

Immunological Studies on Myasthenia Gravis Using Synthetic Peptides of Acetylcholine Receptor

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/2297/8049

アセチルコリン受容体合成ペプチドを用いた 重症筋無力症の免疫学的研究

金沢大学医学部附属病院神経内科 (主任: 高守正治教授)

永 田 美 和 子

(昭和63年5月30日受付)

重症筋無力症抗原決定基を明らかにするため、ヒトのアセチルコリン受容体 (AChR) α サブユニットアミノ酸残基配列 1-24, 40-60, 51-71, 70-90, 125-147, 183-200 を合成し、20 例の重症筋無力症 (MG) 患者血清中に合成ペプチドを抗原とする抗体の有無をみたが、陽性となるものはなかった。自己の AChR アミノ酸残基配列に対する B 細胞レベルでの免疫寛容の関与を考え、ヒトとは異種のシビレエイ α 183-200 ペプチドを抗原として検定したところ、20 例の MG 患者血清中 3 例に抗体価陽性を見た。さらにシビレエイ α 183-200 には、抗ラット AChR-blocking 抗体上昇や、微小終板電位 (MEPP) 振幅低下で示唆される実験的自己免疫性重症筋無力症 (EAMG) を発症させる免疫原性が認められた。またシビレエイ α 183-200 免疫ラットの抗ペプチド抗体は、培養細胞において AChR 崩壊促進作用を示さなかった。これらの結果と、トキシン・受容体結合阻害活性 85~97% で表わされるシビレエイ α 183-200 のトキシン結合能の存在より、 α 183-200 は ACh 結合能を有する領域であり、main immunogenic region (MIR) ではないことを示している。

Key words myasthenia gravis, acetylcholine receptor, synthetic peptide, α -bungarotoxin binding site, antibody

神経筋シナプス後膜のアセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) に対する抗体によってひきおこされる自己免疫疾患とされている重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) の研究は、AChR がコードされた遺伝子座や¹⁾、各サブユニットのアミノ酸配列²⁾が明らかにされて新しい展開を見せている。AChR は 4 種のサブユニットから成り³⁾、各サブユニットの 1 次構造と、膜外・貫通・膜内部配列の推定が行なわれた⁴⁾⁻⁹⁾。一方 MG 患者の AChR 抗体は多様であり¹⁰⁾¹¹⁾、その抗体が AChR のどの領域を抗原としているかは MG の病態解明の上で大切である。特に MG 抗体の 50% 以上が標的としている AChR α サブユニットのなかの main immunogenic region (MIR)¹²⁾⁻¹⁵⁾、とアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 結合部¹⁶⁾¹⁷⁾がどの領域に相当するかが重要であ

る。最近では MIR は、Barkas らによると AChR α サブユニット残基番号 6 から 85 の領域内に¹⁸⁾、Lindstrom らは α 46 から 127 に¹⁹⁾、アセチルコリン結合部は、ジスルフィド結合²⁰⁾を形成する α 192 と 193²¹⁾の近傍にあるとされている。

本研究では、これらの領域に注目し、まずヒト AChR のアミノ酸配列に従い α 1 から α 200 の間の 6 領域のペプチドを合成し、MG 患者血清中にこれらを抗原決定基とする抗体の有無を見たが、いずれも有意な抗体上昇を見なかった。そこで免疫寛容の関与²²⁾を考えて、ヒトにとっては異種のシビレエイ (Torpedo californica) のアミノ酸配列をとりあげ、また抗原性をもつ立体構造¹⁹⁾とアセチルコリン結合領域²³⁾の可能性の観点からシビレエイ α 183-200 を合成して検討し、患者抗体検定、動物モデル作製上の抗

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AChR, acetylcholine receptor; α -BuTx, α -bungarotoxin; BSA, bovine serum albumin; EAMG, experimental autoimmune myasthenia gravis; IgG, immunoglobulin G; MEPP, miniature endplate potential; MG, myasthenia gravis; MIR, main immunogenic region.

原性, 免疫原性につき有意の結果を得たので以下に報告する。

材料および方法

I. ペプチド合成

ペプチド合成はヒト⁵⁾とシビレエイ²⁾AChR α サブユニットペプチドマップに照合して, ヒト α 1-24, ヒト α 40-60, ヒト α 51-71, ヒト α 70-90, ヒト α 125-147, ヒト α 183-200, シビレエイ α 183-200 (図1)を固相法で行ない逆相高速液体クロマトグラフィーにて精製²⁴⁾, 日本電子製HX-100によるfield desorption (イオン化方法) マススペクトルで確認した。尚, 各ペプチドは可溶性を得るためN端にLys-LysまたはLys-Lys-Gly, C端にGlyまたはLys-Lys-Glyを連結した。

II. 免疫ラット作製

ペプチドの免疫には8~10週齢雌ルイス系ラット10匹(シビレエイ α 183-200免疫用に7匹, 対照用に3匹)を用いた。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した合成ペプチド (各75 μ g) を完全アジュバントとともに, ジエチルエーテル麻醉下に足底部に皮下注 (全量0.3 ml) し, 2週後と4週後に等量を追加免疫した。対照ラットには等量のアジュバントを注射した。初回のみ百日咳死菌ワクチン 0.5×10^{10} 個 (0.25 ml) を背部に4ヶ所に分けて皮下注した。2週ごと採

