ウイルス抗原のプロセッシングと提示機構

保坂 康弘, 黒田 和道

(大阪薬科大学微生物学教室)

緒論でウイルス抗原認識における MHC 拘束性¹⁾の発見に続いて、最近までに確立された抗原プロセッシングと抗原認識の知見をのべ、次に我々の研究成果、特に MHC クラス I 分子表現欠損変異細胞^{2,3)}を用いた成果を紹介したい。

緒 論

1. Dual receptors か single receptor か?

T細胞認識における MHC 拘束性¹⁾という語は、T細胞と抗原提示細胞との間でウイルス及び MHC の2つの特異性が一致するときのみ正常な認識が出来ることを本来意味していた(最近では MHC 分子に結合するペプチドの構造が、MHC の多形性に依存することを指すような使い方もされている)。この2つの特異性を反映するT細胞上の2つのレセプターがあるかもしれないという可能性が一時議論されたことがあった。この問題は、2つの側面から解決された。抗原提示構造が[MHC 分子+ウイルス抗原]のような2つの蛋白質が同等に結合したものでなく、MHC 分子の一部に短い抗原ペプチドが挿入されたものであることが明確になり、さらに MHC 分子の一部にT細胞結合サイトが特定されるに至ったこと⁵⁾、それと外来抗原の特異性をもつT細胞レセプター(TCR)の α 鎖と β 鎖遺伝子⁵⁻⁷⁾で行われたトランスファー実験などで認識特異性が保持されることなどから、1レセプター説が正しいことが明らかになった。

2. ウイルス感染細胞膜上のウイルス糖蛋白質は抗原提示に関与しない。

ウイルスの抗原提示の研究が始まった70年代にはエンベロープウイルスが多用されたこともあって、感染細胞の progeny ウイルスの糖蛋白質が細胞表面で MHC 分子と共に抗原提示するものと考えられた。また活性型融合糖蛋白質をもった紫外線不活性センダイウイルスにより標的細胞が感作されるので(不活性型糖蛋白質をもつウイルスではだめ)、この所見は接種ウイルス由来の融合糖蛋白質の細胞表面への分布によってもたらされるものと考えられた^{8,9)}。

熱不活化インフルエンザウイルスの場合は、エンドソーム膜でウイルス膜と融合がおこること、提示抗原が NP 特異的 CTL クローンで認識されること、抗原提示が Brefeldin A によって阻止されることから¹⁰⁻¹²⁾、cytosolic な抗原提示経路を示唆するものと考えられた。エンドソーム膜に留まると思われる糖蛋白質の抗原提示もあるので、ウイルス糖蛋白質の場合は、エンドソーム膜から細胞質へリークするものと推定された¹³⁾。またサイトメガロウイルス(CMV)¹⁴⁾感染細胞で RNA 合成阻害条件下で親ウイルス蛋白質由来(exogenous protein)の抗原提示が cytosolic 経路を辿ることが示された。また抗インフルエンザ A ウイルス・キラーT細胞による同ウイルス感染標的細胞の subtype 交叉認識が主にウイルス核蛋白質由来物質を狙ったものであることが明らかとなった^{15,16)}。さらに Townsend ら^{17,18)}の実験により NP ミニ遺伝子をトランスフェクトした標的細胞をキラーT細胞が認識することがわかり、NP 由来の短いペプチドが認識に関与していることが実証された。

クラス II 経路では、15アミノ酸からなるペプチドがヘルパーT細胞を活性化出来ることがいち早く示された¹⁹⁾。クラス I 経路でもその後 8-10のアミノ酸配列の短いペプチドがT細胞エピトープ候補として外因性抗

Mechanism of viral antigen processing and presentation
Yasuhiro Hosaka and Kazumichi Kuroda
Department of Microbiology, Osaka Univ. of Pharmaceutical Sciences, Kawai 2-10-65, Matsubara, Osaka 580

