

[原著]

I-J 遺伝子産物の免疫学的多様性

武 井 泉*

(昭和57年11月6日受付)

要 旨

抗体産生を抑制的に調節する T リンパ球間には機能的多様性が存在する。それらの機能を媒介する抑制 T 細胞因子を構成する I-J 遺伝子産物の構造を、機能との関連において解析した。

まず、細胞融合法を用いて I-J 遺伝子表現のある抑制 T 細胞株を作製し、クローン化した結果、機能的に異なる 3 種類の T 細胞株を得た。

1) 抗原特異的抑制機能を持ち、これが H-2 barrier を越えては作用しない抑制 T 細胞株 (Ts₁)。

2) 抗原非特異的で、H-2 barrier を越えて作用する抑制 T 細胞株 (Ts₂)。

3) Ts₁ が産生する抑制因子 (TsF₁) の受容基を持ち、TsF₁ によって活性化される抑制 T 細胞株 (Ts₃) である。

これら I-J 表現のある抑制 T 細胞株を用いて、抗 I-J^b 抗血清 B10. A (5R) anti-B10. A (3R) を吸収し、I-J 分子の異同を調べた。吸収後の抗体活性は、T 細胞株を標的とする細胞障害性及び抑制因子を吸収する能力を調べることで検討した。

その結果、細胞表面、及び抑制因子に表現される I-J 遺伝子産物は、Ts₁ と Ts₂ とでは異なる I-J 分子で構成され、Ts₃ は、血清学的に両方の抗原性を持つことがわかった。

このことから、I-J 亜領域の遺伝子産物には少くとも 2 つの構造的に異った分子が存在し、それぞれは、相異なる機能を mediate する抑制 T 細胞及び抑制因子に表現されていることが明らかとなった。

Key words: I-J 遺伝子産物, 抑制性 T 細胞, 多様性

略語一覧: HGPR: Hypoxanthine, Guanine, Phosphorybosyl, Transferase,

HAT: 1×10^{-4} mM Hypoxanthine, 4×10^{-4} mM Aminopterin,

1.6×10^{-2} mM Thymidine, FCS: Fetal Calf Serum,

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter, D'MEM: Dulbecco

Modified Eagle Medium, PMSF: Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride,

PBS: Phosphate Buffered Saline, PFC: Plaque Forming Cell.

序 文

I-J 遺伝子産物は、抗体産生をネガティブに調節する抑制 T 細胞の細胞表面、及び、その機能分子である抑制因子に表現される抗原として報告された^{1,2)}。同時に、これをコードする Ia-4 遺伝子座の存在により、I-J 亜領域が、マウス主要組織適合抗原遺伝子複合体内に決定

された²⁾。その後、この I-J 亜領域にマップされる遺伝子の産物は、抑制 T 細胞のみならず、それらと機能を異にする細胞、とくにヘルパー T 細胞の一部³⁾ や、抗体産生系の accessory 細胞⁴⁾ 等にもみいだされ、これら、I-J 亜領域の遺伝子産物間の異同が注目されてきた。一方、抑制 T 細胞の産生する抑制因子は、この I-J 遺伝子産物と、抗原結合分子の二分子から構成され、抑制機能を発

* 千葉大学医学部附属環境疫学研究施設免疫研究部

Izumi TAKEI: Heterogeneity of I-J Subregion Gene Products.

Department of Immunology, School of Medicine, Chiba University, Chiba, 280.

Received for publication, November 6, 1982.

現するためには、両分子が、同時に存在することが必須で^{8,9}、この時、I-J 遺伝子産物は、抑制性を決める機能分子として作用することも明らかにされている⁷。さらに、この抑制現象が、最終的に発現されるにいたるまでには、機能分担するいくつかの抑制T細胞亜群の介在が必要であり、これらの抑制T細胞は、いずれも I-J 遺伝子産物を有し、この I-J 分子を介して、細胞間相互作用が成立していることも明らかにされている^{8,9,10}。これらのことは、抗体産生の抑制にかかわるT細胞亜群の間でも、それぞれで、異った I-J 遺伝子産物が表現され、それら I-J 分子の違いが細胞の機能を決定している可能性を示唆している。機能を異にする種々のT細胞に表現される I-J 遺伝子産物の構造上の相異及び、機能との相関の有無を解析するため細胞融合法¹¹を用いて、I-J 遺伝子産物を表現する T細胞株を作製し、それらに表現される I-J 遺伝子産物の、多様性の存在と、その生物学的な意義を検討した。

実験方法

1) 動物

B10.A(5R) 及び B10.A(3R) マウスは、我々の実験動物施設で飼育したものを使用した。C57BL/6 及び C3H マウスは、静岡実験動物センター、大村実験動物から、それぞれ購入した。

