

ラット CD1 抗原

—組換え蛋白を用いた抗ラット CD1 ポリクローナル抗体による同定—

一 宮 慎 吾 松 浦 晃 洋

札幌医科大学医学部病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Characterization of Rat CD1 Antigen with a Polyclonal Antibody

Against a Recombinant Protein Produced by the Prokaryotic Expression System

Shingo ICHIMIYA and Akihiro MATSUURA

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical University School of Medicine,
(Chief: Prof. K. KIKUCHI)

ABSTRACT CD1, the first cluster of differentiation antigens, is a family of cell surface glycoproteins which are noncovalently associated with $\beta 2$ -microglobulin. Although the structure of CD1 is similar to that of major histocompatibility complex class I molecules and cytolytic T cell lines specific for CD1 molecules have been established, which suggest that CD1 antigens may play a role as a presenting molecule, the actual function of CD1 is presently unknown. We have analyzed and identified the rat homologue of CD1 in attempt to confirm the function of CD1 and whether it has been conserved in evolution. The rat CD1 gene was categorized into the CD1D class. In this report, we produced a specific rabbit antiserum to rat CD1 by the prokaryotic expression system and investigated the expression of its antigen. According to FACS and immunohistochemical analyses with the polyclonal antibody, rat CD1 antigen was expressed on the surface of thymocytes and spleen cells, and was detected in hepatic tissue. The expression level of CD1D class in lymphoid organs varied among species. The functional significance of these results is discussed.

(Received December 15, 1993 and accepted January 13, 1994)

Key words: Rat CD1, Class Ib, Recombinant protein, Polyclonal antibody

1 緒 言

CD1 抗原は当初胸腺細胞の表面マーカーとして同定された分子で, major histocompatibility complex (MHC) class I 分子と非常に類似した構造的特徴を有しており, $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2m$) と非共有結合する 43-49 kDa の膜蛋白である¹⁾. CD1 分子は MHC class I 分子とは異なり多形性に乏しいが, 遺伝子構築に関して MHC class I 分子との類似性が指摘されている²⁾. 以上のことから, CD1 分子は class Ib (non-classical class I) に属するとされる. class Ib 分子はその構造が古典的移植抗原に類似するが, 移植拒絶には関与せず多形に乏しい一連の分子群をいい, その多

くは MHC 領域のテロメアに存在する³⁾. CD1 遺伝子はヒトでは第 1 染色体に, マウスでは第 3 染色体上に存在しており, MHC とは連鎖していないことが明らかにされている^{4,5)}(Fig. 1). このことから CD1 分子は, class Ib の中でも特に non-MHC class Ib などとも呼ばれている¹⁾.

CD1 分子の分子遺伝学的意義, および機能的意義を解明するため, 我々はラットでの CD1 遺伝子の存在を証明し, その cDNA のクローニングを行い解析してきた⁶⁾. その結果, ラット CD1cDNA クローン 27.1 は, マウス CD1D1 相同遺伝子 (rCD1D1) であると考えられた. また, Southern 解析から, 他種の CD1 同様に, rCD1D1 は MHC に連鎖していないことが予想され, さ

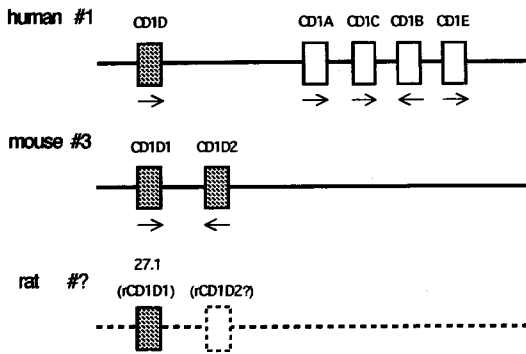


Fig. 1 Arrangement of CD1 loci in human, mouse and rat (modified from reference 2 and 6). The five human CD1 genes are linked within 190 kb of DNA in chromosome 1, and the two mouse CD1 genes are less than 10 kb apart in chromosome 3. The rat CD1 locus may be similar to that of mouse in another chromosome except MHC. Classic CD1 class and CD1D class are depicted by open box and hatched box, respectively (human CD1E is controversial to be in classic CD1 class). Arrows indicate direction of transcription.

らにマウス CD1D2 相同遺伝子 (rCD1D2) の存在が示唆された (Fig. 1). 分子遺伝学的解析から CD1 system は 2 つの class に大別されるが²⁾, その中でも CD1D class が, ヒト, マウス, ラットで保存されていることが明らかとなった. CD1D class のように種を越えて極めて良く保存されている遺伝子は, class Ib 遺伝子の中でも稀であり, rCD1D1 は, class Ib 遺伝子の機能的意義, さらには MHC 全体の生物学的意義とその進化について解析していく上で大変興味深い遺伝子である. rCD1D1 の発現臓器の検索を行ったが, Northern 解析から, rCD1D1 はマウス CD1 同様, 広範な臓器で転写されていることが判明した⁶⁾.

