

感染防御学部門

Department of Molecular Immunology

本部門ではヒトおよび動物における免疫応答機構を細胞レベル, 分子レベルで解明することを目的とする。更にそれらの知見をもとに免疫不全症や免疫異常症の原因と治療法について研究を進めたいと考えている。その方法として, 遺伝子工学的手法, 細胞工学的手法を組み合わせている。

A. ヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子の発現調節機構の解析

数多くの遺伝子が, 特定の組織や細胞においてのみ転写され発現してくることが知られている。すなわち, 真核細胞の多くの遺伝子が, 細胞特異的あるいは分化過程特異的に発現することが知られるようになった。このような遺伝子のイントロン中 (時にはエクソン中) に存在するシスに働く DNA 領域と, これら DNA 領域に直接結合するか, あるいは間接的に働きかけることにより, その機能を発揮するトランスに作用する蛋白によって行なわれる。免疫グロブリン遺伝子は, B細胞系列の細胞でのみ再配列が生じると共に, 再配列を終えた抗体遺伝子であっても, その発現はB細胞でのみ生じる。我々はヒトH鎖遺伝子, γ 1 鎖遺伝子を用いて, ヒトH鎖遺伝子のB細胞特異的発現について以前より解析を行ってきた。その結果, トランスに働く蛋白として, ネガティブに働くレプレッサー蛋白またポジティブに働くエンハンサー蛋白が存在することを証明すると共に, エンハンサー蛋白として, 3つの蛋白, オクタマー結合蛋白, ヒトH鎖エンハンサーモチーフ HE1, HE2 に結合する蛋白を精製した。

a. シスに働く DNA 領域に結合する蛋白の精製

我々は *In vivo* assay 法, 即ち, 赤血球ゴーストと細胞融合法を応用したマイクロインジェクション法を用いて, トランスアクティング蛋白の検出, 同定を試みてきた。ヒト γ 鎖遺伝子をマウス繊維芽細胞 (L細胞) に導入しても γ 鎖遺伝子の発現は起こらない。この細胞に, マウスB細胞株あるいは骨髓腫細胞の核蛋白をマイクロインジェクションすると γ 鎖遺伝子の発現が誘導される。我々はこのシステムを用いて, 既に, H鎖エンハンサーに結合するB細胞特異的な結合蛋白の存在を証明した。更にゲルシフト法と, DNaseIフットプリント法により, B細胞特異的な結合蛋白は, H鎖エンハンサーのHE2領域内にあるDNA塩基配列 TATTTTAGGAAGCAAAA に結合することを示した。マウス骨髓腫細胞株 NS-1 から核蛋白を調製し, ヘパリンセファロースカラム, 合成オリゴヌクレオチドカラムを通して精製した結果, HE2の上記DNA塩基配列に結合する蛋白として96kdを同定した。この96kd蛋白はマイクロインジェクションによって, エンハンサー活性を有することが明らかにされると共に, そのアミノ酸塩基配列も決定された。他のB細胞特異的シスエレメント, オクタマー塩基配列が免疫グロブリンV鎖遺伝子のプロモーター領域に存在することが知られているが, このオクタマー ATGCAAAT に結合する新たな蛋白をヒトB細胞株から精製した。塩基配列特異的なDNAカラムから単離したこの

蛋白の分子量は74kdであり、今まで単離された他のオクタマー結合蛋白と異なるものであることが明らかになった。

b. レプレッサー機構

先に記述したヒト γ 鎖遺伝子を導入したマウスL細胞を、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドで短時間処理すると γ 鎖の発現が誘導されることを見出し、レプレッサーの存在を予期した。これはシクロヘキシミドによるmRNAの安定化によるものではなく、実際の遺伝子の発現誘導であることをrun-offアッセイによって確かめた。また、T細胞に導入した γ 鎖遺伝子についても同様の現象が見い出され、免疫グロブリン遺伝子を発現しない細胞中にはその発現を抑制するレプレッサー因子が存在し、その因子は γ 鎖遺伝子のプロモーターおよびエンハンサーに働いていることが示された。

B. 組み換えDNA法によるキメラ抗体作製と応用

我々はヒト白血球リンパ腫共通抗原を認識している抗体を産出するマウスハイブリドーマNL-1から、その V_H, κ 遺伝子をクローニングし、ヒト $C\gamma, C\chi$ 遺伝子と結合し、ヒト-マウスキメラ抗体遺伝子を作成した。またエンハンサーとして、ヒトH鎖エンハンサーを使用し、H鎖、V-C間、 κ 鎖の5'上流に挿入した。このキメラ遺伝子をマウス骨髄腫細胞株X63-653に導入し、安定形質転換体を得た。得られた細胞はH2 L2型の抗体を分泌し、その結合能(親和性)はもとのハイブリドーマ由来のモノクロナル抗体と差がなかった。in vitroにおいてヒトのエフェクター細胞を使った場合、マウスの約2倍の抗腫瘍活性が得られ、キメラ抗体が抗ヒト腫瘍抗体として有用であることが示された。このキメラ抗体の活性をin vivoアッセイで検討した。担癌ヌードマウスを作成し、キメラ抗体を注入したところ、抗原であるcALLA陽性腫瘍に対して強い抗腫瘍活性を示した。また放射性ラベルした抗体はcALLA陽性腫瘍に特異的に結合することから、イメージングによる癌診断にも有用であった。