〒 580 大阪府松原市河合2-10-65

本論文は第40回日本ウイルス学会総会シンポジウム『ウイルス感染と生体対答』における講演内容を纏めたものである。

原提示法により決定された。Van Bleek & Nathenson²⁰⁾は実際にウイルス感染細胞からクラス I, T細胞エпитープペプチドを分離特定した。VSV 感染細胞から抽出した分画を出発材料とし、抗 MHC-class I 抗体アフィニータカラムで K^b分子を吸着、そこから酸抽出したペプチド分画を逆相クロマトにかけて分離。この各ペプチドを加えた標的細胞の cytolysis から、VSV-N 52-59を T細胞エпитープとしてそのアミノ酸配列までを特定した。

3. クラス I 経路とクラス II 経路

通常キラー T細胞といえば MHC クラス I 分子を発現しているウイルス感染標的細胞を認識する、CD 8⁺T細胞を指す。抗原提示細胞内での [クラス I 分子+抗原ペプチド] 複合物形成とその細胞表面輸送経路をクラス I 経路と称する。CD4⁺T細胞に対して抗原提示する経路をクラス II 経路と称する。クラス II 経路では、エンドソームが重要な役割を果たすことが示された。ここで抗原ペプチドが形成されたり、ペプチドと MHC の結合がおこる。これらのことは Ammonia や Chloroquine によるクラス II 抗原提示阻止によって示されていた^{21,22)}。これらの薬剤によってクラス I 経路が影響を受けていないのでクラス II 経路とは別の蛋白分解経路の存在が推定された。クラス I 抗原提示経路を抑制する薬剤としては Brefeldin A (BFA) があることが Yewdell & Bennink¹²⁾によって見出された。本薬剤は ER から Golgi complex (GC) への輸送を阻止するので、ER で合成されたクラス I 分子が抗原ペプチドと結合して複合物をつくっても、薬剤存在下で ER に留まり、細胞表面に移行しない。

クラス I 経路の場合細胞質ゾル中の、分解された抗原ペプチドが、トランスポーター蛋白 (tap 1 と tap 2 蛋白のヘテロダイマー) を介して ER へ転入されて MHC 分子と結合し、GC を経て細胞表面に至る。クラス II 経路の場合、ER 内の MHC 分子は、インヴァリアント鎖 (I i) と結合しており、エンドソームに至って I i が外れてペプチドと結合できるようになる。

クラス I 抗原ペプチドは、長いペプチドの状態では ER に転入され、ER の中で適当な長さ (nonamer 前後) にトリミングされて MHC 分子に収められるようである²³⁾。

4. 既報の抗原提示変異細胞の変異部位

クラス I 経路における蛋白質の加工分解 (プロセッシング) の段階は 5 つに分けられる。即ち 1. 蛋白質

の経路への進入 2. 蛋白質の変性と分解 3. 抗原ペプチドの ER への移行 4. クラス I 分子との会合 5. クラス I 分子の細胞表面への輸送。

既報の抗原提示変異細胞の多くは変異原処理した後、[抗クラス I + 補体] 処理して選択している。いずれもウイルス感染による抗原提示は出来ず、細胞外から抗原ペプチドを加えた時のみ抗原提示ができる。MHC 分子の α 鎖と β 2-microglobulin (β 2M) 遺伝子とその発現に異常はない。変異細胞の研究から主として 3, 4 段階に関する情報が得られている。

(1) RMA/S 細胞

Rauscher virus により誘導された B 6 マウス (H-2^b) 由来の T lymphoma line (RBL-5) から、Karre らにより変異原処理と、補体処理により選択された²⁴⁾。tap 2 遺伝子が異常なため細胞表面に出現する MHC クラス I 量が少なくなっている (5-10%)。tap 2 遺伝子をトランスフェクトすることによってこの欠損は修復される²⁵⁾。

(2).174細胞

γ 線照射 EB ウイルス形質転換ヒト B lymphoid cell line から補体処理により選択された変異細胞 (45.1) から更に再照射、[クラス II 抗体+補体] 処理により選択された²⁶⁾。染色体 6 のクラス II 領域に大きな欠損があり tap 1 と tap 2 両遺伝子とプロテアソーム関連遺伝子部分を欠く。