2) 抗原、アジュバント

KLH (keyhole limpet hemocyanin) は、Calbiochem-Behling 社より購入した。DNP₇₇₀・KLH (dinitro phenylated KLH) は Eisen らの方法¹²に従い、アルカリ条件下で、Sodium・2・4・dinitrobenzensulfonate と反応させ作製した。アジュバントとして用いた BPV (百日咳ワクチン) は、千葉血清研究所より購入した。

3) I-J 遺伝子産物を持つ T細胞融合株の作製

I-J 遺伝子産物を持つ T細胞融合株の作製については別論文^{13,14}にあるが、簡単にまとめると、次のようにして確立した。

KLH 200 μ g を、C57BL/6 マウスに、10日間隔で2度免疫すると、その脾細胞中に、KLH 特異的抑制 T細胞が誘導される¹⁵。この脾細胞中の T細胞画分と、HGPRT を欠損し、Aminopterin に感受性のある胸腺腫 BW 5147 (AKR マウス由来) をポリエチレングリコールの存在下で細胞融合させた。融合細胞は、HAT と FCS を加えた RPMI 1640 培養液 (Gibco 社) にて培養、選別した。I-J 遺伝子産物を有する融合細胞は、抗 I-J^b 抗体 (B10.A(5R) anti B10.A(3R)) を用いて蛍光染色後、FACS を用いて分離し、限界希釈法にて

クローン化した。確立されたT細胞融合株は、抗体産生に及ぼす機能により、抗原特異的抑制T細胞 (Ts₁)¹⁴、それ自身は機能を示さないが、Ts₁ により活性化される acceptor T細胞¹⁶、及び、抗原非特異的抑制T細胞¹⁷の3種類に分類された¹⁸ (Table 1)。

Table 1. I-J⁺ suppressor T cell hybridomas were classified into 3 groups with different functions.

activity	cell line
antigen specific	34s-18
suppressor T (Ts ₁)	34s-704 1L1
antigen non-specific	34s-44
suppressor T (Ts ₂)	34s-15
acceptor T cell (Ts ₃)	34s-281 1L5

4) 抗 I-J^b 抗血清の作製

抗 I-J^b 抗血清は、遺伝的に I-J 亜領域のみを異にすると考えられている B10.A(3R) と B10.A(5R) のマウスの組み合わせにより作製した。方法は、1 $\times$ 10⁷個の B10.A(3R) マウスの脾及び胸腺細胞をマイトマイシン処理後、B10.A(5R) マウスに毎週1回、8回以上静注して免疫したのち、部分採血した血清をプール後、非特異的抗体 (抗ウイルス抗体など) を取り除くために、I-J 遺伝子産物をもたない BW 5147 細胞で吸収した。

5) 抗 I-J^b 抗血清の特異性の検討

BW5147 細胞で吸収後の抗血清の I-J^b 特異性は、さらにこの抗血清を、I-J ハプロタイプ異なる種々のマウス (C57BL/6, C3H, B10.A(3R), B10.A(5R)) の脾細胞と反応させ、吸収後の上清で I-J 陽性の融合細胞を標的とした細胞障害活性試験を行い確認した。すなわち、この抗血清300 μ l を4 $\times$ 10⁶個の脾細胞と一緒に氷上で4時間反応させたのちの上清を用いて細胞障害試験を行った。

6) 細胞障害活性試験

4 $\times$ 10⁴個の融合細胞を、20 μ l の D'MEM 培養液 (1% FCS 添加) に浮遊させ、これと希釈した抗血清20 μ l とを室温にて30分間反応させたのち、新鮮な培養液にて洗浄、さらに、補体として8倍希釈された仔ウサギ血清20 μ l を加え、37°C にて40分間反応させた。反応終了後、トリパンブルーにて死細胞を染色、光学顕微鏡下で、生細胞、死細胞の数をかぞえた。抗血清のかわりに培養液を用いたものをコントロールとし、その死細胞数で補正した値を、抗体による細胞障害として、以下の式より算出した。

$$\% \text{ killing} = \frac{\text{死細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

抗体による細胞障害＝

$$\frac{\% \text{ killing} - \% \text{ killing (コントロール)}}{100 - \% \text{ killing (コントロール)}} \times 100 (\%)$$

7) 抗 I-J^b 抗体アフィニティカラムの作製

抗 I-J^b 抗血清 1 ml から 50% の硫酸アンモニウムで沈澱して得た γ グロブリン分画を, Axen らの方法¹⁸⁾ に従って, 1 ml のセファロース 4 B (Pharmacia Fine Chemical 社) に結合させ, アフィニティカラムを作製した。

8) 抗原特異的及び非特異的モノクロナル抑制因子の調製

融合細胞を, 凍結融解をくりかえして破碎後, 高速遠心して得た細胞抽出液を抑制因子として用いた。抽出液には, 蛋白分解酵素阻害剤である PMSF (Sigma 社) を, 0.5mM の濃度となる様に加え, 使用するまで -80°C に保存した。

