抑制活性は培養上清に対し、15000倍に濃縮されたが、回収率は10%にすぎなかった(表2)。この TsF 活性を有する分画の試料の一部で SDS-PAGE を行い、ゲルを1cm 間隔で切断し、電氣的にゲルからの抽出を試み

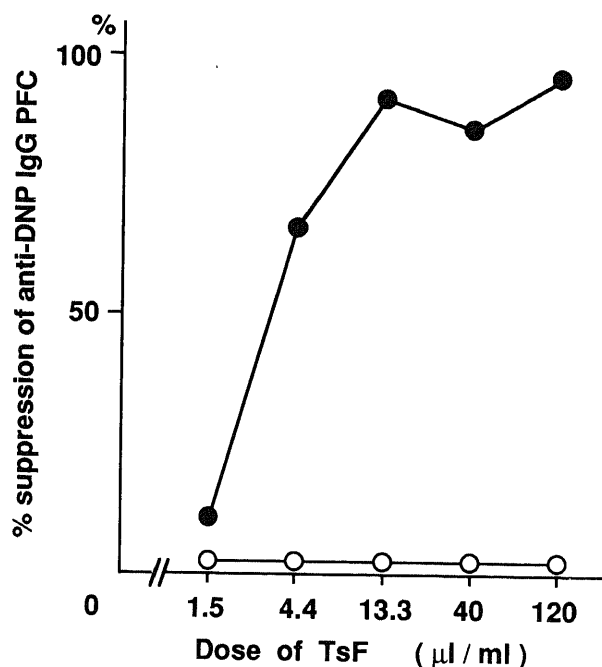


Fig. 3. Specific suppressive activity of TsF eluted from the Pro-RPC column. Culture supernatants (50ml) from activated Ts hybridomas TsF was applied to the Mono P column and further fractionated by Pro-RPC (final volume 0.5ml). The activity was assayed as described in *Materials and Methods*. Various doses of TsF were added to the culture of C57BL/6 spleen cells primed with DNP-KLH (●) or BALB/c spleen cells primed with DNP-KLH (○). Data show the percent suppression of anti-DNP IgG PFC responses. The mean PFC numbers $\pm$ SD of the control response in each group were 1350 ± 230 (DNP-KLH, C57BL/6) and 1550 ± 50 (DNP-KLH, BALB/c). The suppressive activity was partially lost by the treatment with organic solvent used in reversed-phase chromatography.

た。各抽出物の抑制活性を同様に測定したところ、還元下(図4)および非還元下の条件で、ともに抑制活性を 25-34Kd に相当するゲル断片に認めた。

Ⅲ. 試験管内翻訳産物の生物学的活性

無細胞蛋白合成系で合成した産物の生物学的活性を、試験管内で二次 IgG 抗体産生能で評価した。活性化および非活性化抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマから得た mRNA をオリゴ dT-セルロースカラムで精製し、poly A を有する mRNA を試験管内で翻訳した。表3に示すように、活性化 Ts からの翻訳産物のみが抑制活性を示し、しかも、DNP-KLH で免疫した C57BL/6 の脾細胞を用いた場合に認められ、DNP-KLH 免疫 BALB/c 脾細胞の系では抑制は見られなかった。また、非活性化 Ts からの翻訳産物では抑制活性は全く認めなかった。以上のことから、 TsF_2 は mRNA を介して翻訳される蛋白であることが示唆された。