(3) T 2 細胞

.174細胞と T cell lymphoblastoid line (CEM^R) と融合させた雑種細胞が T 1. .174細胞のクラス I 分子表現は回復している。T 1 細胞のサブクローンの一つが T 2 細胞で、CEM^R細胞からの染色体 6 クラス II 領域 tap 1 遺伝子の両コピーが欠失し、クラス I 分子の表現がない^{21,22)}。

変異細胞を用いて tap 1, tap 2 遺伝子の同定や同蛋白質の機能が特定された。また tap が機能しなくてもアデノウイルス E 3/19K 糖蛋白質リーダー配列の後に抗原ペプチドを付けた遺伝子をトランスフェクトしてやると、抗原提示が出来るようになる²⁹⁾。この現象の解釈としては、リーダー配列が ER 内へのペプチド転入を促進するという説とこれに反する考えとがある。

5. プロテアソームと抗原プロセッシング

高等生物から酵母までプロテアソームと称する蛋白質分解酵素複合体が存在し、抗原のプロセッシングにも利用されているという仮説が提出されている³⁰⁾。ク

図1 抗原ペプチド NP 50-57 による抗原提示能のペプチド濃度依存性: 4A1, 6D1, 4C2 細胞の比較.

- 37°C で NP peptide を 2 時間パルス
- 26°C で NP peptide を 2 時間パルス

ラス II 領域に存在するプロテアソーム関連遺伝子産物が必須ではないという報告もあるが^{31,32}, Restifo ら³³) によればプロテアソーム中の LMP2 と LMP7 と称せられる蛋白分解酵素群が関与している。

成 績

1. 4C2, 6D1 細胞の内因性抗原提示欠如

インフルエンザウイルスは全て孵化鶏卵発育の PR 8 株を用いた。MHC クラス I ($H-2^k$) 正常表現細胞として L929, 及び 3-methylcholanthrene 誘導 fibrosarcoma 細胞 MHC-4-A1 (4A1) を, MHC 表現欠

損細胞として MHC-4-C2 (4C2) 及び MHC-6-D1 (6D1)²⁾を用いた。

ウイルス感染した時, 正常細胞 4A1 では抗原提示が出来るが, 変異細胞 6D1, 4C2 では出来ない (6D1 細胞は, NP 特異的クローンにより, 高い ET ratio 下でテストすれば僅かに陽性を示す)。しかし細胞外から抗原ペプチド NP50-57 を加えた場合は, 抗原提示が出来た。図 1 に NP50-57 ペプチドを細胞にパルスした時の抗原提示能のペプチド量依存性を示した。4A1, 6D1, 4C2 の順に抗原提示能力が減少していることがわかる。この所見はまた細胞表面にある empty MHC 分子数が同じ順に少なくなっていることをも示唆している。26-28 では MHC 分子が安定化することが知られており, 26°C では細胞表面の empty MHC 分子も多く, 変異細胞を含めて 3 種の細胞とも, 37°C の場合より少量のペプチドで抗原提示能を獲得することが示された。この成績から 26°C で若干増加した比較的少量の表面 K^k 分子があれば, パルスする抗原ペプチド量さえ増加すれば, かなりの程度まで標的細胞 cytotoxicity が起こることがわかる。

使用した K^k 拘束性の抗原ペプチド (NP エピトープ) は, NP50-63 ペプチドをトリミングした種々の合成ペプチドの抗原提示能の比較から, またウイルス感染 L929 細胞からの酸抽出ペプチド分画中にその存在を実証することによって特定された³⁶⁾。変異細胞に内因性抗原提示が出来ないのは, ウイルス感染が成立しないためではない。ウイルス合成蛋白のゲル電気泳動パターンで確かめてある。

2. 変異細胞の Flow cytometry pattern

図 2 に 4A1, 6D1 と 4C2 細胞をそれぞれ抗 K^k , Ia^k mAb (正常細胞 4A1 には抗 D^k も) によって染色したときの Flow cytometry パターンを示す。クラス II 分子は正常細胞でも表現されていないのは当然である。クラス I 分子 K^k , D^k の変異細胞表面での表現はともに著しく少ない。その程度は 4C2 細胞で最低で, 6D1 細胞では 4C2 細胞よりやや多い。