9) 抑制因子の抗 I-J^b アフィニティカラムでの吸収

融合細胞の 2×10^6 個に相等する細胞抽出液を上述のカラムと, 4°C にて 1 時間反応させた。0.1 MPBS pH 7.2 2 ml にてカラムと反応しない分画を漏出させたあと, さらに PBS 10 ml にて洗浄後, 0.175M グリシン塩酸緩衝液 pH 3.2 を用いて溶出させた。溶出液は, 1 M NaHCO₃ にて直ちに中和した後, 漏出液とも PBS に透析し, セファデックス G200 粉末を用いて脱水濃縮した。

10) 抑制因子の活性の検出

抑制因子の抗体産生に対する抑制活性は, それらを, *in vitro* の二次免疫応答系に加えて調べた。すなわち, 4 週前に DNP・KLH 100 μg と B.P.V. 1×10^6 個にて免疫した C57BL/6 マウスの脾細胞 4×10^6 個/ml を, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DNP・KLH と共に, Mischell Dutton 系で培養し, 培養開始時に, 抑制因子を加えた。抑制活性は, 培養 5 日目に, DNP を結合したヒツジ赤血球を用いて, 抗 DNP・IgG プラーク形成細胞 (PFC) 数を調べることににより検討した¹⁹⁾。

結 果

1) 抗 I-J^b 抗血清の特異性

マウスの血清中には, 種々の自然抗体が含まれており, さらにリンパ系細胞を抗原として免疫した場合には, 細胞の表現する白血病ウイルス抗原に対する抗体価が上昇することが知られている²⁰⁾。そこで, この可能性を除くために, まず抗 I-J^b 抗血清 (B10.A(5R) anti B10.A(3R)) を標的に用いる融合細胞の親細胞である AKR マウス由来の BW5147 細胞で吸収し, これとは

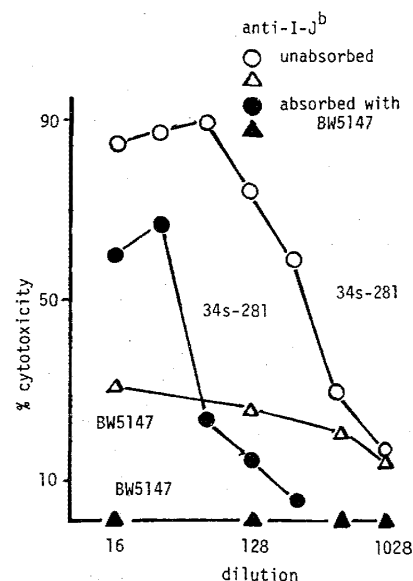


Fig. 1. Absorption of non-specific activities in anti-I-J^b antiserum (B10.A (5R) anti-B10.A (3R)).

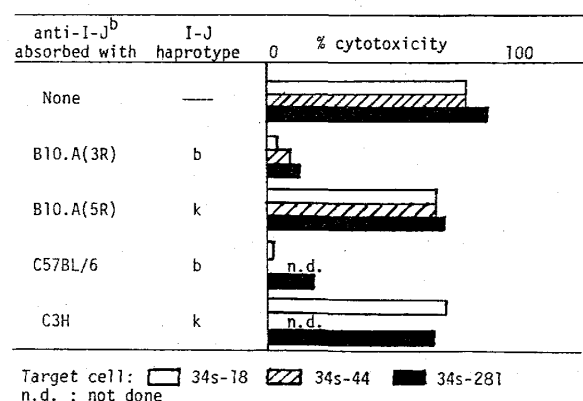


Fig. 2. Specificity of anti-I-J^b antiserum and selective expression of I-J subregion gene products on T cell hybridomas. Absorption of anti-I-J^b antiserum with I-J^b haplotype cell populations (C57BL/6 or B10.A (3R) spleen cells) removed antibody activity against T cell hybridomas, but not with I-J^k haplotype cell populations.

全く反応しない抗血清を作製した (Fig. 1)。この抗血清が, I-J^b 特異的であることは, I-J 遺伝子のハプロタイプの異なるマウスの脾細胞でさらに吸収することにより調べた。結果は Fig. 2 に示した。すなわち, 抗原として用いた B10.A (3R) や, これと同じ I-J^b のハプロタイプを持つ C57BL/6 マウスの脾細胞で抗 I-J^b 抗血清を吸収すると, I-J^b 遺伝子産物を表現する融合細胞に対する障害活性は吸収された。しかし, B10.A (3R) マウスとは遺伝学的に I-J ハプロタイプのみ異なる

B10.A(5R) マウスや、これと同じ I-J^k ハプロタイプを持つ C3H マウスの脾細胞では、抗体活性は吸収されなかった。このことは、この抗血清が、I-J^b に特異的な抗体活性をもつことを示している。同時に、この実験結果は、融合細胞に I-J^b 遺伝子産物が選択的に表現されていることをうらづけている。そこで、この抗血清を抗 I-J^b 抗血清として用いこれら融合細胞上の I-J 分子の多様性の検討を行った。