C. 未分化B細胞特異的発現をする遺伝子VpreB, $\lambda 5$

マウスpreB細胞株70Z/3から3つの遺伝子VpreB1, VpreB2, $\lambda 5$ がクローニングされた。これらの遺伝子はその塩基配列からそれぞれVpreBは $V\lambda$ に、 $\lambda 5$ は $J\lambda-C\lambda$ とよく似ており、免疫グロブリン λ 鎖のファミリーであった。マウス第16染色体に位置し、 λ 鎖の近傍にあると思われた。この3つの遺伝子は未分化B細胞proB細胞、preB細胞特異的な発現をし、この発現メカニズムをCAT(クロラムフェニコールトランスフェラーゼ)アッセイで検定したところ、VpreB1遺伝子のプロモーター、及びVpreB1, $\lambda 5$ 間にあるエンハンサーがpreB細胞特異的発現に寄与するシスエレメントとして検出された。VpreB, $\lambda 5$ はその蛋白として14kd, 20kdをコードし、この2つの蛋白が互いにassociateし免疫グロブリン μ 鎖と結合し、preB細胞の表面に発現されていることが考えられた。

原著論文 (1987年 1988年)

1. Nuclear factors binding to the human immunoglobulin heavy - chain gene enhancer. H.Maeda, K.Araki, D.Kitamura, J.Wang and T.Watanabe. Nucleic Acids Res. 15, 2851 - 2869 (1987)
2. Purification of an octamer sequence (ATGCAAAT) - binding protein from human B cells. J.Wang, K.Nishiyama, K.Araki, D.Kitamura and T.Watanabe. Nucleic Acids Res. 15, 10105 - 10116 (1987)
3. Purification of a nuclear trans - acting factor involved in the regulated transcription of a human immunoglobulin heavy chain gene. K.Araki, H.Maeda, J.Wang, D.Kitamura and T.Watanabe. Cell 53, 723 - 730 (1988)
4. Regulation of immunoglobulin gene transcription by labile repressor factor (s). D. Kitamura, H.Maeda, K.Araki, A.Kudo and T.Watanabe. Eur. J.Immunol. 17, 1249 - 1256 (1987).
5. Recombinant human - mouse chimeric monoclonal antibody specific for common acute lymphocytic leukemia antigen. Y.Nishimura, M.Yokoyama, K.Araki, R.Ueda, A.Kudo and T.Watanabe. Cancer Res. 47, 999 - 1005 (1987)。
6. Suppression of tumor growth by in vivo administration of a recombinant human - mouse chimeric monoclonal antibody. M.Yokoyama, Y.Nishimura and T.Watanabe. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 78, 1251 - 1257 (1987)
7. Organization of the murine Ig - related λ 5 gene transcribed selectively in pre - B lymphocytes A.Kudo, N.Sakaguchi and F.Melchers. EMBO J. 6, 103 - 107 (1987)
8. A second gene VpreB in the λ 5 locus of the mouse which appears to be selectively expressed in pre - B lymphocytes. A.Kudo and F.Melchers EMBO J. 6, 2267 - 2272 (1987)
9. Localization of the murine λ 5 gene on chromosome 16 A.Kudo, D.Pravtcheva, N.Sakaguchi, F.H.Ruddle and F.Melchers. Genomics 1, 277 - 279 (1987)
10. Structure and pre B lymphocyte - restricted expression of the VpreB gene in humans, and conservation of its structure in other mammalian species. S.R.Bauer. A.Kudo and F.Melchers EMBO J. 7, 111 - 116 (1988)
11. The cis - acting regulatory elements of immunoglobulin heavy chain gene involved

- in enhanced immunoglobulin production after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. M.Motomura, D.Kitamura, K.Araki, H.Maeda and T.Watanabe. *Mol. Immunol.* 24, 759 – 764 (1987)
12. Production of the human immunoglobulin γ_1 , chain constant region polypeptide in *Escherichia coli*. S.Nakamura and T.Masegi, K.Kitai, A.Kudo, T.Watanabe and Y. Ichikawa *J.Biotechnology* 8, 141 – 148 (1988)
 13. Trans – acting regulatory factors for T cell antigen receptor α – and γ – chain gene expression. K.Maeda, M.Nakashima, S.Komori and T.Watanabe. *J.Immunol.* 140, 2796 – 2801 (1988)
 14. Complementary DNA for a human subgroup IV immunoglobulin – λ chain. N. Yamasaki, S. Komori, T. Watanabe. *Mol. Immunol.* 24, 981 – 985 (1987).
 15. Production of a heavy – chain class – switched variants of human monoclonal antibody by recombinant DNA technique. S. Komori, M. Shigeta, S. Isojima, and T. Watanabe. *Clin. Exp. Immunol.* 71, 508 – 516 (1988)
 16. Sequence analysis of a cDNA clone of a gene encoding a component of a putative PC – specific T suppressor factor. N. Yamasaki, K. Sugimura, M.Hiida, T. Naito, T. Watanabe. *Eur. J. Immunol.* 17, 247 – 253 (1987)