そこでラット CD1 分子について蛋白レベルでの解析を行うことを目的として, 本研究において我々は, 大腸菌によって産生された rCD1D1 組換え蛋白を免疫原とし, rCD1D1 遺伝子産物に対するポリクローナル抗体の作成を試みた. この抗体を用いて, ラット CD1 分子の蛋白レベルでの発現を解析した. その結果, ラット CD1 分子は, 蛋白として胸腺細胞, 脾細胞および肝細

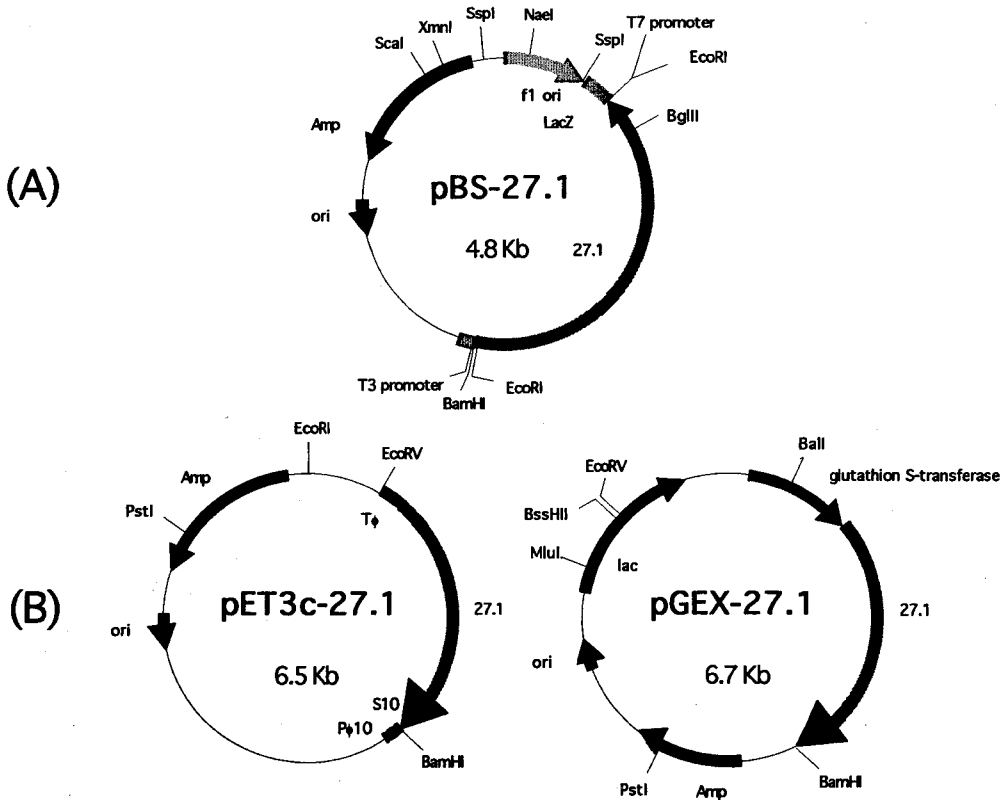


Fig. 2 Schematic diagram of expression vectors. (A) pBS-27.1, the pBluescript SK⁻ containing the cDNA insert (rCD1D1) isolated by helper phage rescue; (B) pET3c-27.1, pET3c containing BglIII-BamHI fragment of pBS-27.1 encoding truncated rCD1D1 with a deleted part of $\alpha 1$ domain; pGEX-27.1, pGEX-3X containing the same insert as pET3c-27.1.

胞で発現されていることが明かとなった。報告されている結果と合わせると、CD1d class の胸腺細胞および脾細胞での発現量が、種によって異なっていることが判明した。CD1 の機能は未だ明かではないが、この差異とあわせて以下で論じたい。

2 実験方法

2.1 使用細胞

2.1.1 ラット正常細胞

ラット正常細胞は、6週令から8週令の Wistar ラット (Charles-River, Tokyo) を使用した。摘出した胸腺および脾臓をスライドガラスで擦り潰し、phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.5) に浮遊させ不純物、組織片を取り除いた。脾臓の細胞浮遊液は比重 1.090 の Ficoll-Conray 液 (9% (w/v) Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala) と 30% (w/v) DIP conray (第一製薬) を混和し調整した) に重層し、比重遠心法にて細胞を回収し、PBS で洗浄後 PBS に浮遊させ、脾細胞浮遊液とした。

2.1.2 培養細胞

マウス BALB3T3 と、マウス BALB3T3 に pcDLSR α 2967 に組み込んだ rCD1D1 の組換えベクターと pSV2neo を、リン酸カルシウム法にて導入し作成された形質転換株 (CL628) を用いた。培養液として 10% FCS, 2 mL-glutamine, 200 biological unit/ml G418 (Sigma, St. Louis, MO) (CL628 のみに使用) を含んだ MEM 培養液を用いた。

2.2 組換え蛋白の発現

2.2.1 発現ベクターの作製

λ ZAPII ベクターを用いた cDNA ライブラリーより選り出した、open reading frame を含む 27.1 を、R408 ヘルパーファージにより、pBluescript II SK-組換えベクターに変換した (pBS-27.1)。pBS-27.1 より、BglII および BamHI にて open reading frame の一部を切出し、原核細胞における発現ベクター-pET3c⁹⁾ および pGEX-3X⁹⁾ の BamHI 部位に組込んだ (それぞれ pET3c-27.1, pGEX-27.1) (Fig. 2)。各組換えベクターの発現方向をその制限酵素地図より確認し、また DNA シークエンスによって、組み換えベクターの組換え部位が in-frame であることを確認した。

2.2.2 組換え蛋白の発現

pET3c-27.1 により形質転換した BL21 大腸菌を、NZCYM 培養液 (BRL, New York, NY) で培養し、O.D. (650 nm) が 0.6 になった時点で isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) を 1 mM になるよう加