さらに活性化 34S-281 ハイブリドーマから分離した mRNA

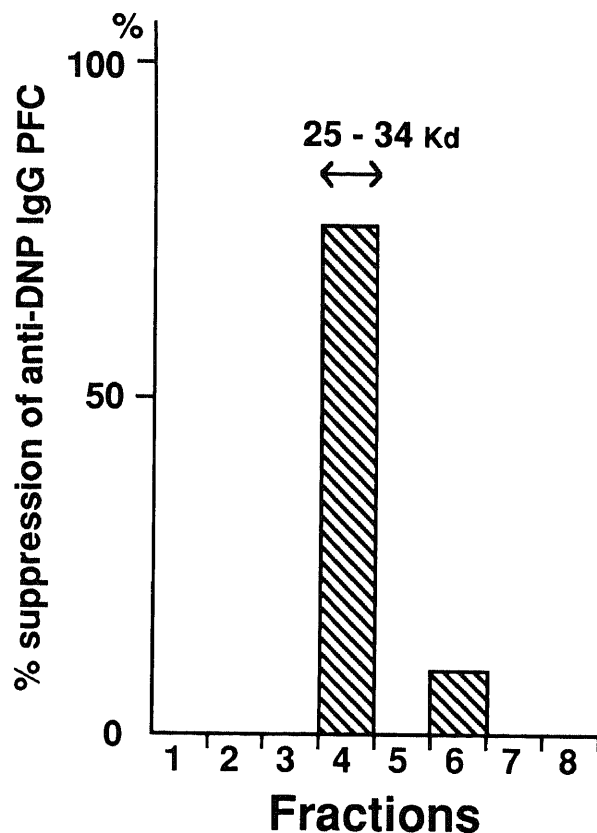


Fig. 4. Suppressive activity of TsF eluted from sliced SDS-PAGE gels. TsF was enriched from 4.6l of culture supernatant by passing through the Mono Q column (see figure 1-A and 2), the Superose column, and the Pro-RPC column. One tenth of the final volume (50 μ l) was subjected to SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) under reducing conditions. The biological activity shown as percent suppression of anti-DNP IgG PFC (hatched columns) was tested on the materials (1 μ l/ml in culture) eluted from every gel slice as described in *Materials and Methods*. Fractions correspond to molecular weights: more than 80 kilodaltons (1), 80-46 (2), 46-34 (3), 34-25 (4), 25-19 (5), 19-14 (6), 14-10.5 (7), and <10.5 kilodaltons (8). The mean PFC numbers $\pm$ SD of the control response in each group were 2050 ± 160 .

翻訳産物の性状を解析するため、その翻訳産物を SDS-PAGE および IEF のゲルにて分画した。次いで、それぞれのゲルを小切片に切断した後、電気的に抽出を行い、それらの抑制活性を測定した。図 5 に示すように、抑制活性は分子量 23~40Kd および pH 5.5~6.2 の範囲に集中していた。これらの結果は、活性化 34S-281 ハイブリドーマの培養上清をクロマトグラフィーで解析した結果に一致していた。

Table 3. Suppressor activity of mRNA translation products of Ts hybridoma

Translation Products ^a μl/ml	Anti-DNP IgG PFC/10 ⁶ Culture Cells		
	Activated Ts mRNA		Unactivated Ts mRNA
	C57BL/6 DNP-KLH	BALB/c DNP-KLH	C57BL/6 DNP-KLH
None	2300±400 ^b	6190±580	2330±400
10	350±220	5550±100	1890±640
3	610±220	5880±680	2520±600
1	2210±160	6000±440	3070±680
0.1	2050±470	6250±1190	2250±880

a. Messenger RNA (1.5 μg) from activated or unactivated Ts hybridomas were translated *in vitro* in 100 μl of the rabbit reticulocyte lysate system. The activity of mRNA products was assayed in the *in vitro* secondary anti-DNP PFC responses as described in *Materials and Methods*.

b. The data show mean PFC numbers±standard deviations.