2) 抑制T細胞に表現される I-J 遺伝子産物の多様性
機能の異なるそれぞれのT細胞融合株上に表現される I-J 遺伝子産物の多様性を検討するために、抗 I-J^b 抗血清を、それぞれの T 細胞株 $1 \sim 7 \times 10^7$ と氷上に1時間反応させた。この操作を8~9回くりかえすことにより、各々の細胞株が表現する I-J 遺伝子産物に対する抗体活性を完全に吸収した。吸収後の抗血清中の抗体活

性の有無とその特異性を、それぞれの融合細胞を標的とした細胞障害活性試験にて調べた。

Fig. 3-a, Fig. 3-b に示すように、抗原特異的抑制機能をもつ細胞株 (34S-704 あるいは 34S-18) で吸収した場合、同一機能をもつ細胞株 (34S-704, 34S-18, IL1) に対する細胞障害活性は失われたが、機能を異にした抗原非特異的抑制機能をもつ細胞株 (34S-44, 34S-15) あるいは acceptor T 細胞株 (34S-281, IL5) に対する細胞障害活性は、そこなわれなかった。同様の結果は、抗 I-J^b 血清を、抗原非特異的抑制機能をもつ細胞株 (34S-44 あるいは 34S-15) で吸収した場合にも得られた (Fig. 4-a, Fig. 4-b)。すなわち、34S-44 あるいは 34S-15 で完全に吸収したあとにも、抗原特異的抑制T細胞 (34S-704, 34S-18, IL1) あるいは acceptor T細胞 (34S-281,

Target cell	function	% cytotoxicity
34s-704	antigen specific	0
34s-44	antigen non-specific	32
34s-281	acceptor	50

Fig. 3-a. Cytotoxic activity of anti-I-J^b antiserum absorbed with antigen-specific Ts hybridoma (34S-704). The antiserum absorbed with 34S-704, which did not react to itself, still remained cytotoxic activity against non-specific Ts or acceptor hybridoma.

Target cell	function	% cytotoxicity
34s-18	antigen specific	0
34s-704	antigen specific	0
IL1	antigen specific	0
34s-15	antigen non-specific	31
IL5	acceptor	49

Fig. 3-b. Cytotoxic activity of anti-I-J^b antiserum absorbed with antigen-specific Ts hybridoma (34S-18). The antiserum absorbed with antigen-specific Ts (34S-18), which still remained cytotoxic activity against the hybridomas with the different functions, did react to the hybridomas with the same function (34S-704, IL1).

Target cell	function	% cytotoxicity
34s-704	antigen specific	40
34s-44	antigen non-specific	0
34s-281	acceptor	57

Fig. 4-a. Cytotoxic activity of anti-I-J^b antiserum absorbed with antigen-nonspecific Ts hybridoma (34S-44). The antiserum absorbed with 34S-44, which did not react to itself, still remained cytotoxic activity against specific Ts or acceptor T cell hybridoma.

Target cell	function	% cytotoxicity
34s-18	antigen specific	38
IL1	antigen specific	53
34s-15	antigen non-specific	0
34s-44	antigen non-specific	0
IL5	acceptor	32

Fig. 4-b. Cytotoxic activity of anti-I-J^b antiserum absorbed with antigen-nonspecific Ts hybridoma (34S-15). The antiserum absorbed with antigen-nonspecific Ts (34S-15), which still remained cytotoxic activity against the hybridomas with the different functions, did not react to the hybridoma with the same function (34S-44).

1L5) に対する活性は残った。これらの事実、異なる機能をもつ2群の抑制T細胞に表現される I-J 遺伝子産物に、異った抗原決定基が存在すること、さらに、これらの I-J 分子が異った分子であることを強く示唆する。

ところが、上述のいずれの実験でも、acceptor T 細胞に対する障害活性は残った。このことは、acceptor T 細胞が両方の抗原決定基を同時にもつか、あるいは、いずれとも異なる第3の抗原決定基をもつ分子によって構成される可能を示唆する。そこで、この acceptor T 細胞株で抗 I-J^b 血清を吸収した後、残った障害活性について調べた。結果は Fig. 5-a に示されるように、acceptor T 細胞 (34S-281) で吸収すると、34S-704, 34S-44のいずれの細胞株とも反応しなくなる。したがって、34S-281 の細胞表面上の I-J 遺伝子産物は、抗原特異的、及び非特異的の活性を持つT細胞上の I-J 遺伝子産物の抗原決定基のいずれも持っていることになる。このことはまた、抗 I-J^b 血清を、34S-704 と 34S-44 の両方で吸収すると、34S-281 ととも反応しなくなることから支持された (Fig. 5-b)。

Target cell	function	% cytotoxicity
34s-704	antigen specific	0
34s-44	antigen non-specific	0
34s-281	acceptor	0

Fig. 5-a. Cytotoxic activity of anti-I-J^b antiserum absorbed with acceptor T cell hybridoma (34S-281). Absorption of anti-I-J^b antiserum with acceptor T cell hybridoma removed antibody activity against both antigen-specific Ts hybridoma and non-specific Ts hybridoma.