えた。pGEX-27.1 により形質転換した XL-1 blue 大腸菌は、2xYT 培養液で培養し、上記と同様の条件で IPTG を加えた。組換え蛋白が大腸菌内で合成されていること確認するため、経時的に IPTG 存在下の形質転換株を採取し、sample buffer (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol) に溶解後、100°C 3 分間煮沸し、15% の SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて展開後、Coomassie brilliant blue で染色し、組換え蛋白の存在を確認した¹⁰⁾。

2.3 組換え蛋白の精製

pET3c-27.1 により形質転換した BL21 大腸菌を 500 ml 培養し、菌を回収した。ペレットを緩衝液 A (30 mM Tris-Cl (pH 7.5), 30 mM NaCl) で 2 回洗い、20 ml の緩衝液 A に懸濁し、超音波で十分に破壊した。8,000 rpm で 20 分遠心し、ペレットを 1M 蔗糖 100 ml に懸濁し、8,000 rpm で 20 分間遠心した。ペレットとして得られた封入体¹¹⁾ を sample buffer に溶解し、15% の SDS-PAGE で展開後、Coomassie brilliant blue で染色し、目的のバンドを切出した。アクリルアミドゲルより electroelutor (Sample concentrator Model 1750, ISCO, Lincoln, NE) にて組換え蛋白を溶出し、PBS で透析後 O.D. を測定し、組換え蛋白濃度を算定した。

2.4 ポリクローナル抗体の作製

透析後の組換え蛋白 500 μ g を、New Zealand White rabbit (Charles-River) に、筋注にて隔週で 6 回免疫した。初回免疫は complete Freund アジュバントを、2 回目以降は incomplete Freund アジュバントと共に免疫を行った。得られた抗血清は硫化アンモニウムで塩析し濃縮後、protein A Sepharose CL-4B カラム (Pharmacia) を用いて、抗ラット CD1 ポリクローナル抗体を精製し、以下の実験に供した。

2.5 免疫生化学的解析

2.5.1 蛍光抗体法

抗ラット CD1 ポリクローナル抗体の各種細胞との反応性を、間接蛍光抗体法により検討した。細胞は生細胞を用い、 $1-2 \times 10^6$ 個の生細胞をペレットにし、50 μ l の濃縮抗体を加え、4°C 1 時間反応させ、過量の PBS にて洗浄し、次いで二次抗体として Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を混和し、4°C 30 分間反応させ過量の PBS にて洗浄し、Fluorescence activated cell sorter

(FACScan, Becton Dickinson FACS system) を用い判定した。陰性コントロールの抗体として、正常ウサギ免疫グロブリンを用いた。

2・5・2 細胞表面抗原の標識

細胞表面抗原は lactoperoxidase (LPO) 法により ^{125}I を標識した¹²⁾。すなわち、 $1-2 \times 10^8/\text{ml}$ の細胞浮遊液 1 ml に $100 \mu\text{l}$ の LPO (2 mg/ml, Sigma) と 1 mCi の ^{125}I を加え、ついで $0.03\% \text{H}_2\text{O}_2$ $100 \mu\text{l}$ を加え混合した。さらに 4 分間隔で $0.03\% \text{H}_2\text{O}_2$ $100 \mu\text{l}$ を 3 回加え、計 16 分間 27°C で反応させた。反応後 PBS にて 3 回洗浄し、lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 140 mM NaCl, 0.5% Nonidet P40 (NP40), 1 mM phenyl methylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml pepstatin, 0.05% sodium azide, 0.2 TIU/ml aprotinin, 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid) により可溶化した。 4°C 1 時間、lysis buffer に浮遊させた後、遠心し上清を回収し whole lysate とした。

2・5・3 Radioimmunoprecipitation (RIP)

抗ラット CD1 ポリクローナル抗体を、protein A Sepharose CL-4B と 4°C 12 時間反応させ、十分量の PBS で洗浄後、200 万 cpm の whole lysate を 4°C 12 時間反応させ、immune complex を形成させた。

immune complex を結合した protein A Sepharose を、 $0.5\% \text{NP40}$ PBS で洗浄した。immune complex の解離は、sample buffer (62.5 mM Tris-Cl (pH 7.0), 50 mM dithiothreitol, 0.1% SDS, 0.01% bromophenol blue, 10% glycerol) を $100 \mu\text{l}$ 加え、 100°C 3 分間煮沸することにより行い、3,000 rpm 5 分間遠心し、その上清を 15% アクリルアミドゲルの SDS-PAGE 用試料とした。泳動後のアクリルアミドゲルを Coomassie brilliant blue で染色し、エタノール、氷酢酸混合液で脱色後、濾紙上で乾燥させ、X 線フィルム (Kodak RP Royal X-Omat) を用いオートラジオグラフィーを行って可視化した。陽性コントロールの抗体として、R1-10B5 (抗ラット CD8 α モノクローナル抗体)¹²⁾、R4-8B1 (抗ラット class I モノクローナル抗体)¹³⁾ を用いた。陰性コントロールの抗体として、正常ウサギ免疫グロブリンを用いた。また分子量マーカーとして、Low Molecular Weight Marker Calibration Kit (Pharmacia) (phosphorylase b (94 kDa), albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), α -lactalbumin (14 kDa)) を用いた。