IV. オートラジオグラフィーを用いた、活性化および非活性化抗-Id 陽性 Ts 由来 mRNA 翻訳産物の比較

活性化抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマ細胞由来 mRNA 翻訳産物が抑制活性を有することが判明したため、³⁵S-メチオニンで標識した活性化および非活性化抗-Id 陽性 Ts の mRNA 翻訳産物を 2-DE につけ、オートラジオグラフィーを用いて比較した。活性化および非活性化 Ts ハイブリドーマそれぞれの mRNA 産物から、250以上の蛋白スポットが検出されたが、それらのスポットの中で、活性化されたハイブリドーマ細胞からの mRNA 産物のみ出現し、非活性化のものでは見られないスポットが、2個存在していた(図6)。それらの分子量および等電点はそれぞれ 28Kd, pH 5.7および 25Kd, pH 5.5であった。これらのスポットは図5で得られた抑制活性を有する分画の分子量および等電点と一致していた。

考 察

抗原 (KLH) 特異的かつ遺伝的拘束 (H-2^b) を示す IgG 抗体産生系を抑制する TsF₂ の生化学的特性について解析した。この TsF₂ は抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマ (34S-281) の活性化によって分泌されるようになるが、その活性化は Id 陽性 KLH 特異的 Ts ハイブリドーマ (34S-18) より分泌される抑制因子 (TsF₁) あるいはそれ自身で抑制活性を有するモノクローナル抗 KLH 抗体と反応させることにより開始される⁽⁸⁾。したがって、