Target cell	function	% cytotoxicity
34s-704	antigen specific	0
34s-44	antigen non-specific	0
34s-281	acceptor	0

Fig. 5-b. Cytotoxic activity of anti-I-J^b antiserum absorbed with both antigen-specific Ts hybridoma and non-specific Ts hybridoma (34S-704, 34S-44). The absorbed anti-I-J^b antiserum lost antibody activity against acceptor T cell hybridoma.

これらの事実から、機能的に異なる抑制性T細胞亜群に表現される I-J 遺伝子産物に血清学的な多様性があり、それが機能と関連していることが強く示唆された。

3) 抑制因子に表現される I-J 遺伝子産物の多様性

それぞれの抑制T細胞の機能伝達物質としての抑制因子にも、I-J 遺伝子産物が表現されていることが明らかとなっている^{14,17)}。そこで、細胞表面で血清学的に示された I-J 遺伝子産物の多様性が、抑制因子とも反映されているか否かを、抗 I-J^b 抗体カラムを用いた抑制因子の活性吸収能で調べた。各々の T 細胞株 (34S-704, 34S-44) で吸収することにより、もはや吸収に用いた T 細胞株とは反応しない抗 I-J^b 抗血清を用いてアフィニティカラムを作製した。これらのカラムに、抗原特異的抑制因子 (34S-704 由来) あるいは抗原非特異的抑制因子 (34S-44 由来) を反応させたのち、漏出液と、酸による溶出液を得た。おのおのを、in vitro 2次抗体産生系に加えて、いずれに抑制活性が出現するかを調べた。その結果は、Fig. 6 に示すように、抗原特異的抑制T細胞

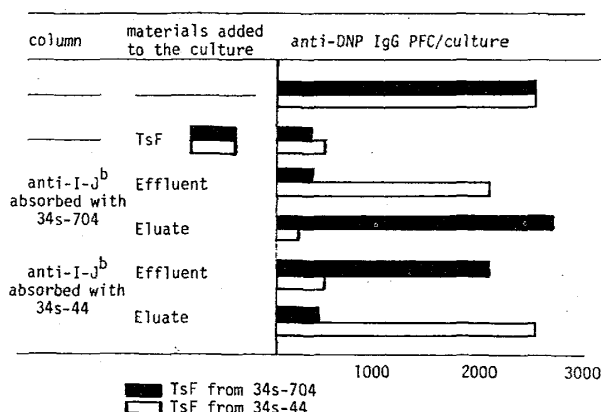


Fig. 6. Distinct I-J molecules expressed on suppressor T cell factors with different functions. The absorbed anti-I-J^b serum with antigen-specific Ts hybridoma (34S-704), which did not react to the antigen-specific suppressor factor derived from 34S-704, still remained antibody activity against the antigen-non-specific suppressor factor derived from 34S-44. A similar result was obtained in the case of absorption with antigen-non-specific Ts hybridoma (34S-44).

(34S-704) で吸収した抗 I-J^b 抗血清は、抗原特異的抑制活性を示す 34S-704 由来の抑制因子を吸収する能力は、もはや失っているにもかかわらず、抗原非特異的抑制因子 (34S-44 由来) の抑制活性を吸収することができた。このことは、抑制因子を吸収したカラムから抑制活

性が溶出できたことからもうけられた。同様に、抗原非特異的抑制 T 細胞株 (34S-44) で吸収した抗 I-J^b 抗血清は、抗原特異的抑制因子 (34S-704 由来) の抑制活性のみを吸収することができた。

これらの事実は、抑制 T 細胞表面と同様、その抑制活性を媒介する抑制因子にも、機能と結びついた I-J 遺伝子産物の多様性が存在することを示す。

考 察

抗体産生の抑制が、マウス主要組織適合抗原遺伝子複合体内の I-J 亜領域遺伝子産物を表現する抑制 T 細胞と、その抑制因子で調節されていることが知られている^{1,2,10,21)}。

Taniguchi ら²⁾の詳細な解析によれば、抑制機構には少なくとも3種類の I-J 陽性抑制 T 細胞が関与することが確認されている。すなわち、抗原で誘導された抑制 T 細胞は、I-J 遺伝子産物をもつ抑制因子 (TsF₁) を産生し、この TsF₁ が第2の acceptor T 細胞に働き、次の抑制因子 (FsF₂) を産生させる。第2の抑制因子がさらに別の I-J 陽性抑制 T 細胞を誘導し、最終的に抗体産生の抑制がおこるとされる。acceptor T 細胞上にある TsF₁ に対する受容基にも、I-J 遺伝子産物が存在することは、抗 I-J 抗体を acceptor T 細胞に反応させることで、この細胞の活性化が阻止されることから示されている²²⁾。