2・5・4 免疫組織染色法

新鮮凍結切片を用いて間接酵素抗体法で行った。す

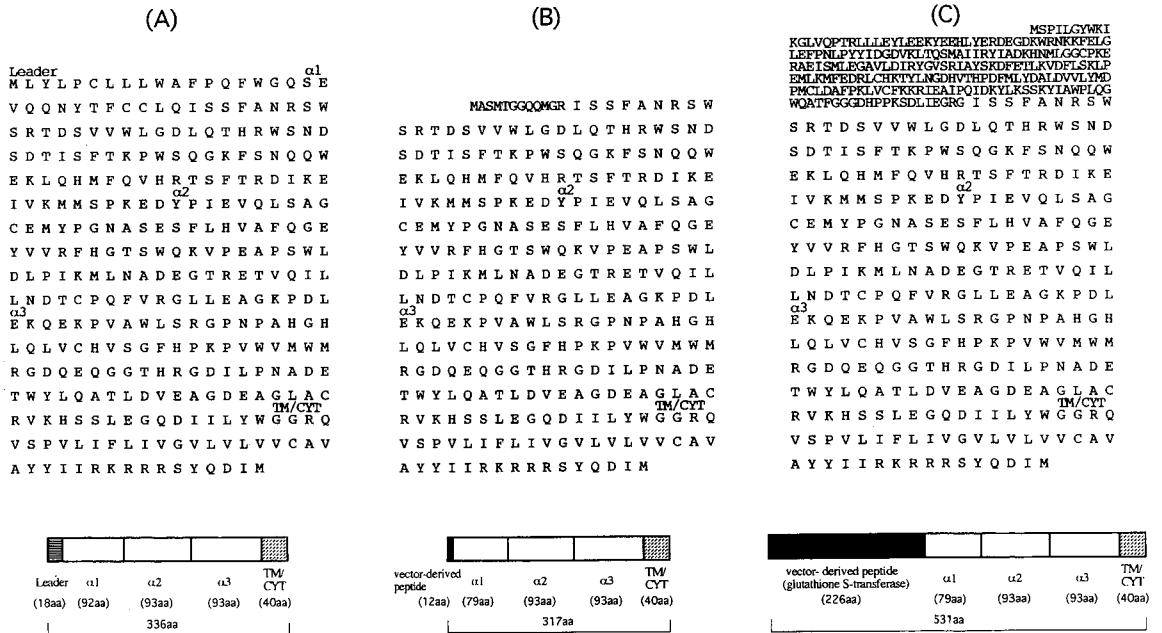


Fig. 3 Deduced amino acid sequences and schematic diagram of constitution. The leader peptide, extracellular ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), transmembrane and cytoplasmic (TM/CYT) regions are indicated. The vector-derived peptides are depicted in narrow range and closed boxes. (A), rCD1D1; (B), pET3c-27.1; (C), pGEX-27.1.

なわち 4 μm に薄切した凍結切片を風乾後アセトン固定を行い、一次抗体として正常ウサギ免疫グロブリンおよび抗ラット CD1 ポリクローナル抗体を、室温で 2 時間反応させた。PBS にて洗浄後、二次抗体として 100 倍希釈のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン (Kirkegaard & Perry Laboratories) を、室温で 1 時間反応させた。発色は DAB 反応で行った。核染にはメチルグリーンを用いた。

3 成 績

3・1 大腸菌での rCD1D1 組換え蛋白の発現

近年になって分子生物学の進歩に伴い、効率良く発現し大量に精製できる原核細胞での組換え蛋白の発現系が開発されている。しかしながら、cDNA の塩基配列および発現ベクターの種類によって発現効率が異なることが言われているため、我々は 2 種の原核細胞系の発現ベクター、pET3c, pGEX-3X を用いて、ラット CD1cDNA の発現を試みた。Fig. 3(A) に組換え蛋白の予想されるアミノ酸配列と全体の模式図を示した。Fig. 3(A) は、我々が決定した rCD1D1 より予想されるアミノ酸配列である。Fig. 3(B) は pET3c-27.1 より予想されるアミノ酸配列を示した。産生される蛋白は、12 アミノ酸で構成される pET3c 由来のペプチドと、leader 配列および $\alpha 1$ ドメインの 13 アミノ酸を欠いた rCD1D1 ペプチドとの融合蛋白であることが考えられた。全体として 317 アミノ酸で構成されており、分子量が 36004 Da であることが予想された。Fig. 3(C) は pGEX-27.1 より予想されるアミノ酸配列を示した。産生される蛋白は、226 アミノ酸で構成される pGEX-3X 由来の glutathione S-transferase (*Schistosoma japonicum* 由来)¹⁴⁾ と、pET3c-27.1 と同様、leader 配列および $\alpha 1$ ドメインの 13 アミノ酸を欠いた rCD1D1 ペプチドとの融合蛋白であることが考えられた。全体として 531 アミノ酸で構成されており、分子量が 61047Da であることが予想された。これら組換え蛋白の発現を調べるため、1 mM の IPTG 存在下で発現量の経時的推移を検証した。その結果、pET3c-27.1 の系により、36 kDa 蛋白の経時的発現増量が認められ (Fig. 4(A)), pGEX-27.1 の系により、61 kDa 蛋白の経時的発現量が認められた (Fig. 4(B))。2 つの組換え蛋白は、ともに予想した通りに大腸菌内で発現されていると考えられた。