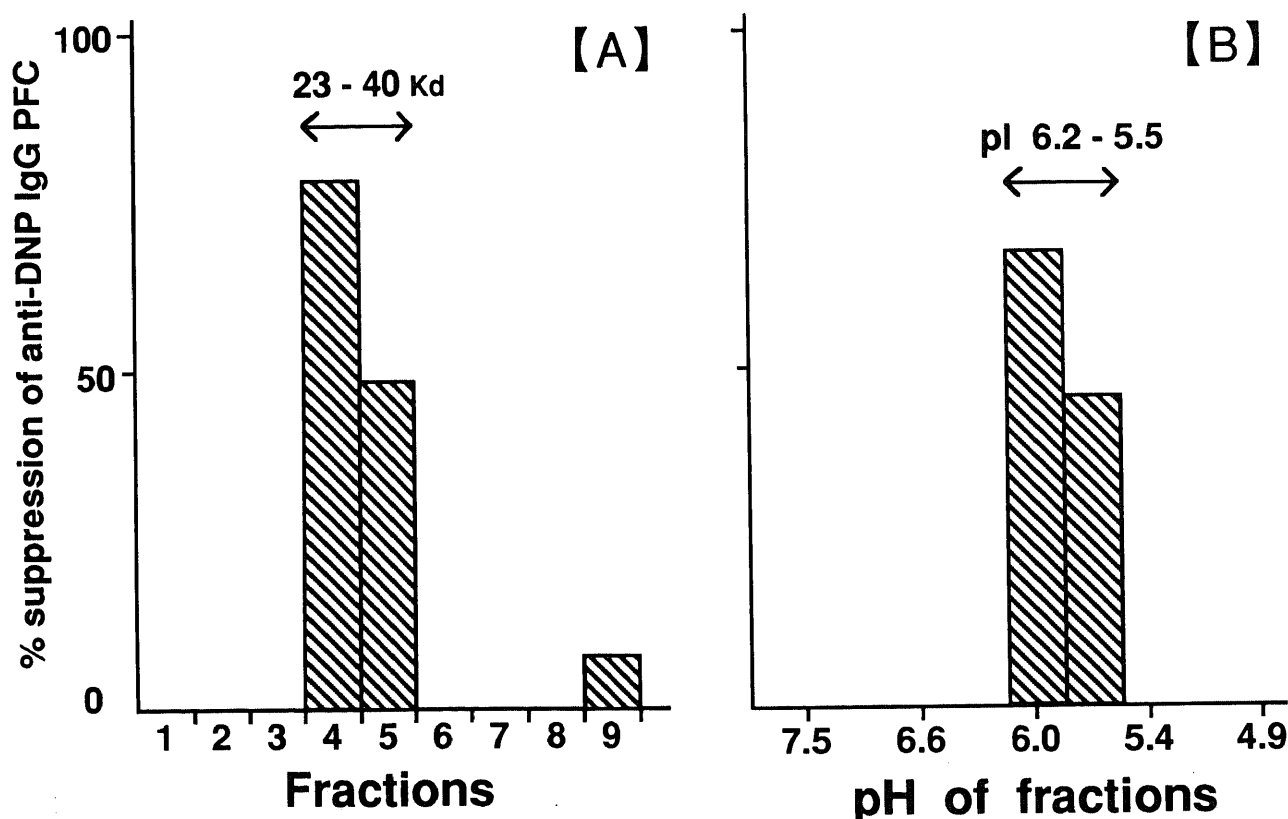


Fig. 5. Biochemical analysis of *in vitro* translation products from activated 34S-281 mRNA by SDS-PAGE 【A】 and IEF 【B】. Thirty microliters of translation products (equivalent to 0.45 μg of mRNA) were applied to SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel) and IEF. Biological activity shown as % suppression of anti-DNP IgG PFC (hatched column) was tested on the materials eluted from every gel slice. See *Materials and Methods*. 【A】. Fractions correspond molecular weights; 0-13-kd (1), 13-17-Kd (2), 17-23-Kd (3), 23-31-Kd (4), 31-40-Kd (5), 40-54-Kd (6), 54-71-kd (7), 71-98-Kd (8), more than 98-Kd (9). The mean PFC numbers±SD of control response in each group were 6800±650 【A】 and 【B】.

ここに示した TsF₂ は、GAT および NP 特異的 Ts 系で報告されている TsF₂ タイプの抑制因子に相同するものと言える³⁴⁽¹⁶⁾。抗原 (KLH) では刺激されず抗 KLH 抗体あるいは抗原特異的 TsF₁ で刺激されることは、この 34S-281 が抗原結合能を有する 34S-18 と相補的なレセプター構造をもつことを示している。これらの Ts は抑制サーキットの初期相において重要な役割を果たす。すなわち、Id 陽性 Ts は抗原刺激によって活性化され、さらに抗原を介して抑制活性を発現する最終ステップのエフェクター-Ts を誘導し免疫系を調節する。一方、免疫調節の初期相における別の抑制系活性化経路として、Id 陽性 Ts と相補的な抗-Id 陽性 Ts を中心とする経路があり、抗原の存在を必要としないイデオタイプ-抗イデオタイプ反応により、抗原特異的抑制活性を増幅してエフェクター-Ts に伝達しうるものと考えられる。

Ts の活性化現象については Pierce らにより GAT-TsF の系でも報告されている¹⁷⁾。細胞活性化の詳細なメカニズムは未だ解明されていないが、抑制因子の産生には新たな RNA および蛋白の合成が必要であると思われる。なぜなら、細胞が活性化され TsF₂ が分泌されるまでに要する時間は、KLH-Ts 系ではおよそ 8 時間⁸⁾、GAT-Ts 系ではおよそ 16 時間であり¹⁶⁾、抑制因子がハイブリドーマ自身の変性や抑制因子を含む vesicle から

の脱顆粒によって放出された可能性は否定しうると考えられるからである。

抑制因子が蛋白質であることは、ラビット網状赤血球あるいはアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた mRNA 翻訳産物で抗-DNP IgG 抗体産生が抑制されたことから明らかである (表 3)。しかも、活性化された Ts 由来の mRNA 翻訳産物でのみ抑制がみられ、非活性化 Ts 由来の mRNA 翻訳産物では抑制は全く認められなかった。GAT-TsF₁ においてもラビット網状赤血球ライセートを用いた mRNA 翻訳産物が抑制活性を示したことが報告されている¹⁸⁾。このように、KLH-Ts および GAT-Ts どちらの系においても、TsF の抑制活性は、糖鎖構造の修飾を受けずとも発現しうる。また、GAT-TsF₂ の系では tunicamycin を用いてアスパラギンに結合する糖鎖構造を阻害しても、抑制活性は維持されていた¹⁷⁾。翻訳後の糖鎖修飾をはじめとするプロセッシングは TsF の安定化に寄与している可能性は否定し得ないが、以上の結果は抑制活性発現にプロセッシングの過程が基本的には必要でないことを示唆する。