¹²⁵I-protein G を用いて多くの抗 K^k mAb の変異細胞への結合量を調べた場合, 結合抗体量は negligible であった (表 1 に一部提出)。変異細胞に結合する抗体が微量が検出不能という点で図 2 の成績と一致する。また図 1 (37°C 成績) と比べて cytotoxicity test が非常に微量の表面 empty MHC 分子を検出出来る方法であることがわかる。

図 2 4 A 1, 6 D 1, 4 C 2 細菌の flow cytometry patterns : FITC-抗 K^k, 抗 D^k, 抗 Ia^k mAb による直接感染, control : unstained cells

表 1 変異細胞の IFN- γ 処理による外因性抗原提示能及びクラス I 抗原 (K^k) 表現の増加

細胞	IFN- γ 添加量 ug/well	抗原提示能* to 2nd CTL	K ^k mAB 結合量**	
			# 330	# 310
4A1	0	38.0	5,170	6,264
	1	42.0	13,043	12,043
	5	39.5	—***	—
6D1	0	20.0	89	72
	1	30.0	426	356
	5	36.0	—	—
4C2	0	19.0	70	75
	1	40.1	—	—
	5	36.5	—	—

* 20 μ Mの NP50-57 ペプチドと IFN で ⁵¹Cr と共存して 1 昼夜細胞培養。4h⁵¹Cr 放出法で測定。ET=20 : 1。

** 上と同様条件 (⁵¹Cr 非存在) で細胞を filtration plate に培養。結合抗体量を ¹²⁵I-protein G にてモニター。バックカウント 70-80。*** 測定せず。

表 2 抗 K^k mAb パネルによる正常細胞 (4A1), 及び変異細胞 (6D1, 4D2) の外因性抗原提示の抑制

mAb	% Specific lysis* of NP50-57 pulsed target cells			
	Normal	cells (A1)	Mutant	cells (6D1)
# 390	52.3	(13%)	56.3	(0 %)
# 370	43.7	(27%)	22.8	(54%)
# 330	25.0	(58%)	11.8	(74%)
# 310	35.0	(42%)	26.8	(46%)
# 300	62.9	(0 %)	38.1	(24%)
B-D	68.5	(0 %)	ND**	
h-B2M	59.0	(1 %)	ND	
Biotest 20	68.0	(0 %)	ND	
no	65.5	(0 %)	50.0	(0 %)

* : 4h⁵¹Cr 放出測定法 (ET ratio=10) を用いた。抗原提示細胞は NP50-57 ペプチド (20 μ M) で 1 昼夜処理 (その間 ⁵¹Cr 標識), 96 穴プレートに分散, その後 mAb (10-100 倍希釈) で 1 時間処理してから NP 特異的 CTL クローンを添加, 4 時間反応させた。

** : 未測定 Parenthesis means % inhibition

図3 変異細胞におけるMHCクラスI分子合成欠損.

A. 抗K^kによる免疫沈降のフルオログラフィ MC 57 G cells : control cells (H-2^b細胞) +, -: NP 50-57 peptide (20 μM)の存否 K^k: heavy chain 42 kd, β 2 m : 12 kd B. K^k mRNA の Northern hybridization.

図4 変異細胞におけるトランスポーター (Tap 1) mRNA の合成

A. 対照, 4A1, 4C2, 6D1細胞のアクチン mRNA
B. 4A1, 4C2, 6D1細胞の tap 1 mRNA

3. Cytotoxicity 抑制抗K^kmAb パネル

変異細胞 (6D1) と正常細胞 (4A1) とについて, 外因性の提示抗原構造にvariがないことを, 一連の抗K^kmAb パネルを用いて確認した。表2にその成績を示

す。調べた範囲で370, #310, #330の抗K^kmAbが, CTLによる正常標的細胞認識をかなりの程度抑制したが, 同時にこれら抗K^kmAbは変異標的細胞認識をも抑制した。本所見は, 変異細胞において産生発現されるMHC分子の構造(抗原提示構造)そのものが変化していて, CTLを刺激出来なくなっていたという可能性は低いことを示唆している。