3・2 抗ラット CD1 ポリクローナル抗体の作製

2 系統の組換え蛋白のうち、pET3c-27.1 による組換え蛋白の方が、ベクター由来のペプチドが少ないため

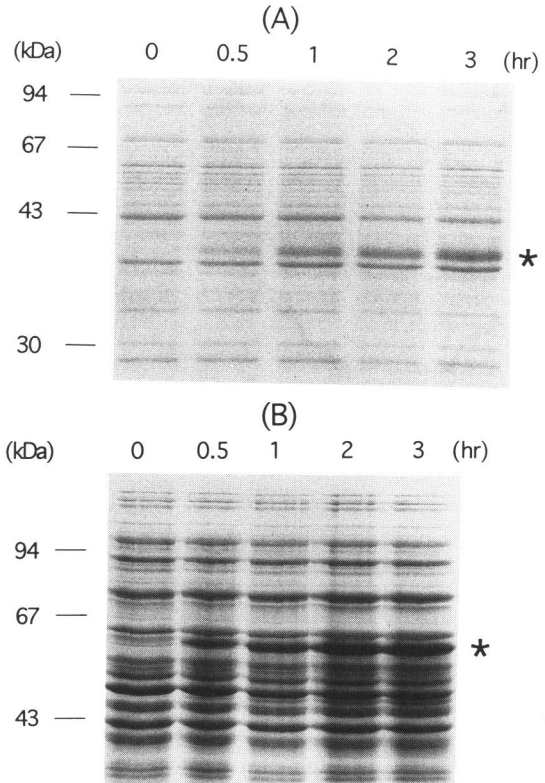


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins induced in *E. coli*. The transformed cells were cultured with 1mM IPTG and harvested at 0, 0.5, 1, 2, and 3 hours sequentially. Total cellular proteins were electrophoresed in a 15% gel and was stained with Coomassie brilliant blue. The positions of induced protein are denoted with an asterisk (*). (A), pET3c-27.1; (B), pGEX-27.1.

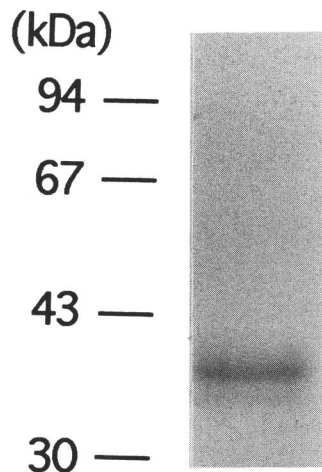


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein produced by pET3c-27.1. This protein was used for immunization of rabbits.

免疫に適しているものと考え、pET3c-27.1による組換え蛋白を用い抗血清の作製を試みた。pET3c-27.1により形質転換したIPTG存在下の大腸菌より封入体を精製し、さらにSDS-PAGEにより展開し、より純度の高い組換え蛋白を精製した。この精製した組換え蛋白(Fig. 5)をウサギに免疫し抗血清を得、抗ラットCD1ポリクローナル抗体をprotein A Sepharose CL-4Bカラムを用い精製した。

3.3 抗ラットCD1ポリクローナル抗体を用いたFACS解析

抗ラットCD1ポリクローナル抗体とrCD1D1のマウスBALB3T3 transformantであるCL628との反応性をFACSで解析した(Fig. 6(A))。その結果、CL628の細胞表面上に発現しているrCD1D1遺伝子産物と、このポリクローナル抗体が反応していることが示され、

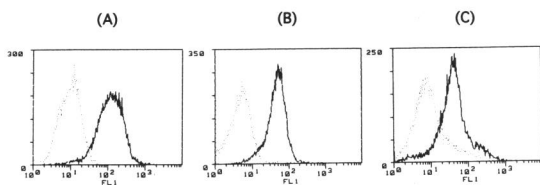


Fig. 6 FACS analysis of the reactivity of the anti-rat CD1 polyclonal antibody. Log fluorescence intensity is indicated on the abscissa and cell number on the ordinate. (A), CL628 transfectants; (B), thymocytes; (C), spleen cells. Dashed line, normal rabbit immunoglobulin; solid line, anti-rat CD1 polyclonal antibody.

以下の実験に使用可能と思われた。この抗ラットCD1ポリクローナル抗体を用いて、ラット胸腺細胞におけるCD1分子の発現を調べた(Fig. 6(B))。すると、明らかな一峰性を示し、広く胸腺皮質細胞および髄質細胞の細胞表面上にCD1分子が発現していることが考えられた。次にラット脾細胞におけるCD1分子の発現を見ると(Fig. 6(C))、胸腺細胞と同様一峰性を示し、末梢リンパ球表面上に広く分布していることが判明した。rCD1D1はラットでのCD1D classに属するCD1であるが、他種におけるCD1D classを比較すると、ヒトCD1dは胸腺細胞にほとんど発現しておらず、脾細胞では僅かに発現が認められ¹⁵⁾、末梢のB細胞に僅かに発現が認められるのみである¹⁶⁾。マウスでも、胸腺細胞および脾臓細胞上に僅かに発現が認められるのみである^{17,18)}。このように、胸腺細胞および脾臓細胞での発現に関して、同じCD1D classであっても、種によってその発現量が異なっていることが示唆された。

3.4 抗ラットCD1ポリクローナル抗体を用いたRIP

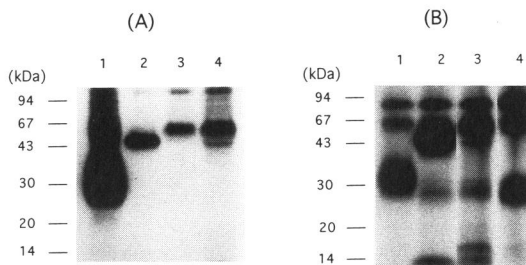


Fig. 7 Radioimmunoprecipitation and SDS-PAGE analysis of thymocytes (A) and spleen cells (B). (A); lane 1, R1-10B5; lane 2, R4-8B1; lane 3, normal rabbit immunoglobulin; lane 4, anti-rat CD1 polyclonal antibody. (B); lane 1, R1-10B5; lane 2, R4-8B1; lane 3, anti-rat CD1 polyclonal antibody; lane 4, surface immunoglobulin.