TsF₂ の生化学的特性をクロマトグラフィーで解析したが、ゲル濾過法では分子量は 22~37Kd であり (図 1C)、クロマトフォカシングによる等電点は pH 6.0~6.1 であった (図 1B)。また、逆相クロマトグラフィーから抽出した抑制活性を有する分画を SDS-PAGE でさらに精製し、ゲル切片から抽出した物質における抑制活性を解析して得た分子量も 25~34Kd の範囲であった (図 4)。その分子量は還元下条件でも非還元下条件でも変化はなく、抑制活性の発現に共有結合を必ずしも必要としないことが示唆された。TsF₂ が SDS によって変性を受ける可能性は否定し得ないが、他の抗原特異的 TsF で SDS 処理に抵抗性を示すことが報告されており¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾、SDS による変性を受けたとしても部分的であり生物学的活性が維持されたと考えられた。

さらに図 5 に示したように、網状赤血球で合成した蛋白質を SDS-PAGE にかける同様に抑制活性を有する分画を調べた結果においても、その分子量は 23~40Kd で、還元下、非還元下条件で変化はなく、ゲル濾過法によって得られた結果とはほぼ一致する結果であった。以上から、この抑制因子が抑制活性を示す際には他の分子との共有結合を必要とせず、しかもこの因子は一本鎖で構成されると推測した。一本鎖からなる他の抑制因子については、Wieder らが GAT-Ts 系において報告している¹⁸⁾。それによると GAT-TsF₁ は 16S mRNA から翻訳され、無細胞蛋白合成系で作成した蛋白を SDS-PAGE で分離した場合、19Kd の分画に抑制活性があることが示されている。

活性化 34S-281 ハイブリドーマの無血清培養液 4600ml をクロマトグラフィーを用いることにより、抑制因子の活性を 1.5×10^4 倍にまで濃縮し得たが (表 2)、オートラジオグラム上にバンドとして捕らえることが出来なかった。krupen らおよび Turck らは GAT を用いた系で同様に抑制因子の濃縮を試み、6 リットルの培養上清から 2 μ g の TsF₁ を、また 50 リットルの培養上清から 10 μ g の TsF₂ の精製に成功したと報告している²⁰⁾⁽²¹⁾。我々の実験系から TsF₂ 濃度を評価することは困難であったが、オートラジオグラム上に表現され、分子構造の解析を行うには精製に入る前により多量の培養上清が必要であると考えられる。

一方、ラビット網状赤血球を用いて、活性化および非活性化抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマの mRNA より蛋白を合成し、その抑制活性および 2-DE での両者のスポットの展開を比較し