4. 変異細胞のクラスI抗原合成欠陥

変異細胞6D1や4C2は, RNA/s細胞などと異なり抗原ペプチドNP50-57を添加しても, MHCクラスI分子の細胞表面表現量は増加しなかった(Flow cytometryと抗K^kmAb/¹²⁵I-protein G結合法により測定)。そこでK^k分子そのものの産生量が少ないか欠如していることが予想された。合成蛋白を³⁵S-methionineで標識し, 細胞可溶液を抗K^k抗体で免疫沈降させると, 正常細胞ではK^k分子の重鎖とβ2mが検出されたのに, 変異細胞では抗原ペプチドをパルスしなくても検出できなかった(図3A)。初めの予想が正しいことが証明された。

またmRNAの産生をNorthern Hybridization法で調べた。H-2K^k及びTap 1 Probe作製は次のように行なった。それぞれ既報の遺伝子配列^{29,30)}のcoding regionsの両端の約20塩基のプライマーを合成し, 細胞抽出mRNAよりcDNAを調製した。PCR法によりH-2K^k及びtap 1のDNA断片を増幅し, クローニ

図5 クラス II CTL クローン B 23(10^7 細胞数) によるウイルス感染治癒マウス肺におけるウイルス抗原誘導の抑制 (感染後3日).
A: 未治療感染マウス肺, B: B 23 治療マウス, 肺切片を抗ウイルス血清染色, 蛍光顕微鏡間接法観察, スケール: $10\ \mu\text{m}$

表3 クラス II 拘束性 CTL クローンによる CBA マウスのインフルエンザウイルス致死感染からの治癒

Transfused CTL	T cell number	Survival
no		0/5
B16	1×10^7	0/5
B23	1×10^7	5/5
	2×10^6	3/5
B28	1×10^7	5/5
	2×10^6	2/5

ング後 ^{32}P -CTP で標識してプローブとした。

Northern hybridization の結果を長期露出フルオログラフィで可視化すると変異細胞に微量の mRNA 産

生が検出された (図3B)。

5. 変異細胞における tap 1 mRNA 合成の欠陥

微量の MHC 分子でも, 内因性ペプチドと結合し細胞表面に正常に輸送されれば, 或る程度の抗原提示があるはずである。実際の内因性抗原提示は極微量なので, 内因性ペプチドと結合出来ない即ち tap 蛋白が異常であるかその産生量が少ない可能性が考えられた。他の可能性, 抗原ペプチド形成に異常があることも考えられるが, この問題のアプローチはむずかしい。まず tap 1 の mRNA の産生を調べた (図4) とところ, 変異細胞での tap 1-mRNA 産生は極めて少ないことがわかった(4A1, 6D1, 4C2の順に少ない)。現在 tap 2 mRNA の産生を調べている。

6. IFN- γ によるクラス I 抗原及び tap 1 合成の増加

サイトカイン特に IFN- γ による MHC クラス I 分子やクラス II 分子の産生増強の報告は多い³⁷⁾。我々も IFN- γ によって変異細胞の内因性抗原提示能が改善されるかも知れないと考えて, K^b 産生量, tap 1 mRNA 産生量, 外因性及び内因性抗原提示能を調べた。表2に見られるように K^b 産生量は増加し, 外因性抗原提示能も増加した。また tap 1 mRNA 産生量も増加し(データ提出せず), 内因性抗原提示についても回復することがわかった。

7. in vivo インフルエンザウイルス感染マウス肺における局所免疫応答

かねがねクラス II 拘束性 CTL 移入により, インフルエンザウイルス感染マウスが救われる現象から (表3), 同ウイルスの in vivo 主増殖細胞にクラス II 抗原が誘導発現していなければならないと考えていた。

図5は感染マウスへの CTL 移入により, ウイルス主増殖細胞である気管支上皮細胞からウイルス抗原が減少乃至消失したことを示している。そしてレーザー顕微鏡を用いて double staining 法により, ウイルス抗原産生細胞にクラス II 分子が発現しているかどうか調べたが現在までのところはっきりした成績はえられていない。また INF- γ や TNF- α の産生誘導がみられたが, これらの生物学的意義の解明は今後の研究を待たなければならない。