これらの知見は、I-J 遺伝子産物が、抗体産生の抑制機構における細胞間相互作用に重要な役割を演じていることを示唆する。この意味において、機能を異にする I-J 陽性の T 細胞株の確立は、I-J 遺伝子産物の機能的、

及び構造上の解析に必須である。

実験に用いた I-J 陽性 T 融合細胞株は、機能的に、3 種類に分類される^{13,14,16,17)}。1) 抗原特異性と I-J 亜領域に関する遺伝的拘束性を示す抑制 T 細胞株、2) 抗原非特異的にかつ I-J 亜領域の遺伝的拘束を越えて作用する抑制 T 細胞株、3) それ自身では活性を示さないが、抗原特異的抑制因子により活性化される acceptor T 細胞株である。いずれの抑制因子もまた I-J 遺伝子産物を表現しており、抑制 T 細胞の機能的な違いは、I-J 遺伝子産物の構造上の相異を反映している可能性が考えられた。

この可能性を明らかにするために行った実験結果は、Table 2 にまとめた。

抗原特異的抑制 T 細胞株の1つで抗 I-J^b 抗血清を吸収すると、もはや同様の抑制機能をもつ他の細胞株に対する障害活性は失われるが、異った機能をもつ抗原非特異的抑制 T 細胞株、あるいは acceptor T 細胞株に対する障害活性は残った。逆に、抗原非特異的抑制 T 細胞株の1つで抗 I-J^b 抗血清を吸収した場合にも、同様の結果が得られた。さらに、Fig. 6 に示すように、これらの抑制活性を媒介する抑制因子についての検討でも、抗原特異的抑制因子と、抗原非特異的抑制因子に表現される I-J 遺伝子産物に相異があることがわかった。

これらの事実から、I-J 亜領域がさらにいくつかの領域に分けられ、各々に機能の異なる因子がコードされている可能性が示唆される。一方、Cullen ら²³⁾により、Ia 分子について報告されたように、I-J 分子が DNA から翻訳合成されてからの glycosylation, phosphorylation の過程の相違による可能性もある。どちらによるも

Table 2. Two distinct antigenic determinants on functionally different hybridomas were detected by anti-I-J^b antiserum (B10. A (5R) anti-B10. A (3R)). I-J product on the T cell hybridoma with antigen-specific suppression activity was different from that on the T cell hybridoma with non-specific suppression. Acceptor T cell hybridoma had I-J determinants, which were found on both antigen specific and non-specific Ts hybridomas.

Target cell lines		cytotoxicity of absorbed anti-I-J ^b with		
		antigen specific Ts	antigen non-specific Ts	acceptor T
antigen specific suppressor T	34s-704	—	+	—
	24s-18	—	+	—
	1L1	—	+	—
antigen non-specific suppressor T	34s-44	+	—	—
	34s-15	+	—	—
acceptor T	34s-281	+	+	—
	1L1	+	+	—

のかは、これら因子の化学的、あるいは遺伝子レベルでの解析をまたねばならないが、いずれにせよ、機能を異にする抑制T細胞に表現される I-J 遺伝子産物に、抗原性の相異がみいだされたことは、この構造上の差異が機能上のそれを反映しているものと解釈され、作用様式の異なる2種の抑制因子の存在理由^{13,14,17)}を説明するのにも都合がよい。

I-J 亜領域の多様性は、Ochi ら²⁴⁾によっても、別の実験結果から示されている。彼らは、Lyt 抗原系の表現の違いを利用して、I-J 陽性の抑制T細胞と、I-J 陽性のヘルパーT細胞を分けた。各々の細胞で、抗 I-J^k 抗血清 (B10.A(3R) anti B10.A(5R)) を吸収し、残った抗体活性の特異性について調べた。そして、この抗 I-J^k 抗血清中には、抑制T細胞上の I-J 遺伝子産物と、ヘルパーT細胞上の I-J 遺伝子産物、それぞれに表現される異なる抗原性を認識する抗体が含まれていることを示した。

さらに、I-J 亜領域の遺伝子産物は、Con A に反応するT細胞や、抗原提供マクロファージの細胞表面にも表現されていることが、Frelinger ら²⁵⁾や、Niederhuber ら^{4,26)}によって報告されている。彼らの報告では、抑制T細胞上の I-J 遺伝子産物との異同についてはふれていないが、Murphy ら²⁷⁾は、抑制T細胞上の I-J 遺伝子産物と、抗体産生に関する accessory 細胞上の I-J 遺伝子産物とが、異った抗原性を持つことを報告している。

これらの事実からも、I-J 遺伝子産物に多様性が存在し、それが、免疫相当細胞の機能上の差異、うらがえせば、細胞間相互作用において、相手となる細胞を認識するための構造を反映している可能性が示唆される。