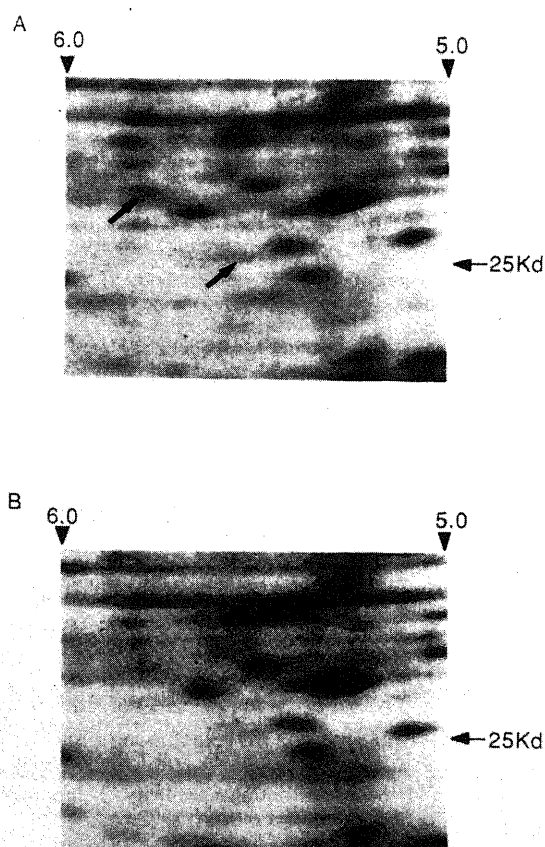


Fig. 6. Autoradiograms of 2-DE on *in vitro* translation products from activated [A] and unactivated [B] Ts mRNA. The arrows indicate the new spots appearing after activation. See Materials and Methods. Molecular weights and pH points were determined by standard markers.

た。その結果、活性化抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマ由来の翻訳産物のみが抑制活性を有しており (表 3), 分子量 28Kd, pH 5.7 と分子量 25Kd, pH 5.5 の 2 個のスポットがハイブリドーマの活性化に伴って出現したことが判明した。これらのスポットは SDS-PAGE および IEF で分画したゲルから電気的に抽出し抑制活性を検討した実験 (図 5) で示された分子量 23~40Kd, 等電点 5.5~6.2 の範囲に存在している。従って、これらのどちらかのスポットが抗-Id 陽性 Ts から分泌される TsF₂ である可能性が高いと思われる。

Imai らはこの抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマの T 細胞抗原レセプター遺伝子の解析を行い, Ts レセプターに α 鎖遺伝子が使用されているが, β 鎖および γ 鎖遺伝子は使用されていないことを報告した²⁰⁾。Adorini らは抗原特異的抑制因子を分泌する Ts のレセプターが α 鎖と β 鎖とのヘテロダイマーから構成され, 抗原レセプターに相同な mRNA を用いて合成した蛋白が抗原特異的 TsF の産生を誘導したと報告している²¹⁾。現在のところ KLH 特異的抗-Id 陽性 Ts ハイブリドーマの抗原レセプターの分子構造は完全には解明し得ておらず, また, レセプター相同 mRNA 産物が機能活性を有するかどうか確認されていない。今後抑制因子のアミノ酸配列の決定および抗原レセプター構造の解析, さらに T 細胞レベルでのイデオタイプ・ネットワークの解析など, 免疫系の高次機能の解明が必要であると思われる。

結 論

抗-Id 陽性 Ts (34S-281) は, Id 陽性 Ts (34S-18) と相補的レセプター構造を有し, とともに抗原 (KLH) 特異的, かつ遺伝的拘束性 (H-2^b) を有する免疫反応の抑制活性発現に関与している。さらに抗-Id 陽性 Ts は活性化の後, 抑制 T 細胞因子 (TsF₂) を分泌することにより, この抑制活性が発揮される。この TsF₂ の生化学的特性および分子学的解析を試み, 以下の結論を得た。

1. 無血清下に培養した 34S-281 の培養上清にも KLH 特異的で遺伝的拘束性を示す抑制活性が存在することが確認された。その培養上清より TsF₂ の精製を種々のクロマトグラフィーで行い, 抑制活性を 1.5×10^4 倍まで濃縮し得たが, 回収率は 10% にとどまった。

2. TsF₂ のゲル濾過法による分子量は 22-37Kd であり, クロマトフォカシングで求めた等電点は pH 6.0-6.1 の範囲であった。また, SDS-PAGE から電気的に抽出した物質の抑制活性も還元下, 非還元下共に分子量 25-34Kd の範囲に認められた。