考 察

変異細胞6D1と4C2細胞の一通りの特徴を研究してみても種々の問題点がわかった。抗原ペプチドによる外

因性の抗原提示が一応, empty MHC 分子に依存していると考えられるがそれだけで決まるのか? 検出感度からすると Cytotoxicity テストでは微量の empty MHC クラス I 分子の存在を充分検出できる, その次に flow cytometry 法でやっとこき検出できる。¹²⁵I 標識-protein G では検出不可能である, ということになる。また empty MHC といってもその構造を手にしたわけではないので, 26Cでの安定化といってもその実態はなお不透明である。

また IFN 処理細胞での外因性抗原提示能の増加と内因性抗原提示能の回復は, とともに tap 1 (おそらく tap 2 も) の増加と MHC 分子の表現回復により説明できる。

IFN- γ 処理により変異細胞のクラス I 分子とトランスポーターが同時に活性化されて mRNA 産生量が増加した。おそらく蛋白質合成の増加も見られると思われる。クラス I 遺伝子とトランスポーター遺伝子に共通のレギュレーター遺伝子が影響を受けることが予想される。Endothelial cells で類似の現象があるとのことだ³⁸⁾。

最近, 利根川らは tap 1 遺伝子を欠如するトランスジェニックマウスをつくり, クラス I 分子のペプチド結合や輸送が出来ず, キラーT細胞への抗原提示が不能であることを示した。このマウスは従ってまた CD8 T細胞を欠如していた³⁹⁾。tap や関連分子などの研究は或る種の免疫不全の研究に役立つかもしれない。また抗原分解系と共に細胞生物学的にも興味があるところである。

なお1992年に出版された標題に関わる総説, 解説としては文献13, 30, 40-42がある。

要 約

Zinkernagel & Doherty (1974)¹⁾によるキラーT細胞のウイルス感染標的細胞認識における MHC 拘束性の発見から20年足らずで, この問題がウイルス抗原プロセッシングに関する MHC 拘束性を反映したものであることが明らかになってきた。この経過も興味あるもので, この間にクラス I 及びクラス II経路の違いも明らかになってきた。

従来, 熱不活化インフルエンザウイルスを用いて抗原提示機構の独自の研究を続けてきた我々の研究室では, 国産の MHC 表現欠損細胞²⁾をいただいて, ウイルス抗原提示機構の研究の新しい局面を切り開いている。インフルエンザウイルス-L929細胞(H-2^k)の系で研究を続けてきた経過から, 変異細胞はH-2^kマウ

ス由来のものである必要があった。C3Hマウス由来の Methylcholanthrene 誘導繊維肉腫細胞でウイルス感染によっては(内因性抗原提示)抗原提示は出来ないが, NP 抗原エпитープを細胞外から加えた時は(外因性抗原提示)抗原提示出来ることがわかった。本 MHC 表現欠損細胞は, トランスポーター産生とクラス I 分子産生と両者に欠損のある新しいタイプの特異細胞であることがわかった³⁾。そしてこのような原因による免疫不全症があれば INF- γ 投与により回復することが示唆された。

本研究の共同研究者は以下の通りである。

大阪薬科大学: 北谷典丈, 山科勝則, 中島麻理子*, 鶴岡浩志, 鍵島厚伸 (*現在: 丸石製薬KK)

大阪大学医学部: 浜岡利之

サントリー生物有機科学研究所: 南方宏之

神戸環境保健研究所長: 林 皓三郎

石原産業KK 中央研究所: 宮田敬三

京都パスツール研究所: 安田るう子

本研究は, 上原記念生命科学財団研究助成金 (92), 厚生科学研究費 (92), 日本科学協会 (92) によって支持された。

謝 辞

FACSscan 使用の便宜に対して大阪府立羽曳野病院アレルギー内科部長, 露口泉夫博士, と川澄浩美嬢に感謝し, レーザー顕微鏡の使用の便宜に対してオリパス大阪センターの森川, 渡辺, 井田の諸氏に感謝する。モノクローナル抗体を提供して頂いた明治乳業KKヘルスサイエンス研副所長, 佐久間貞俊博士に感謝する。