血し, 初回免疫後8週目に屠殺, 抗体検定, 電気生理学的解析に供した。

III. ラット, ヒト, シビレエイ由来 AChR の抽出²⁵⁾

雄ウイスター系ラットの両足大腿部で坐骨神経を切除後10~14日目に下肢筋を取り出し細切した。これに4倍量の緩衝液A (NaCl, 0.1 M; phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1 mM; NaN₃, 0.02%; trasylol 250 u/mlを含む0.05 M Tris-HCl, pH 7.4) を加えてホモゲナイズし, 10,000 rpm で30分間遠心した。沈さを緩衝液Aで2倍に希釈してTriton X-100で最終濃度1%になるように加え, 4°Cで1晩攪拌し, 10,000 rpm で30分間遠心して得られた上清をAChR分画とした。ヒトAChRは剖検時に得た骨格筋を, シビレエイAChRは日本近海産シビレエイ (Narke japonica) から採取した電気器官を材料とし, ラットの場合と同様に抽出した。

IV. 2抗体免疫沈殿法

1. 抗ペプチド抗体価

合成ペプチドにクロラミンT法²⁶⁾で以下のように¹²⁵Iを標識した。まず0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かした合成ペプチド (0.5 mg/ml) 10 μ l とNa¹²⁵I (1 mci) 10 μ l (Amersham Products Inc., Cardiff) にクロラミンT溶液 (5 mg/ml, 0.05 M リン酸緩衝液) 10 μ l を加えた。22°Cで1分間攪拌した後, ピロ亜硫酸ナトリウム溶液 (0.6 mg/ml, 0.05 M リン

Torpedo α 183-200		
183		200
H-Lys-Lys-Gly-Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr-Tyr-Thr-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Pro-Tyr-Leu-Asp-Lys-Lys-Gly-OH		
Humana183-200		
183		200
H-Lys-Lys-Gly-Trp-Lys-His-Ser-Val-Thr-Tyr-Ser-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Pro-Tyr-Leu-Asp-Gly-OH		
Humana125-147		
125		147
H-Lys-Lys-Gly-Lys-Ser-Tyr-Cys-Glu-Ile-Ile-Val-Thr-His-Phe-Pro-Phe-Asp-Glu-Gln-Asn-Cys-Ser-Met-Lys-Leu-Gly-OH		
Humana70-90		
70		90
H-Lys-Lys-Asp-Tyr-Gly-Gly-Val-Lys-Lys-Ile-His-Ile-Pro-Ser-Glu-Lys-Ile-Trp-Arg-Pro-Asp-Leu-Gly-OH		
Humana51-71		
51		71
H-Lys-Lys-Thr-Thr-Asn-Val-Arg-Leu-Lys-Gln-Gln-Trp-Val-Asp-Tyr-Asn-Leu-Lys-Trp-Asn-Pro-Asp-Asp-Gly-OH		
Humana40-60		
40		60
H-Lys-Lys-Leu-Ile-Asn-Val-Asp-Glu-Val-Asn-Gln-Ile-Val-Thr-Thr-Asn-Val-Arg-Leu-Lys-Gln-Gln-Trp-Lys-Lys-Gly-OH		
Humana1-24		
1		24
H-Ser-Glu-His-Glu-Thr-Arg-Leu-Val-Ala-Lys-Leu-Phe-Lys-Asp-Tyr-Ser-Ser-Val-Val-Arg-Pro-Val-Glu-Asp-Gly-OH		

Fig. 1. Amino acid sequences of synthetic peptides used as antigens. To promote the solubility, peptides were attached additional sequences Lys-Lys or Lys-Lys-Gly at N-terminal and Gly or Lys-Lys-Gly at C-terminal, respectively.

酸緩衝液, pH 7.0) 200 μ l を加え反応を止め, さらに 1% ヨウ化カリウム溶液 200 μ l と 1% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 加 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 500 μ l を加えた. 反応液全体を Sephadex G-15 (0.9 \times 25 cm) カラムにのせ, 1% BSA 加 0.05 M リン酸緩衝液でゲルろ過し, 放射能のピークをとり 4°C で保存した.

血清 1 検体につき試験管 5 本用意し, 緩衝液 B (0.2% Triton X-100 を含む緩衝液 A) で 100 倍希釈した被検血清 500 μ l を 5 本に分注した. うち 3 本には 50 倍希釈した 125 I-合成ペプチド 50 μ l を各々加え, 残り 2 本にはブランクとして抗ヒト免疫グロブリン G (immunoglobulin G, IgG) 抗体 (Hoechst, Marburg) 又は抗ラット IgG 抗体 (Cappel Laboratories, Pennsylvania) 25 μ l を各々加え, 4°C で一晩置いた後, 測定用には同上の抗体 25 μ l, ブランクには 125 I-合成ペプチド 50 μ l を加えた. さらに一晩置いた後 3,000 rpm, 20 分間遠心し, 上清を捨て, 沈さは緩衝液 B 2 ml で 2 回洗浄後, 125 I-合成ペプチド-ヒト又はラット IgG-抗ヒト又は抗ラット IgG 抗体の放射活性を測定した. 抗ペプチド抗体価は 3 本の被検血清の放射活性の平均値から 2 本のブランクの放射活性の平均

値を差し引いて算出した. 負の値が出た場合には, 非特異的結合によるものとして 0 cpm とした.