その意味では、acceptor T 細胞上の I-J 遺伝子産物の解析が、我々に、I-J 分子間の相互作用について、かなりの情報を与えてくれるものと期待される。acceptor T 細胞株 (34S-281, 1L5) は、前述の2種類の抑制T細胞に表現される I-J 遺伝子産物上の抗原性を同時に表現していた (Fig. 6-a, Fig. 6-b)。この acceptor T 細胞株は、抗原特異的抑制T細胞株由来の抑制因子で活性化され、やはり、I-J 遺伝子産物を有する新たな抑制因子を産生することが最近わかった^{16,28,29)}。抗 I-J^b 抗体によっても活性化されることから、この acceptor T 細胞の受容基に I-J 遺伝子産物が表現されていることは明らかである。今回の解析では、活性化される前の休止期の acceptor T 細胞株を用いての結果であるが、活性化後、I-J 遺伝子産物の表現が、どう変わるかは興味のあるところである。acceptor T 細胞が、抗原特異的抑制

T細胞、あるいは抗原非特異的抑制T細胞、それぞれが I-J 遺伝子産物上に示す異った抗原性を、同時に表現していることの解釈は、現時点では難しい。しかし、抗原特異的抑制因子上の I-J 分子と、acceptor T 細胞上で、これに対する受容基を構成する I-J 分子とは、相互に作用しあう I-J 亜領域の遺伝子産物である。また、両者を表現するT細胞は、いずれもモノクローナルな細胞株であり、均一な物質として化学的に、あるいは遺伝子レベルで解析することは比較的容易である。それにより、一種の自己認識ともいえる I-J 遺伝子産物間の相互作用を、分子レベルで構造的にとらえることが可能である。これらの結果を演繹すれば、今回の実験で得た I-J 遺伝子産物の多様性と、その関係が、より明確なものになると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導、御援助を賜りました千葉大学医学部環境疫学研究施設免疫研究部谷口克教授に深謝致します。本論文は審査学位論文である。

SUMMARY

Heterogeneity of the I-J encoded products was investigated on I-J⁺ T-cell hybridomas with different functional activities. Functional assays of the factors derived from several hybrid cell lines enabled the cell lines to be classified into 3 groups with different suppressive activities; a) hybridomas with antigen-specific, I-J restricted suppression. b) hybridomas with antigen non-specific, I-J non-restricted suppression. c) hybridomas with acceptor site for antigen-specific suppressor factor. Suppressor factors from both specific and non-specific Ts hybridomas also possessed I-J encoded determinants. Structural differences of I-J gene products among the hybridomas were studied by using the absorption of anti-I-J^b antiserum with functionally different I-J⁺ hybridomas. Different determinants defined by anti-I-J^b antiserum were found to be expressed on hybridomas with different functional properties. Serological analyses of the I-J bearing factors have also shown that the I-J determinant on the antigen-specific factor is distinct from that on the antigen-nonspecific factor. It is, therefore, suggested that there are at least two structurally different I-J molecules defined by

the alloantisera. As the specific factor has the H-2 restriction specificity, while the non-specific factor acts across the H-2 barrier, the structural differences of the I-J determinants on the two distinct factors may reflect the functional differences.

文 献

- 1) Tada, T., Taniguchi, M. and David, C. S.: Properties of the antigen-specific suppressive T-cell factor in the regulation of antibody synthesis of the mouse. IV. Special subregion assignment of the gene (s) that codes for the suppressive T cell factor in the H-2 histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* **144**, 713-725, 1976.
- 2) Murphy, D. B., Herzenberg, L. A., Okumura, K., Herzenberg, L. A. and McDevitt, H. O.: A new I subregion (I-J) marked by a locus (Ia-4) controlling surface determinants on suppressor T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **144**, 699-712, 1976.
- 3) Tada, T., Takemori, T., Okumura, K., Nataka, M. and Tokuhisa, T.: Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia⁻ and Ia⁺ helper T cells. *J. Exp. Med.* **147**, 446-458, 1978.
- 4) Niederhuber, J. E., Allen, P. and Mayo, L.: The expression of Ia antigen determinants on macrophages required for the in vitro antibody response. *J. Immunol.* **122**, 1342-1349, 1979.
- 5) Taniguchi, M., Takei, I. and Tada, T.: Functional and molecular organization of an antigen-specific suppressor factor from a T cell hybridoma. *Nature* **283**, 277-288, 1980.
- 6) Taniguchi, M., Saito, T., Takei, I. and Tokuhisa, T.: Presence of interchain disulfide bonds between two gene products that compose the secreted form of an antigen-specific suppressor factor. *J. Exp. Med.* **153**, 1672-1677, 1981.
- 7) Tokuhisa, T. and Taniguchi, M.: Heterogeneity and functional role of the constant region of T cell antigen receptor. *Proc. Jap. Soc. Immunol.* **12**, 614-615, 1982.
- 8) Taniguchi, M. and Tokuhisa, T.: Cellular consequences in the suppression of antibody response by the antigen-specific T-cell factor. *J. Exp. Med.* **151**, 517-527, 1980.
- 9) Eardley, D. D., Murphy, D. B., Kemp, J. D., Shen, F. W., Cantor, H. and Gershon, R. K.: Ly-1 inducer and Ly-1.2 acceptor T cells in the feedback suppression circuit bear an I-J subregion controlled determinant. *Immunogenetics* **11**, 549-557, 1980.
- 10) Greene, M. I., Pierres, A., Dorf, M. E. and Benacerraf, B.: The I-J subregion codes for determinants on suppressor factor(s) which limit the contact sensitivity response to picryl chloride. *J. Exp. Med.* **146**, 293-296, 1977.
- 11) Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497, 1975.
- 12) Eisen, H. N., Belamn, S. and Carsten, M. E.: The reaction of 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid with free amino group of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4583-4585, 1953.
- 13) Taniguchi, M., Saito, T., Takei, I. and Tada, T.: The establishment of T cell hybridomas with specific suppressive function. In "T and B lymphocytes: Recognition and Function". Edited by F. H. Bach et al. Academic Press, New York. P. 667-677, 1979.
- 14) Taniguchi, M., Saito, T. and Tada, T.: Antigen-specific suppressive factor produced by a transplantable I-J bearing T cell hybridoma. *Nature*, **278**, 555-558, 1979.
- 15) Takemori, T. and Tada, T.: Properties of antigen-specific suppressive T-cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. I. In vitro activity and immunochemical characterizations. *J. Exp. Med.* **142**, 1241-1253, 1975.
- 16) Taniguchi, M., Takei, I., Saito, T. and Tokuhisa, T.: Activation of an acceptor