による解析

ラット胸腺細胞および脾細胞を¹²⁵I標識し、抗ラットCD1ポリクローナル抗体を用いてRIPを行った。還元条件下SDS-PAGEを行い検討したところ、胸腺細胞および脾細胞ともに、ラットCD1分子の分子量が43 kDaであることが予想された(Fig. 7(A) lane 4, (B) lane 3)。FACS解析と併せて、ラットCD1抗原が胸腺細胞および脾細胞表面上に存在することが明らかとなった。 β 2mとの会合に関し、R4-8B1(抗ラットclass Iモノクローナル抗体)でのRIPの結果と照合すると、胸腺線胞表面上では明確ではないが、脾細胞表面上では β 2mと会合していることが予想された。これを確認するため、抗ラットCD1ポリクローナル抗体で免疫沈降後の蛋白を、Western法によって抗 β 2m抗体で解析したところ、胸腺細胞および脾細胞の細胞表面上においてラットCD1分子と β 2mとの会合が認められた⁹⁾。また、実験条件によって確定されないが、脾細胞上ではラットCD1と共沈する17 kDaの蛋白を認めた(Fig. 7(B) lane 3)。ヒトCD1dと同様の17 kDaの蛋白が認められており¹⁵⁾、CD1分子の機能を知る上で非常に興味深い蛋白である。

3.5 抗ラットCD1ポリクローナル抗体を用いた免疫染色による解析

ラット肝組織でのrCD1D1の発現はNorthern解析から確認してあるが、免疫染色を行った結果、細胞膜と一部細胞質での発現を認めた(Fig. 8)。肝組織でのCD1D classの発現は、ヒト¹⁵⁾とマウス¹⁷⁾で示されており、種によって胸腺細胞および脾細胞でのCD1D classの発現量が異なっていることに比べて、肝組織では種を越えてCD1D classが発現していることが示唆された。

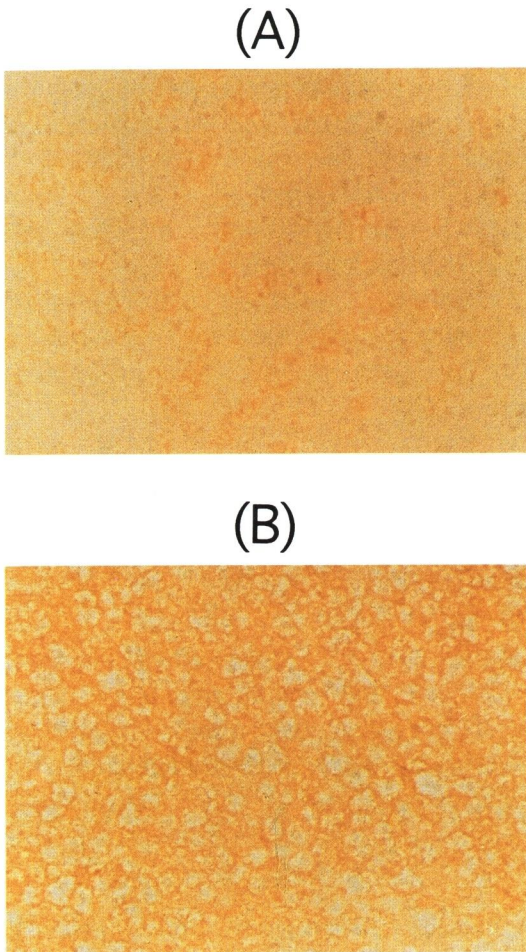


Fig. 8 Immunohistochemical staining of hepatic tissue. Fresh frozen specimens were stained with normal rabbit immunoglobulin (A), or anti-rat CD1 polyclonal antibody (B).

4 考 察

4・1 ラット CD1 分子の存在

本研究において、原核細胞の発現系を用いてポリクローナル抗体を作製し、この抗体を用いて FACS 解析と RIP 解析を行った。その結果、rCD1D1 遺伝子産物が胸腺細胞および脾細胞の細胞表面上に存在することを確認することができ、塩基配列から推定されたように⁹⁾、タイプ II 膜結合型蛋白としてラット CD1 分子の存在を証明することができた。RIP 解析からその分子量は 43 kDa であることが予想されたが¹⁸⁾、マウス CD1 は分子量が 48 kDa と報告されている。core protein の分子量は両者ともほぼ一致するので、RIP 解析による分子量の差は、糖鎖などの翻訳後修飾の違いによるもの

と考えられる。Northern 解析によると rCD1D1 は胸腺、脾臓を含む広範な臓器で転写されていることが解っているが、これらの臓器での蛋白としての発現は、今後の RIP 解析や、モノクローナル抗体を用いた検索結果に委ねられるであろう。