2. 抗ラットおよびヒト AChR 抗体価

125 I- α -ブングアロトキシシン (α -bungarotoxin, α -BuTx) (Amersham Products Inc., Cardiff) で標識した AChR 200 μ l に 100 倍希釈した被検血清 50 μ l を加え, 一晩 4°C に放置. これに抗ヒト IgG 抗体又は抗ラット IgG 抗体を加え, さらに一晩置いた後, 3,500 rpm で 10 分間遠心して沈さの放射活性を測定した. これを同じ放射活性をしめす 125 I- α -BuTx 1 ml あたりの pmol 数で表わした (pmol/ml).

V. トキシシン・受容体結合阻害活性測定法 (コンカナバリン A 法)

1 pmol/ml に調整した AChR 250 μ l に, 抗ヒト又は抗ラット AChR blocking 抗体価測定時には被検血清 50 μ l を加え, トキシシン・受容体結合に対する合成ペプチド阻害能を見る場合には合成ペプチド (50 μ g 又は 250 μ g を含有した緩衝液 B) 50 μ l を加え, 一晩 4°C 下で反応させた. これに 125 I- α -BuTx 0.3 pmol を加え 4°C 下に放置した後, コンカナバリン A-セファローズカラム (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) を通してコンカナバリン A に AChR を吸着

Table 1. Anti-human AChR antibody assays in patients with myasthenia gravis

No. of patients	Clinical severity*	Binding antibody (pmol/ml)	Blocking antibody (%)
control		< 0.3	< 10
1	IIb	3.5	20
2	IIa	4.3	26
3	IIb	1.0	22
4	IIb	8.6	16
5	IIa	9.4	26
6	IIb	5.6	22
7	IIb	11.0	30
8	IIb	23.1	30
9	IIa	22.6	22
10	IIb	0.7	17
11	IIa	2.2	12
12	IIb	1.9	25
13	IIa	0.6	11
14	IIb	13.0	33
15	III	12.8	29
16	IIb	66.1	27
17	IIb	0.8	11
18	IIa	10.0	18
19	IIa	6.5	27
20	IIa	0.6	19

* Osserman and Genkins classification³⁰⁾

させてカラムの放射活性 (RA_{MG}) を測定し、正常血清又は緩衝液 B 添加時の測定値 (RA_{control}) を測定し、後者に対する減少率

$$\left(\frac{RA_{control} - RA_{MG}}{RA_{control}} \times 100 \right)$$

から阻害活性 (blocking activity) を求めた。

VI. 電気生理学的検査

シブレエイ α 183-200 で免疫したラットから 8 週目に横隔膜神経筋標本を切り出し微小電極により立ち上がり時間 0.6 msec 以内の自発性微小終板電位 (miniature endplate potential, MEPP) の振幅を測定し、平衡電位 -15 mV, 標準静止膜電位 -75 mV として補正した¹⁶⁾。1 匹につき筋線維 20 本で測定した。対照ラットも同様に筋線維 20 本について測定した。

VII. AChR 崩壊半減期

胎生 18~20 日目のウイスター系ラット胎児の下肢筋を取り出し細切、0.3% トリプシン処理により単細胞浮遊液を作った。これをプラスチックペトリ皿に分注し 24~48 時間培養した後、再びトリプシン (0.03%)

処理により単細胞浮遊液とした。筋芽細胞と線維芽細胞の底面付着速度の差を利用して線維芽細胞を選択的に除去するために、プラスチックペトリ皿中にて 15~30 分間培養し、筋芽細胞に富んだ上清を採取した。これをプラスチックペトリ皿に分注し、発育増殖させ 7 日目に ¹²⁵I-α-BuTx で標識した。標識された AChR は細胞内へ取り込まれ代謝を受けた後、¹²⁵I-チロジンとして細胞外へ放出されるので、培養液の放射活性を経時的に測定することで AChR 崩壊速度を間接的に測定できる^{27)~29)}。¹²⁵I で 2 時間標識した後、上清を捨て 3 回洗浄、これに非働化 (56°C 30 分間) したラット血清を 15% 含む培養液を加え、さらに 2 時間培養した。培養はすべて 37°C, 5% CO₂, 95% air 下にて行なった。各区間時間に採取した培養液のそれぞれについて放射活性 (RA_{med-1, 1=1, 2, ..., k, ..., n}) を測定し、最後のペトリ皿に付着している細胞を集めて放射活性 (RA_{cell}) を測定した。ある区間時間に崩壊した AChR の全培養骨格筋 AChR 量に対する割合 (FD-Ik) およびある区間終了時における AChR 残存率

Table 2. Anti-peptide antibody assays in patients with myasthenia gravis

No. of patients	Antipeptide antibody titers (cpm)						
	Human						Torpedo
	α1-24	α40-60	α51-71	α70-90	α125-147	α183-200	α183-200
control	126 ± 89 ^a (n:5)	52 ± 69 ^a (n:8)	91 ± 112 ^a (n:6)	142 ± 90 ^a (n:4)	95 ± 7 ^a (n:5)	111 ± 12 ^a (n:5)	151 ± 73 ^a (n:4)
1	140	16	0	76	96	89	412 *
2	290	34	0	93	90	90	387
3	70	11	0	0	88	114	292
4	140	86	0	0	99	29	432 *
5	10	0	0	0	77	103	191
6	60	0	0	67	51	74	40
7	0	0	0	0	94	18	364
8	0	91	0	0	80	70	358
9	50	0	0	0	80	70	0
10	40	126	0	0	72	56	311
11	120	28	220	0	60	75	477 *
12	40	156	0	0	92	91	191
13	0	132	0	24	90	106	197
14	0	0	0	0	100	20	310
15	0	0	0	0	97	20	291
16	0	0	0	213	87	73	72
17	0	0	0	0	65	36	171
18	150	119	152	0	66	98	212
19	10	69	116	0	70	81	126
20	120	0	199	111	79	60	0

^a, mean ± SD; *, p < 0.05 vs. control by Thompson's rejection limit. (Numbers of patients correspond to those in Table 1.)