Recombinant マウス IFN- γ の恵与に対して塩野義製薬KKの佐藤考三郎博士に感謝する。

文 献

- 1) Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis virus within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701-703.
- 2) Ogata, M., Shimizu, J., Kosaka, H., Maekawa, R., Shimizu, K., Fujiwara, H., and Hamaoka T. 1986. Expression of H-2 antigens and induction of antitumor immune responses in various tumor cell clones established from

- methylcholanthrene-induced fibrosarcomas. *Jpn. J. Cancer Re. (Gann)*, 77, 1134-1141.
- 3) Kuroda, K., Kitatani, N., Yamashina, K., Kagishima, N., Tsuruoka, H., Minakata, H., Hamaoka, T., and Hosaka, Y. Novel murine fibrosarcoma cell lines deficient in endogenous antigen presentation are defective of synthesis of both MHC class I and TAP molecules. in preparation
 - 4) Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennet, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions. *Nature (London)* 329, 512-518.
 - 5) Sim, G. K., Yague, J., Nelson, J., Manack, P. Palmer, E., Augustin, A., and Kappler, J. 1984. Primary structure of human T-cell receptor α -chain. *Nature (London)* 312, 771-775.
 - 6) Davis, M. M., and Bjorkman, P. J. 1988. T cell antigen receptor genes and Tcell recognition. *Nature* 334, 395-401.
 - 7) Dembic, Z., Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Kiefer, H., von Boehmer, H., and Steinmetz, M. 1986. Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. *Nature (London)* 320, 232-238.
 - 8) Gething, M.-J., Koszinowski, V., and Waterfield, M. (1978). Fusion of sendai virus with the target cell membrane is required for T cell cytotoxicity. *Nature (London)* 275, 689.
 - 9) Koszinowski, V., Gething, M.-J., and Waterfield, M. 1977. T cell cytotoxicity in the absence of viral protein synthesis in target cells. *Nature (London)* 267, 160-163.
 - 10) Hosaka, Y., Sasao, F., Yamanaka, K., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W., 1988. Recognition of noninfectious influenza virus by class I-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 140, 606-610.
 - 11) Yewdell, J. W., Bennink, J. R., and Hosaka, Y. 1988. Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* 239, 637-640.
 - 12) Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. 1989. Brefeldin-A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Science* 244, 1072-1075.
 - 13) Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. 1992. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 52, 1-123.
 - 14) Riddell, S. R., Rabin, M., Geballe, A. P., Britt, W. J., and Greenberg, P. D. 1991. Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalo-virus does not require endogenous viral gene expression. *J. Immunol.* 146, 2795-2804.
 - 15) Zweerink, H. J., Courtneidge, S. A., Skehel, J. J., Crumpton, M. J., and Askonas, B. A. 1977. Cytotoxic T cells kill influenza virus infected cells but do not distinguish between serologically distinct type A viruses. *Nature (London)* 267, 354-356.
 - 16) Yewdell, J. W., Bennink, J. R., Smith, G. L., and Moss, B. 1985. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1785-1789.
 - 17) Townsend, A. R. M., McMichael, A. J., Carter, N. P., Huddleston, J. A., and Brownlee, G. G. 1984. Cytotoxic T cell recognition of the influenza nucleoprotein and hemagglutinin expressed in transfected mouse L cells. *Cell* 39, 13-25.
 - 18) Townsend, A. R. M., Gotch, F. M., and Davey, J. 1985. Cytotoxic T cells recognize fragments of influenza nucleoprotein. *Cell* 42, 457-467.
 - 19) Babbitt, B. P., Allen, B. M., Matsueda, G. R., Baber, E., and Unanue, E. R. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature (London)* 317, 359-361.
 - 20) Van Bleek, G. M., and Nathenson, S. G. 1990. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule. *Nature (London)* 348, 213-216.
 - 21) Ziegler, H. K., and Unanue, E. R. 1982. Decrease in macrophage catabolism caused by ammonium and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 175-178.
 - 22) Morrison, L. A., Lukacher, A. E., Brachiale, V. L., Fan, D. P., and Brachiale, T. J. 1986. Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* 163, 903-921.
 - 23) Eisenlohr, L. C., Bacik, I., Bennink, J. R., Bernstein, K., and Yewdell, J. W. 1992. Expression of a membrane protease enhances presentation of endogenous antigen to MHC