3. 無細胞蛋白合成系を用いた系では, 活性化 34S-281 由来の mRNA 産物のみが, 培養上清と同様の抗原特異的かつ遺伝的拘束性を有する抑制活性を示し, 非活性化 34S-281 由来の mRNA 産物では抑制活性は全く認められなかった。SDS-PAGE からの解析でその分子量は 23-40Kd であり, IEF から求めた等電点は pH 5.5-6.2 であった。さらに, 2-DE にかけたオートラジオグラム上での比較では, 非活性化 34S-281 由来 mRNA 産物では認められない新たな 2 つのスポットの出現を活性化 34S-281 由来 mRNA 産物に認め, その分子量および等電点は 28Kd, pH 5.7 および 25Kd, pH 5.5 であった。

以上の結果から, 2 つのスポットのいずれかが TsF₂ である可能性が示唆され, また, TsF₂ が共有結合を有さない蛋白質として抗体産生における抗原特異的でありかつ遺伝的拘束性を

有する抑制活性の増幅に関与すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました小林健一教授に心より感謝の意を表します。また, 本研究に対し直接御指導, 御校閲を賜りました千葉大学医学部附属高次機能制御センター免疫機能分野, 谷口克教授に深く感謝の意を表します。さらに, 御指導, 御助言頂きました千葉大学医学部附属高次機能制御センター免疫機能分野, 住田孝之先生, 田川雅俊先生ならびに同研究室の各位, 金沢大学医学部第 1 内科, 鶴浦雅志講師に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kapp, J. A., Pierce, C. W., Schlossman, S. & Benacerraf, B.: Genetic control of immune responses in vitro. V. Stimulation of suppressor T cells in nonresponder mice by the terpolymer L-glutamic acid⁶⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰ (GAT). *J. Exp. Med.*, **140**, 648-659 (1974).
- 2) Debre, P., Kapp, J. A. & Benacerraf, B.: Genetic control of specific immune suppression. 1. Experimental conditions for the stimulation of suppressor cells by the copolymer L-glutamic acid⁶⁰-L-tyrosine⁵⁰ (GT) in nonresponder BALB/c mice. *J. Exp. Med.*, **142**, 1436-1446 (1975).
- 3) Tada, T. & Okumura, K.: The role of antigen-specific T cell factors in the immune response. *Adv. Immunol.*, **28**, 1-80 (1983).
- 4) Dorf, M. E. & Benacerraf, B.: Suppressor cells and immunoregulation. *Annu. Rev. Immunol.*, **2**, 127-158 (1984).
- 5) Taniguchi, M., Saito, T. & Tada, T.: Antigen-specific suppressive factor produced by a transplantable I-J bearing T-cell hybridoma. *Nature*, **278**, 555-556 (1979).
- 6) Sumida, T. & Taniguchi, M.: Novel mechanisms of specific suppression of anti-hapten antibody response mediated by monoclonal anti-carrier antibody. *J. Immunol.*, **134**, 3675-3681 (1985).
- 7) Saito, T. & Taniguchi, M.: Chemical features of an antigen-specific suppressor T cell factor composed of two polypeptide chains. *J. Mol. Cell. Immunol.*, **1**, 137-145 (1984).
- 8) Takei, I., Sumida, T. & Taniguchi, M.: Acceptor-suppressor T cell hybridoma with a receptor recognizing antigen-specific suppressor factor. *J. Exp. Med.*, **158**, 1912-1923 (1983).
- 9) Taniguchi, M., Takei, I. & Tada, T.: Functional and molecular organization of an antigen-specific suppressor factor from a T-cell hybridoma. *Nature*, **283**, 227-228 (1980).
- 10) Sumida, T., Takei, I. & Taniguchi, M.: Activation of acceptor-suppressor hybridoma with antigen-specific suppressor T cell factor of two-chain type: Requirement of the antigen- and the I-J-restricting specificity. *J. Immunol.*, **133**, 1131-1136 (1984).
- 11) Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299 (1979).
- 12) Pelham, H. R. B. & Jackson, R. J.: An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte

- lysates. *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247-256 (1976).
- 13) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
 - 14) O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975).
 - 15) O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M. & O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, **12**, 1133-1142 (1977).
 - 16) Webb, D. R., Kapp, J. A. & Pierce, C. W.: The biochemistry of antigen-specific T-cell factors. *Annu. Rev. Immunol.*, **1**, 423-438 (1983).
 - 17) Sorensen, C. M. & Pierce, C. W.: Identification and characterization of a suppressor T cell hybridoma specifically inducible by L-glutamic acid⁸⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰ (GAT). *J. Immunol.*, **137**, 1455-1461 (1986).
 - 18) Wieder, K. J., Araneo, B. A., Kapp, J. A. & Webb, D. R.: Cell-free translation of a biologically active, antigen-specific suppressor T cell factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3599-3603 (1982).
 - 19) Ferguson, T. A. & Iverson, G. M.: Isolation and characterization of an antigen-specific suppressor inducer molecule from serum of hyperimmune mice by using a monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **136**, 2896-2903 (1986).
 - 20) Krupen, K., Araneo, B. A., Brink, L., Kapp, J. A., Stein, S., Wieder, K. J. & Webb, D. R.: Purification and characterization of a monoclonal T-cell suppressor factor specific for poly (LGlu⁸⁰ LAla³⁰ LTyr³⁰). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 1254-1258 (1982).
 - 21) Turck, C. W., Kapp, J. A. & Webb, D. R.: Purification and partial characterization of a monoclonal "second order" suppressor factor specific for L-glutamic acid⁸⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰. *J. Immunol.*, **135**, 3232-3236 (1985).
 - 22) Imai, K., Kanno, M., Kimoto, H., Shigemoto, K., Yamamoto, S. & Taniguchi, M.: Sequence and expression of transcripts of the T-cell antigen receptor α -chain gene in a functional, antigen-specific suppressor-T-cell hybridoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 8708-8712 (1986).
 - 23) De Santis, Palmieri, R. G., Doria, G. & Adorini, L.: T cell receptor-homologous mRNA from a suppressor T cell clone directs the synthesis of antigen-specific suppressive products. *Eur. J. Immunol.*, **17**, 575-578 (1987).

Biochemical Characterization of an Antigen-Specific Suppressor T Cell Factor Produced by Anti-Idiotypic T Cell Hybridoma Eiki Matsushita, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. J. Med. Soc.*, **101**, 1—9 (1992)

Key words anti-idiotypic suppressor T cell hybridoma, suppressor factor, KLH-specific, biochemical analysis

Abstract

We describe here the biochemical properties of suppressor T cell factor (TsF₂) released from an inducible anti-idiotypic T cell hybridoma (C57BL/6 T cell × BW5147), which mediates antigen (keyhole limpet hemocyanin) specific and genetically (H-2^b) restricted suppression of IgG plaque-forming cell responses. This secreted factor was purified by several chromatographical steps using anion exchange, chromatofocusing, gel filtration and reversed phase columns. We examined the suppressive activity by *in vitro* functional assay in each fraction of chromatography and in the materials eluted from gels of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide and isoelectric focusing. Through these purification steps, we determined the molecular weight (s) (22-37-Kd) and the pI point (s) (6.0-6.1) of this factor and obtained 1.5 × 10⁴ times enrichment. Messenger RNA products of the hybridoma translated in the rabbit reticulocyte lysate system were similarly examined, and the functionally active molecule was seen to migrate to almost the same molecular weight (s) and pI point (s) range as those of secreted TsF. Based on the above data, we speculate that this molecule is composed of a single chain, and is biologically active. Comparison of autoradiograms on *in vitro* translation products between activated and resting hybridomas by two-dimensional gel electrophoresis, showed that the molecular weights and pI points of two spots newly appearing after activation, were concordant with the data on secreted TsF, suggesting that one of these two spots represents the functional molecule which causes antigen specific and genetically restricted suppression of IgG responses.