(FR-Ik) は次の式より算出した。

$$FD-Ik(\%) = \frac{RA_{med-k}}{\sum_{i=1}^n RA_{med-i} + RA_{cell}} \times 100$$

$$FR-Ik(\%) = 100 - \sum_{i=1}^k (FD-Ii)$$

Ⅷ. MG 患者血清

血清を本研究に供した MG 患者は、臨床的重症度分類 (Osserman & Genkins 分類³⁰⁾) で II a 8 例, II b 11 例, III 1 例, 計 20 例からなり (表 1), 抗ヒト AChR binding 抗体価および blocking 抗価 (表 1), エドロホニウムテスト, 誘発筋電図でその診断が確認されたものである。治療中の場合の検体採取は, 投薬 (抗コリンエステラーゼ剤または副腎皮質ステロイド) 中止 48 時間後に行なった。

Ⅸ. 統計学的処理

得られたデータは平均値±標準偏差 (Mean±SD) で表わした。2 変量間の相関性の分析には Pearson の相関係数を求め, 多群間の平均値の差の検定には分散分析後 Dunnett 法を用いた。又, 異常値の検出には, Thompson の棄却検定法を用いた。以上すべて 5% 未満の危険率をもって有意とした。

成 績

Ⅰ. MG 患者血清中の抗ペプチド抗体価

表 1 に示した全身型 MG (軽症 II a, 中等症 II b) 又は, 急性激症型 MG (III) 患者 20 例について, まずヒト α 1-24, ヒト α 40-60, ヒト α 51-71, ヒト α 70-90, ヒト α 125-147, ヒト α 183-200 に対する抗ペプチド抗体価を測定した結果を表 2 に示す。いずれも有意な抗体価上昇を見なかった。次にヒトにとっては異種のシビレエイ α 183-200 について同様に抗体価検定をしたところ表 2 のように 20 例中 3 例に抗

抗体価上昇を認めた。この 3 例のうち最も抗ペプチド抗体価の高かったのは臨床重症度 II a の軽症全身型であり, 重症度 III の急性激症型例は有意な抗ペプチド抗体価上昇を見なかった。 α 183-200 は ACh 結合領域の可能性があるので, 表 1 の抗ヒト AChR blocking 抗体価と, 表 2 のシビレエイ α 183-200 に対する抗

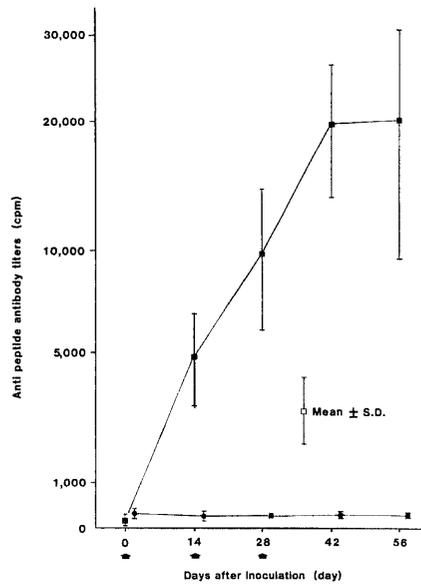


Fig. 2. Change of anti-peptide antibody titers, aligned with respect to postinoculation days. Female Lewis rats were injected intradermally with 75 μ g of Torpedo α 183-200 which was emulsified with complete Freund's adjuvant in a 0.3 ml volume on day 0, 14 and 28 (\blacktriangle), and sacrificed 56 days after initial inoculation. (\blacksquare), rats injected with Torpedo α 183-200; (\bullet), control rats injected with adjuvant alone.

Table 3. Antibody titers and microelectrode amplitude of the rats immunized with synthetic peptides

Rats No.	Anti-Torpedo α 183-200 antibody titers (cpm)	Anti-rat AChR antibody		MEPP amplitude (mV)
		Binding antibody (pmol/ml)	Blocking antibody (%)	
control	242	< 0.8	< 10	0.68 \pm 0.148 (n:20) ^a
1	25,602	0.1	23	0.40 \pm 0.134 (n:20) [*]
2	16,818	0.1	0	0.62 \pm 0.187 (n:20)
3	15,414	0.2	2	0.61 \pm 0.186 (n:20)
4	20,642	0.1	17	0.40 \pm 0.173 (n:20) [*]
5	10,252	0.1	13	0.47 \pm 0.207 (n:20) [*]
6	28,406	0.3	26	0.39 \pm 0.121 (n:20) [*]
7	23,816	0.2	7	0.60 \pm 0.200 (n:20)

^a, mean \pm SD; ^{*}, $p < 0.05$ by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison with control.