- class I-restricted T lymphocytes. *Cell* 71, 963-972.
- 24) Karre, K., Ljunggren, H.-G., Piöntek, G., and Kiessling, R. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature (London)* 319, 675-678.
- 25) Powis, S. J., Townsend, A. R. M., Deverson, E. V., Bastin, J., Butcher, G. W., and Howard, J. C. 1991. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature (London)*, 354, 528-531.
- 26) DeMars, R., Chang, C. C., Shaw, S., Reitnauer, P. J., and Sondel, P. M. 1984. Homologous deletions that simultaneously eliminate expression of class I and class II antigens of EBV-transformed B lymphoblastoid cells. I. Reduced proliferative responses of autologous and allogeneic T cells to mutant cells that have decreased expression of class II antigens. *Hum. Immunol.* 11, 77-97.
- 27) Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., Cresswell, P., Townsend, A., and Demars, R. 1992. Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature (London)* 355, 644-646.
- 28) Salter, R. D., Howell, D. M., and Cresswell, P. 1985. Gene regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21, 235-246.
- 29) Anderson, K., Cresswell, P., Gammon, M., Hermes, J., Williamson, A., and Zweerink, H. 1991. Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen-processing mutant cells to class I-restricted cell mediated lysis. *J. Exp. Med.* 174, 489-492.
- 30) 田村具博, 田中啓二, 市原 明. 1992プロテアソームと抗原プロセッシング. *化学と生物*30, 702-713.
- 31) Arnold, D., Driscoll, J., Androlewicz, M., Hughes, E., Cresswell, P., and Spies, T. 1992. Proteasome subunits encoded in the MHC are not generally required for the processing of peptides bound by MHC class I molecules. *Nature (London)* 360, 171-174.
- 32) Momburg, F., Ortiz-Navarrete, V., Neefjes, J., Goulmy, E., van de Wal, Y., Spits, H., Powis, S. P., Butcher, G. W., Howard, J. C. Walden, P., and Hammerling, G. J. 1992. Proteasome subunits encoded by the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature (London)* 360, 174-177.
- 33) Restifo, N. P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J. W., Mulé, J. J., Rosenberg, S. A. and Bennink, J. R. 1993. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* 177, 265-272.
- 34) Arnold, B., Burgert, H.-G., Archibald, A. L., and Kvist, S. 1984. Complete nucleotide sequence of the mouse H-2K^b gene. Comparison of three H-2K^b locus alleles. *Nucleic acid Res.* 12, 9473-9487.
- 35) Monaco, J. J., Cho, S., and Attaya, M. 1990. Transport protein genes in the murine MHC: Possible implications for antigen processing. *Science* 250, 1723-1726.
- 36) Nakajima, M., Kitatani, N., Kitagawa, S., Kuroda, K., Minakata, H., and Hosaka, Y. Influenza virus NP-specific MHC class I (H-2K^b)-restricted T cell epitope. in preparation.
- 37) Klar, D., and Hammerling, G. J. 1989. Induction of assembly of MHC class I heavy chain with $\beta 2$ microglobulin by interferon- γ . *EMBO J.* 8, 475-481.
- 38) Epperson, D. E., Arnold, D., Spies, T., Cresswell, P., Pober, J. S., and Johnson, D. R. 1992. Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J. Immunol.* 149, 3297-3301.
- 39) Vam Laer, L., Ashton-Richardt, P. G., Ploegh, H. L., and Tonegawa, S. 1992. TAP-1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4⁻⁸⁺ T cells. *Cell* 71, 1205-1214.
- 40) 保坂康弘. 1992. ウイルス抗原の処理と認識・蛋白質核酸酵素特集号37, 2865-2874.
- 41) Monaco, J. J. 1992. A molecular model of MHC class I-restricted antigen processing. *Immunol. Today* 13, 173-179.
- 42) Neefjes, J. J., and Ploegh, H. L. 1992. *Immunol. Today* 13, 179-184.