4・2 2 つの CD1 class

現在までのところ、CD1 遺伝子は全ての哺乳動物に存在すると考えられているが²⁾、各種における CD1 遺伝子間のホモロジー検索および遺伝学的系統樹の検索結果から、CD1 遺伝子はヒト CD1A, CD1B, CD1C などを含む classic CD1 class と、ヒト CD1D, マウス CD1D1, CD1D2 などを含む CD1D class の 2 つの class に大別されることが解っている¹⁹⁾ (Fig. 1)。これらは、哺乳類分岐以前に CD1 祖先遺伝子から 2 つの class に分岐し、現在の遺伝子を構成したと考えられている^{19,20)}。ヒト、サル、ウサギ、ヒツジ、ウシなど多くの種は、classic CD1 class と CD1D class の両方の class を持つとされるが、げっ歯類には CD1D class のみが存在しているとされている。その理由の一つとして Milstein らは、げっ歯類の進化過程で classic CD1 class が欠失したと考えている^{2,19)}。ところで、class Ib 分子の機能は未だ明確ではないが、種によって class Ib 遺伝子数が著しく異っていたり、またある場合には相同遺伝子が存在しないことが一つの特徴である。これらのことから class Ib 分子の考えられる機能の一つとして、class Ib 分子が互いに機能的に補完し合うことによって、免疫認識の一体系をなすことが挙げられるが³⁾、この観点からマウスの CD1 system において、classic CD1 class に対する機能的補完性が現在議論されている。マウスではその組織分布の類似性から、class Ib 分子に属する TL 抗原がその役割を担っているかもしれない¹⁹⁾。我々の解析によると、ラットでも classic CD1 class が欠落していると推測されるが、現在までの解析ではマウスとは異なり、ラットでは TL 抗原は存在せず²¹⁾、したがって TL 抗原以外の class Ib 分子が classic CD1 class の機能を補完しているのではないかと考えられる。

4・3 CD1D class の発現量の相違

我々および Milstein らの解析によると、2 つの CD1 class の中でも、CD1D class が極めて良く保存されていることが明かとなったが (Fig. 1)、CD1D class の胸腺細胞および脾細胞での発現に関し、ヒト¹⁵⁾、マウス^{17,18)} での発現が僅かであると報告されている。したがって、種によって CD1D class の胸腺細胞および脾細胞での発現量が異なっていることが示された。また、

CD1D class の肝細胞での発現に関しては、ヒト¹⁵⁾、マウス¹⁷⁾ では発現が認められており、今回の研究と併せて、種を越えて CD1D class は肝組織に発現していることが考えられた。以上から、CD1D class の発現量が種によって、リンパ系臓器と非リンパ系臓器で異なっていることが示唆された。CD1 system 全体としての機能的補完性を先に論じたが、CD1 system 中の CD1D class においてもリンパ系臓器に関し、機能的補完性が存在する可能性が考えられる。種を越えて存在する CD1D class が、ある免疫認識体系をなすために、機能的補完性が加わることによって機能しているとすれば、class Ib 遺伝子の生物学的意義さらには MHC 全体の進化を考える上で大変興味深い事実であると考えられる。

4.4 CD1 分子の機能

CD1 の機能は未だ不明であるが、MHC class I 分子との構造的類似性から、CD1 分子が抗原提示分子として機能することが想定されてきた²²⁾。CD1 分子に対し幾つかの T 細胞株が樹立され^{23,24)}、また CD1b が結核菌の菌体成分の提示に関与していることが明らかにされた²⁵⁾。最近になって、腸管上皮が CD1 分子を介して T 細胞を活性化させることが示され²⁶⁾、monocyte において GM-CSF により CD1 分子の発現が誘導されることも報告されている²⁷⁾。これらのことから、CD1 分子が MHC class I 分子と同様に抗原提示分子としての機能を保持していることが考えられている。また、class Ib 分子は多形性に乏しいため、repertoire が限定されている $\gamma\delta$ -T 細胞抗原受容体のリガンドとなっていることが推定されている^{22,28)}。マウスでは $\gamma\delta$ -T 細胞が腸管上皮に出現しており²⁹⁻³²⁾ CD1¹⁷⁾ や TL³³⁾ が腸管上皮に発現していることから、これら class Ib 分子が $\gamma\delta$ -T 細胞抗原受容体のリガンドとなり得ると考えられ、この系が消化管免疫に関与していることが示唆されている。

class Ib としての CD1 分子の機能は、ある種のみに限定して機能を解析して行くよりも、対象を多種に広げて、免疫系におけるリガンドとしての MHC、あるいは MHC 関連分子と T 細胞抗原受容体との関係から、分子進化的に解析する方が機能的意義の解明に役立つと考えられる。今後 rCD1D1 を中心として CD1 分子の機能的意義を検索して行くことにより、個体における免疫認識機構に新発見を与えるばかりでなく、免疫認識機構の進化についても新たな展開がもたらされるであろう。

5 結 語

ラット CD1 抗原の機能的意義を解析するため、ラット CD1cDNA (rCD1D1) より作製した組換え蛋白を用いて、抗ラット CD1 ポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて検索した結果、

- 1) ラット CD1 抗原は胸腺細胞および脾細胞上に発現され、その分子量が 43 kDa であった。
- 2) 胸腺細胞および脾細胞での CD1D class の発現に関し、種によって発現量に差があり、一方肝組織での CD1D class の発現に関しては、種によって発現量に差がなかった。
- 3) rCD1D1 の解析およびさまざまな種属における CD1D class を比較検討して行くことによって、CD1 system の機能、さらには class Ib の機能的意義を解明できることが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた本学病理学第 1 講座 菊地浩吉教授、pGEX-3X の提供をはじめさまざまな御協力をいただきました本学癌研究所分子生物学部門 澤田幸治助教授に深謝いたします。

文 献

1. Boumsell L. Cluster report: CD1. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGK, editors. Leukocyte typing IV. Oxford, Oxford University Press, 1989, 251-253.
2. Calabi F, Yu CY, Caroline AG, Bilstrand CA, Milstein C. CD1: From structure to function. In: Srivastava R, Ram BP, Tyle P, editors. Immunogenetics of the Major Histocompatibility Complex. New York, VCH Publishers, 1991, 215-243.
3. 松浦晃洋, 一宮慎吾, 水野伸一, 菊地浩吉. クラス Ib は何をしているのか—その全体像—. 菊地浩吉, 矢田純一, 奥村康編. Annual Review 免疫 1994, 東京, 中外医学社, 1994: 227-240.
4. Calabi F, Milstein C. A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. Nature 1986, 323: 540-543.
5. Moseley WS, Watson ML, Kingsmore SF, Seldin MF. CD1 defines conserved linkage group border between human chromosomes 1 and mouse