ペプチド抗体価との相関を見たところ、 $r = -0.019$ で正の相関はなかった。

II. シビレエイ α 183-200 免疫ラットの検討

1. 抗ペプチド抗体価の経時的変化

シビレエイ α 183-200 を 2 週おきに 3 回免疫したラットでのシビレエイ α 183-200 に対する抗ペプチド抗体価を図 2 に示す。抗体価は、6 週目までは経時的に上昇、以後 plateau または一部に低下傾向を示した。各ラットの 8 週目屠殺時の抗ペプチド抗体価は表 3 に示す。

2. 抗ラット AChR 抗体価

シビレエイ α 183-200 免疫ラットでは表 3 で示すように 7 匹中 4 匹に blocking 抗体陽性であり、binding 抗体はすべて陰性であった。

3. 電気生理学的検査

シビレエイ α 183-200 免疫 8 週目屠殺時の各ラットの MEPP 振幅を測定した結果を表 3 に示す。臨床像に明らかな変化はなかったものの、MEPP 振幅低下で示唆される実験的自己免疫性重症筋無力症 (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) の発症を認めたものが、免疫ラット 7 匹中 4 匹あり、これらはすべて抗ラット AChR blocking 抗体陽性例であった。

4. AChR 崩壊半減期

抗 AChR 抗体価と MEPP 振幅低下の評価で EAMG の発症と考えられるシビレエイ α 183-200 免疫ラット 4 匹のプール血清と対照ラット 3 匹のプール血清を培養液に添加後、培養骨格筋細胞内の AChR 残存率の変化を図 3 に示す。培養 30 時間後においても、免疫ラット血清の方が対照より残存率が少ないということはなかった。

III. トキシン・受容体結合阻害活性からみた合成ペプチド・トキシン結合能

抗 AChR blocking 抗体価測定時の被験血清のかわりにシビレエイ α 183-200 を 50 μ g ないし 250 μ g, コンカナバリン A-セファローズカラムに添加した結

果を表 4 に示す。シビレエイ α 183-200, 50 μ g は 85~89% の阻止率でトキシンと受容体の結合を阻んだ。合成ペプチド量を 50 μ g から 250 μ g に増加すると阻止率は高くなったが (97%), AChR の種類をヒト又はシビレエイに変えても、阻止率に差を認めなかった。

考 察

MG 患者血中にある AChR に対する抗体¹⁰⁾¹¹⁾の抗原決定基がどの領域であるかは、なお議論の多いところである。AChR α サブユニットの一部に属し、ACh 結合能はないものの 50% 以上の抗体が認識する MIR^{12)~15)} に関して、Noda ら²⁰⁾が初めて親水性の観点から提唱した α 161-169 や、McCormick ら³¹⁾の提唱による α 159-169 は、現在ではその領域は膜貫通部

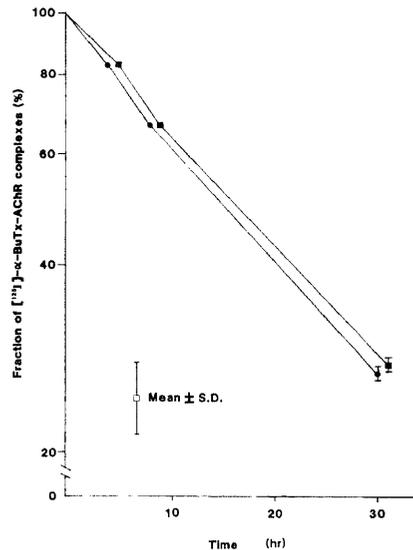


Fig. 3. AChR degradation in vitro. (●), sera from 4 control rats; (■), pooled sera from 4 rats immunized with Torpedo α 183-200. Details were described in "Materials and Methods".

Table 4. Toxin-binding capacity of synthetic peptides, as expressed by % inhibition of toxin-binding to acetylcholine receptor

Source of AChR	Synthetic peptide	% inhibition of toxin-binding	
		Torpedo α 183-200	
		50 μ g	250 μ g
Torpedo		89	97
Human		85	95

にあるとされ否定的である⁴¹⁾³²⁾。 α 128, 142 間のジスルフィド結合を含む α 125-147 は, Lennon らによって, その抗体には本病の主因の 1 つとされる AChR 崩壊促進作用があることから重要な病原性領域の一つであることが示唆された³³⁾。しかし, native AChR の MIR に対するモノクローナル抗体はこの α 125-147 と反応しない³⁴⁾ので, この領域はここで論じている MIR ではないようである。又この領域のすべては膜表面に露呈していないとの反論もあり³⁵⁾。最近 Barkas ら¹⁸⁾は, E. coli の expression cloning の手法によって, MIR は α 6-85 の間に少なくとも 2 つあり, その 1 つは α 37-85 の中に含まれるとしており, Ratnam ら⁹⁾は α 46-127 を, Harcourt らは α 66-70 および α 12-30 を含む領域を MIR と示唆している³⁶⁾。しかしいずれにしても尚一層のつめが必要であるとともに, 抗原抗体反応の成立のためには一定の立体構造が必要とする議論もある¹⁹⁾。