- T cell hybridoma by a VH^+ , $I-J^+$ monoclonal suppressor factor. In "Immunoglobulin idiotypes". Edited by C. Janeway et al. Academic Press, New York. P. 397-406, 1981.
- 17) Taniguchi, M., Saito, T., Igarashi, M., Kurihara, K. and Takei, I.: Antigen-nonspecific suppressor T cell factor bearing I-J subregion gene product. Proc., 4th International Congress Immunol. Abs. 4.5.15, 1980.
- 18) Axen, R., Porath, J. and Ernback, S.: Chemical coupling of peptide and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature **214**, 1302-1304, 1967.
- 19) Cunningham, A. J. and Szenberg, A.: Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. Immunology **14**, 599-600, 1968.
- 20) Herzenberg, L. A.: personal communication.
- 21) Theze, J., Kapp, J. A. and Benacerraf, B.: Immunosuppressive factor(s) extracted from lymphoid cells of nonresponder mice primed with L-glutamic acid⁵⁰-L-alanine⁸⁰-L-tyrosine¹⁰ (GAT). III. Immunochemical properties of the GAT-specific suppressive factor. J. Exp. Med. **145**, 839-856, 1977.
- 22) Tada, T., Taniguchi, M. and Tokuhisa, T.: Suppressive T cell factor and its acceptor expressed on different subsets of T cells: a possible amplification loop in the suppressor system. In "Ir genes and Ia Antigens". Edited by H. O. McDevitt. Academic Press, New York. P. 517-527, 1978.
- 23) Cullen, S. E., Kindle, C. S., Shreffler, D. C. and Cowing, C.: Differential glycosylation of murine B cell and spleen adherent cell Ia antigens. J. Immunol. **127**, 1478-1484, 1981.
- 24) Ochi, A., Nonaka, M., Hayakawa, K., Okumura, K. and Tada, T.: Two loci in I-J subregion of the H-2 complex controlling molecules selectively expressed on suppressor and helper T cells. J. Immunol. **129**, 227-231, 1982.
- 25) Frelinger, J. A., Niederhuber, J. E. and Shreffler, D. C.: Effects of anti-Ia sera on mitogenic responses. III. Mapping the genes controlling the expression of Ia determinants on concanavalin A reactive cells to the I-J subregion of the H-2 gene complex. J. Exp. Med. **144**, 1141-1146, 1976.
- 26) Niederhuber, J. E. and Allen, P.: Role of I-region gene products in macrophage induction of an antibody response. II. Restriction at the level of T cell in recognition of I-J subregion macrophage determinants. J. Exp. Med. **151**, 1103-1113, 1980.
- 27) Murphy, D. B., Yamauchi, K., Habu, S., Eardley, D. D. and Gershon, R. K.: T cells in a suppressor circuit and non-T: non-B cells bear different I-J determinants. Immunogenetics **13**, 205-213, 1981.
- 28) Takei, I., Tagawa, M. and Taniguchi, M.: Activation of acceptor T cell hybridoma by the antigen-specific suppressor T cell factor. Proc. Jap. Soc. Immunol. **10**, 39-40, 1980.
- 29) Takei, I. and Taniguchi, M.: Molecular organization in the regulation of immune response. Proc. Jap. Soc. Immunol. **12**, 364-365, 1982.