- chromosomes 1 and 3. *Immunogenetics* 1989, 30: 378-382.
6. Ichimiya S, Kikuchi K, Matsuura A. Structural analysis of the rat homologue of CD1; Evidence for evolutionary conservation of the CD1D class and widespread transcription by rat cells. *J Immunol.* in press.
 7. Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K, Yoshida M, Arai N. SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the Simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 1988, 8: 466-472.
 8. Studier FW, Maffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986, 189: 113-130.
 9. Smith DB, Jonthon KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia Coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988, 67: 31-40.
 10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning; A laboratory manual.* 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 11. Sakane F, Imai S, Yamada K, Kanoh H. The regulatory role of EF-hand motifs of pig 80k diacylglycerol kinase as assessed using truncation and deletion mutants. *Biochem Biophys Res Comm* 1991, 181: 1015-1021.
 12. Matsuura A, Ishii Y, Yuasa H, Narita H, Kon S, Takami T, Kikuchi K. Rat T lymphocyte antigens comparable with mouse Lyt-1 and Lyt-2, 3 antigenic systems: characterization by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984, 132: 316-322.
 13. Matsuura A, Ishii Y, Iwaki H, Kikuchi K. A novel cell-surface antigen expressed on most leukocytes and a minor cortisone-resistant population of thymocytes in rats: characterization by monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol* 1985, 29: 873-881.
 14. Smith DB, Davern KM, Board PG, Tiu WU, Garcia EG, Mitchell, GF. Mr. 26.000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 8703-8707.
 15. Blumberg RS, Terhorst C, Bleicher P, McDermott FV, Allan CH, Landau SB, Trier JS, Balk SP. Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1991, 147: 2518-2524.
 16. Small TN, Knowles RW, Keever C, Kernan NA, Collins N, O'Reilly RJ, Dupont B, Flomenberg N. M241 (CD1) expression on B lymphocytes. *J Immunol* 1987, 138: 2864-2868.
 17. Bleicher PA, Balk Sp, Hagen SJ, Blumberg RS, Flotte TJ, Terhorst C. Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 1990, 250: 679-682.
 18. Balk SP, Bleicher PA, Terhorst C. Isolation and expression of cDNA encoding the murine homologues of CD1. *J Immunol* 1991, 146: 768-774.
 19. Calabi F, Jarvis JM, Martin L, Milstein C. Two classes of CD1 genes. *Eur J Immunol* 1998, 19: 285-292.
 20. Hughes AL. Evolutionary origin and diversification of the mammalian CD1 antigen genes. *Mol Biol Evol* 1991, 8: 185-201.
 21. 高山晋一, 松浦晃洋: クラス Ib 遺伝子の分子遺伝学的解析—ラット T1a および CD1 相同遺伝子の同定—. *札幌医誌* 1992 61: 49-61.
 22. Strominger JL. The $\gamma\delta$ T cell receptor and class Ib MHC-related proteins: enigmatic molecules of immune recognition. *Cell* 1989, 57: 895-898.
 23. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4⁺CD8⁻ cytolytic T lymphocytes. *Nature* 1989, 341: 447-450.
 24. Faure F, Jitsukawa S, Miossec C, Hercend T. CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood $\gamma\delta$ cells. *Eur J Immunol* 1990, 20: 703-706.
 25. Porcelli S, Morita CT, Brenne MB. CD1b restricts the response of human CD4⁺8⁻ T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 1992, 360: 593-597.
 26. Panja A, Blumberg RS, Balk SP, Mayer L. CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions. *J Exp Med* 1993, 178: 1115-1119.
 27. Kasinrerck W, Baumruker T, Majdic O, Knapp W, Stockinger H. CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Immunol* 1993, 150: 579-584.
 28. Janeway C, Jones B, Hayday A. Specificity and

- function of T-cells bearing $\gamma\delta$ receptors. *Immunol Today* 1988, 9, 73-76.
29. Kuziel WA, Takashima A, Bonyhadi M, Bergstresser PR, Allison JP, Tigelaar RE, Tucker PW. Regulation of T-cell receptor γ -chain RNA expression in murine Thy-1⁺ dendritic epidermal cells. *Nature* 1987, 328: 263-266.
 30. Konig F, Stingl G, Yokoyama WM, Yamada H, Maloy WL, Tschachler E, Shevach EM, Coligan JE. Identification of a T3-associated $\gamma\delta$ T-cell receptor on Thy-1⁺ dendritic epidermal cell lines. *Science* 1987, 236: 834-836.
 31. Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhadi M, Tigelaar RE, Tucker PW, Allison JP. Limited diversity of $\gamma\delta$ antigen receptor genes of Thy-1⁺ dendritic epidermal cells. *Cell* 1988, 55: 837-847.
 32. Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W, Tonegawa S. Homing of a $\gamma\delta$ thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* 1990, 343: 754-757.
 33. Hershberg R, Eghtesaby P, Sydora B, Bronson K, Cheroutre H, Modlin R, Kronenberg M. Expression of the thymus leukemia antigen in mouse intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 9727-9731.
-
- 別冊請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目
札幌医科大学医学部病理学第1講座 一宮慎吾