一方 MG 抗体の重要な標的の一つであり, 受容体構造, 機能の面からも注目されるのは, α サブユニット ACh 結合部がどの領域にあるかということである。トキシン結合部と ACh 結合部が共通の領域にある²³⁾とすれば, α -BuTx を用いて ACh 結合部を推定できる。シスチン残基間のジスルフィド結合形成近傍に ACh 結合部が存在する²⁰⁾ことから, はじめは α 128-142 間ジスルフィド結合を含む領域³⁷⁾⁻³⁹⁾あるいは α 128, 142, 192, 193 で 2 重ジスルフィド結合が想定される領域⁴⁰⁾⁴¹⁾が, この機能を担う可能性のあるものとして検討されてきた。しかし, 既述の α 128, 147 間ジスルフィド結合を含む α 125-147 で免疫して成立した EAMG の抗体は, ACh 結合部を標的としておらず³³⁾、ジスルフィド結合を解いた合成ペプチド⁴²⁾あるいは, ジスルフィド結合を含まない α 131-147 でも EAMG の成立を見ている²²⁾。またヒト α 125-147 を抗原として免疫し発症した EAMG ラットの血清抗ラット AChR 抗体は, modulating antibody であった³⁴⁾。また Neumann らは, α 128, 142 のシスチンは容体内で 192, 193 のシスチンとジスルフィド結合を形成していないと報告した⁴³⁾。最近隣接するシスチン間 (α 192-193) にもジスルフィド結合が成立しうることが明らかにされる²¹⁾とともに, これを含む α 173-204⁴⁴⁾, α 185-196²³⁾⁴³⁾, α 182-198⁴⁵⁾, α 160-216²⁰⁾、の領域の中に ACh 結合部が存在すると示唆されている。

以上の諸報告をふまえ, 本研究ではまず MIR と ACh 結合部に関連すると推定される α 1-24, α 40-60, α 51-71, α 70-90, α 125-147, α 183-200 の 6 領域を選びペプチドを合成した。MG 患者血清中

にこれらに対する抗体が存在するか否かを見るため, 合成した 6 種のペプチドを抗原として検定したが 20 例の MG 血清のいずれにも有意な抗体上昇を認めることはできなかった (表 2)。そこで免疫寛容²²⁾の関与を考へて, ヒトにとっては異種のシビレエイのアミノ酸配列をとりあげ, また ACh 結合部の可能性の高い α 183-200 を選んで合成し, 上述の 20 検体を検定したところ 3 例にその抗体価上昇を認めた。ヒトとシビレエイ α 183-200 でこのような差異が生じた理由としては, 図 1 で示すようにアミノ酸の種類が残基番号 187, 189, 191 の 3 ケ所でヒトとシビレエイでは異なることがあげられる。一般に生体内で抗原として認識され抗体と蛋白が結合するには 6~7 残基が必要とされる⁴⁶⁾⁴⁷⁾。 α 183-200 の 18 残基中 α 187-191 間の 3 残基の違いは大きいと考えられる。本報の結果は, Lennon ら³³⁾の免疫実験で, ヒトの AChR で免疫したラットの抗体はヒトやラットなどの哺乳類の AChR よりシビレエイの AChR とよく反応したという現象とも共通するところがあり, 同種抗原よりも異種抗原に対する B cell レベルでの低い免疫寛容の関与が考えられる。また天然の AChR のそれとは異なる立体構造のペプチドを抗原として測定している方法上の限界や, クロラミン T で標識することによる構造的修飾なども考慮に入れるべきであろう。

MG 患者血清中に抗ペプチド抗体陽性を見たシビレエイ α 183-200 を抗原とした免疫ラット実験にて 7 匹中 4 匹に抗ラット AChR 抗体陽性, MEPP 振幅低下をきたすような EAMG 発症をみ, 発症した EAMG 血清には binding 抗体は証明されず, blocking 抗体のみ陽性であった。また発症した EAMG 血清に AChR 崩壊促進作用を認めなかったことより, α 183-200 は MIR ではなく, ACh 結合部を含む領域であるとの間接証拠と考えられる。このことは, トキシンと AChR との結合を本ペプチドが有意に阻止した in vitro 実験の直接証拠によって確かとなった。すなわち MG 患者血清と反応する抗原性を持つシビレエイ α 183-200 は ACh 結合能を担い, ラットに EAMG を誘導する免疫原性を有すると考えられる。

結 論

MG 抗体の標的である AChR のアミノ酸配列のうち, ヒト α 1-24, ヒト α 40-60, ヒト α 51-71, ヒト α 70-90, ヒト α 125-147, ヒト α 183-200, シビレエイ α 183-200 を合成し, MG 患者血清との反応性, AChR の構造と機能の検討, 動物モデルの作製等に供し以下の結論を得た。

1. MG 患者血清にヒト α 1-200 間の 6 種のペ

ペプチドに対する抗体は検出されなかった。しかし、異種のシビレエイ α 183-200 に対する抗体は 20 例中 3 例に検出された。このことから異種抗原と免疫寛容の関係、抗原に用いる合成ペプチドの立体構造、抗原の標識法についての配慮の必要性が考えられた。

2. シビレエイ α 183-200 免疫ラット実験において、7 匹中 4 匹に抗ラット AChR 抗体陽性、MEPP 振幅低下で示唆される EAMG の発症を認めた。発症ラットの抗ラット AChR 抗体は blocking 抗体であることより、この領域が ACh 結合部であることを間接的に示した。

3. シビレエイ α 183-200 免疫ラット血清に AChR 崩壊促進作用はなかったことより、 α 183-200 は MG 抗体の 50% 以上が標的としている MIR ではないことを確認した。

4. シビレエイ α 183-200 は、トキシン・受容体結合阻害活性が高く、この領域に ACh 結合部を有するものと推察された。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師高守正治教授に衷心より感謝の意を捧げます。また本研究に際しご助力、御教示くださいました奥村誠一博士、安田厚子博士、吉川弘明先生ならびに御協力をいただきました教室員各位に深甚の謝意を表します。本研究の一部は厚生省免疫性神経疾患調査研究助成金、同神経疾患研究委託費および財団法人東京生化学研究会研究助成金によって行なわれた。

文 献

- 1) Heidmann, O., Buonanno, A., Geoffroy, B., Robert, B., Guénet, J. L., Merlie, J. P. & Changeux, J. P.: Chromosomal localization of muscle nicotinic acetylcholine receptor genes in the mouse. *Science*, **234**, 866-868 (1986).
- 2) Numa, S., Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y. & Kikuyotani, S.: Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **48**, 57-70 (1983).
- 3) McCarthy, M. P., Earnest, J. P., Young, E. F., Choe, S. & Stroud, R. M.: The molecular neurobiology of the acetylcholine receptor. *Ann. Rev. Neurosci.*, **9**, 383-413 (1986).
- 4) Criado, M., Hochschwender, S., Sarin, V., Fox, J. L. & Lindstrom, J.: Evidence for unpredicted transmembrane domains in acetylcholine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2004-2008 (1985).
- 5) Noda, M., Fukutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Tanabe, T., Shimizu, S., Kikuyotani, S., Kayano, T., Hirose, T., Inayama, S. & Numa, S.: Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding α -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature (Lond.)*, **305**, 818-823 (1983).
- 6) Claudio, T., Vallivet, M., Patrick, J. & Hainemann, S.: Nucleotide and deduced amino acid sequence of Torpedo californica acetylcholine receptor γ -subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1111-1115 (1983).
- 7) Devillers-Thiery, A., Giraudat, J., Benta-boulet, M. & Changeux, J. P.: Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding α -subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor: A model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2067-2071 (1983).
- 8) Finer-Moore, J. & Stroud, R.: Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 155-159 (1984).
- 9) Ratnam, M., Nguyen, D. L., Rivier, J., Sargent, P. B. & Lindstrom, J.: Transmembrane topography of nicotinic acetylcholine receptor: Immunochemical tests contradict theoretical predictions based on hydrophobicity profiles. *Biochemistry*, **25**, 2633-2643 (1986).
- 10) Conti-Tronconi, B., Tzartos, S. & Lindstrom, J.: Monoclonal antibodies as probes of acetylcholine receptor structure. 2. Binding to native receptor. *Biochemistry*, **20**, 2181-2191 (1981).
- 11) Yoshida, M. M. & Lennon, V. A.: Purification and biochemical characterization of nicotinic acetylcholine receptors of human muscle. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12757-12764 (1982).
- 12) Tzartos, S. J. & Lindstrom, J.: Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 755-759 (1980).
- 13) Tzartos, S. J., Rand, D. E., Einarson, B. E. & Lindstrom, J. M.: Mapping of surface structures of electrophorus acetylcholine receptor using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, **256**,

- 8635-8645 (1981).
- 14) **Tzartos, S. J., Seybold, M. E. & Lindstrom, J. M.**: Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 188-192 (1982).
- 15) **Tzartos, S. J., Langeberg, L., Hochschwender, S. & Lindstrom, J.**: Demonstration of a main immunogenic region on acetylcholine receptors from human muscle using monoclonal antibodies to human receptor. *FEBS Lett.*, **158**, 116-118 (1983).
- 16) **Takamori, M., Okumura, S. & Yasuda, A.**: Presynaptic modification of neuromuscular transmission by antiacetylcholine receptor antibody: Myasthenic serum and monoclonal antibody produced by transformed lymphocytes. *Neurology*, **36**, 942-947 (1986).
- 17) **Gomez, C. M. & Richman, D. P.**: Anti-acetylcholine receptor antibodies directed against the α -bungarotoxin binding site induce a unique form of experimental myasthenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4089-4093 (1983).
- 18) **Barkas, T., Mauron, A., Roth, B., Alliod, C., Tzartos, S. J. & Ballivet, M.**: Mapping the main immunogenic region and toxin-binding site of the nicotinic acetylcholine receptor. *Science*, **235**, 77-80 (1987).
- 19) **Lindstrom, J., Criado, M., Ratnam, M., Whiting, P., Ralston, S., Rivier, J., Sarin, V. & Sargent, P.**: Using monoclonal antibodies to determine the structures of acetylcholine receptors from electric organs, muscles, and neurons. *Ann. New York Acad. Sci.*, **505**, 208-225 (1987).
- 20) **Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Fukutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T. & Numa, S.**: Primary structure of α -subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature (Lond.)*, **299**, 793-797 (1982).
- 21) **Kao, P. N. & Karlin, A.**: Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-linking between adjacent half cystinyl residues. *J. Biol. Chem.*, **261**, 8085-8088 (1986).
- 22) **Lennon, V. A., Griesmann, G. A., McCormick, D. J., Huafeng, Z. H. & Lambert, E. H.**: Definition of myasthenogenic sites of the human acetylcholine receptor using synthetic peptides. *New York Acad. Sci.*, **505**, 439-449 (1987).
- 23) **Neumann, D., Barchan, D., Fridkin, M. & Fuchs, S.**: Analysis of ligand binding to the synthetic dodecapeptide 185-196 of the acetylcholine receptor α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9250-9253 (1986).
- 24) **Merrifield, R. B.**: Automated synthesis of peptides. Solid-phase peptide synthesis, a simple and rapid synthetic method, has now been automated. *Science*, **150**, 178-185 (1965).
- 25) 太田光熙, 松原史よ, 西谷 裕, 林 恭三: 抗アセチルコリンレセプター抗体. *臨床免疫*, **13**, 212-217 (1981).
- 26) **Juillerat, M. A., Barkas, T. & Tzartos, S. J.**: Antigenic sites of the nicotinic acetylcholine receptor cannot be predicted from the hydrophilicity profile. *FEBS Lett.*, **168**, 143-148 (1984).
- 27) **Fambrough, D. M.**: Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, **59**, 165-227 (1979).
- 28) **Devreotes, P. N. & Fambrough, D. M.**: Acetylcholine receptor turnover in membranes of developing muscle fibers. *J. Cell Biol.*, **65**, 335-358 (1975).
- 29) **Merlie, J. P., Changeux, J. P. & Gros, F.**: Acetylcholine receptor degradation measured by pulse chase labelling. *Nature*, **264**, 74-76 (1976).
- 30) **Osserman, E. E. & Genkins, G.**: Studies in myasthenia gravis: Review of a twenty year experience in over 1200 patients. *Mt. Sinai, J. Med.*, **38**, 497-537 (1971).
- 31) **McCormick, D. J., Lennon, V. A. & Atassi, M. Z.**: Synthesis of an antigenic site of native acetylcholine receptor peptide 159-169 of Torpedo acetylcholine receptor α -chain. *Biochem. J.*, **226**, 193-197 (1985).
- 32) **Lindstrom, J., Criado, M., Hochschwender, S., Fox, J. L. & Sarin, V.**: Immunochemical tests of acetylcholine receptor subunit models. *Nature*, **311**, 573-575 (1984).
- 33) **Lennon, V. A., McCormick, D. J., Lambert, E. H., Griesmann, G. E. & Atassi, M. Z.**: Region of peptide 125-147 of acetylcholine subunit. tubunit is exposed at neuromuscular junction and induces experimental autoimmune myasthenia gravis, T-cell immunity, and modulating autoantibodies.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8805-8809 (1985).
- 34) **McCormick, D. J., Griesmann, G. E., Huang, Z. & Lennon, V. A.**: Synthetic α subunit peptide 125-147 of human nicotinic acetylcholine receptor induces antibodies to native receptor. Fed. Proc. Abstr., 45, 919 (1986).
- 35) **Criado, M., Sarin, V., Fox, J. L. & Lindstrom, J.**: Evidence that the acetylcholine binding site is not formed by the sequence α 127-143 of the acetylcholine receptor. Biochemistry, 25, 2839-2846 (1986).
- 36) **Harcourt, G. & Jermy, A.**: Mapping the autoimmunizing epitopes on acetylcholine receptors. Immunology Today, 8, 319-321 (1987).
- 37) **McCormick, D. J. & Atassi, M. Z.**: Location and synthesis of the acetylcholine-binding site in the α -chain of the Torpedo californica acetylcholine receptor. Biochem. J., 224, 995-1000 (1984).
- 38) **Smart, L., Meyers, H. W., Hilgenfeld, R., Saenger, W. & Maelicke, A.**: A structure model for the ligandbinding sites at the nicotinic acetylcholine receptor. FEBS Lett., 178, 64-68 (1984).
- 39) **Mulac-Jericevic, B., Kurisaki, J. & Atassi, M. Z.**: Profile of the continuous antigenic regions on the extracellular part of the α chain of an acetylcholine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3633-3637 (1987).
- 40) **Kao, P. N., Dwork, A. J., Kaldany, R. J., Silver, M. L., Wideman, J., Stein, S. & Karlin, A.**: Identification of the α -subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. J. Biol. Chem., 259, 11662-11665 (1984).
- 41) **Boulter, J., Luyten, W., Evans, K., Mason, P., Ballivet, M., Goldman, D., Stengelin, S., Martin, G., Heinemann, S. & Patrick, J.**: Isolation of a clone coding for the α -subunit of a mouse acetylcholine receptor. J. Neurosci., 5, 2545-2552 (1985).
- 42) **McCormick, D. J., Griesmann, G. E., Huang, Z. X., Lamvert, E. H. & Lennon, V. A.**: Myasthenogenicity of human acetylcholine receptor α -subunit synthetic peptide 125-147 does not require intramolecular disulfide cyclization. J. Immunol., 139, 2615-2619 (1987).
- 43) **Neumann, D., Barchan, D., Safran, A., Gershoni, J. M. & Fuchs, S.**: Mapping of the α -bungarotoxin binding site within the α subunit of the acetylcholine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3008-3011 (1986).
- 44) **Willson, P. T., Lentz, T. L. & Hawrot, E.**: Determination of the primary amino acid sequence specifying the α -bungarotoxin binding sites on the α subunit of the acetylcholine receptor from Torpedo californica. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8790-8794 (1985).
- 45) **Mulac-Jericevic, B. & Atassi, M. Z.**: Segment α 182-198 of Torpedo californica acetylcholine receptor contains a second toxin-binding region and binds anti-receptor antibodies. FEBS Lett., 199, 68-74 (1986).
- 46) **Atassi, M. Z.**: Antigenic structure of myoglobin: The complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. Immunochemistry, 12, 423-438 (1975).
- 47) **Atassi, M. Z.**: Antigenic structures of proteins: Their determination has revealed important aspects of immune recognition and generated strategies for synthetic mimicking of protein binding sites. Eur. J. Biochem., 145, 1-20 (1984).

