原 著

順天堂医学 36 (3)
P. 381~391 (1990)

自己免疫疾患のモデル (NZB×NZW)

F₁マウスの MHC クラス II 分子の解析Nucleotide sequence analysis of MHC class II genes in
autoimmune-prone (NZB×NZW) F₁ mice

小 川 重 樹* 西 村 裕 之**

SHIGEKI OGAWA M. D. & HIROYUKI NISHIMURA Ph. D.

われわれは先に (NZB×NZW) F₁マウスに認められる自己免疫疾患, 特に全身性エリテマトーデス (SLE) の遺伝的素因の一つとして, 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) のヘテロ接合性 H-2^d/H-2^sが必要不可欠であることを明らかにした. このようなF₁にユニークな MHC の役割は, この遺伝子領域で最も多形性を示すクラス II 遺伝子から形成される I-E, あるいは I-A クラス II 分子中に両親系マウス由来の異なる haplotype を持つ α 鎖と β 鎖の対合した hybrid クラス II 分子が形成されるためと推定された. 今回われわれは, 自己免疫疾患の発症に関わるこのような特有のクラス II 分子の形成される可能性を分子論的に検討することを目的として, NZW および NZB マウスより得られた MHC クラス II genomic DNA, あるいは cDNA clone の構造解析を試みた. その結果, 血清学的 H-2^shaplotype に分類されていた NZW マウスの MHC クラス II 遺伝子である A α 鎖・A β 鎖・E α 鎖および E β 鎖遺伝子は H-2^dhaplotype のものと同じであり, 特に E α 鎖に, 他の H-2 haplotype のマウス系にはみられない特徴的な構造が認められた. 一方, H-2^dhaplotype に分類されていた NZB マウスにおける A β 鎖および E β 鎖遺伝子の α 1 または β 1 domain は, 同じ H-2^dに属する Balb/c マウスのそれと同一の配列を示すことが明らかになった. これらの成果をもとに, H-2^dと H-2^sのクラス II 遺伝子の相同性を検討し, 異なる haplotype 由来の α 鎖と β 鎖の対合によって, F₁ ユニークな hybrid MHC クラス II 分子が形成されるか否かを検討したところ, I-E 分子には容易にこれができ得るのに反し, I-A 分子にはこれができ難い構造の存在することが明らかにされた. これらの成果は, 今後 SLE の発症機構における免疫応答遺伝子の役割を解析していく上で, 貴重な情報を提供しているものと考えられる.

索引用語: 自己免疫, 主要組織適合抗原, NZBマウス, NZW マウス, 全身性エリテマトーデス

Key words: autoimmunity, MHC class II molecule, NZB mice, NZW mice, SLE

緒 言

MHC クラス II 遺伝子は免疫応答に密接に関連

- * 順天堂大学医学部膠原病内科学講座
- ** 順天堂大学医学部病理学第2講座
- * Division of Rheumatology Department of Internal Medicine,
- ** Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan
〔Oct. 23, 1989 原稿受領〕(Nov. 16, 1989 掲載決定)

した遺伝子群であり, ヒトにおいては HLA-D 領域に, マウスにおいては H-2 I 領域に位置し, その遺伝子産物であるクラス II 分子はマクロファージおよび B 細胞などに表現されている.

この分子は α 鎖および β 鎖よりなる heterodimer であり, それぞれ 33KD・28KD の分子量を有する. いずれのペプチド鎖も N 末端より α 1, β 1 domain, および α 2・ β 2 domain と二つの球状の domain を細胞外に有しており, α 1・

β 1 domain は抗原ペプチド結合部位と考えられている。

多くの疾患において, HLA haplotype と疾患との相関が知られているが, なかでも自己免疫反応が関与していると考えられる慢性関節リウマチ(RA)・インスリン依存性糖尿病(IDDM)・SLE など40をこえる疾患において, HLA haplotype との相関が報告されている¹⁾。これらの多くでは, 特に HLA-D 領域に存在する MHC クラス II 遺伝子(免疫応答遺伝子)が発症機序に重要な係わりを持っていると考えられている。IDDM においては, HLA-DQ 分子の特定のアミノ酸残基の置換と疾患感受性との相関が議論され²⁾, Sjögren 症候群においては DQ α 1/DQ α 2 のヘテロ接合性³⁾, また日本人 SLE においては DR 2/DR 4 のヘテロ接合性⁴⁾との相関性についても報告がされている。

自己免疫疾患のモデル動物である New Zealand Black (NZB) マウスにおいては, 全例に赤血球自己抗体産生を伴う自己免疫性溶血性貧血が自然発症するが, これに加え, IgM クラスの抗 DNA 抗体産生や晩年に免疫複合体型糸球体腎炎も出現する⁵⁾⁶⁾⁷⁾。このような自己免疫病態は, 表現型において正常である New Zealand White (NZW) マウスとの交配 F1 マウスにおいては大きく変化する。すなわち (NZB $\times$ NZW) F1 マウスでは, NZB マウスに比較しいちじるしく早期より腎病変が出現するし, 加齢とともに抗 DNA 抗体のクラスが IgM から IgG へと転換する⁸⁾⁹⁾。このような免疫異常の進行には複数の遺伝子が関与していると考えられている⁷⁾¹⁰⁾。Hirose ら¹¹⁾は H-2 コンジェニックマウスを用いた遺伝学的解析を行い, NZB (H-2^d) マウス由来の MHC 遺伝子と NZW (H-2^k) マウス由来の MHC 遺伝子の相互作用(ヘテロ接合性)の重要性を示した。また Yanagi ら¹²⁾は, H-2^d/H-2^k のヘテロ接合性に加えて, NZW マウスのユニークな T 細胞抗原受容体 β 鎖遺伝子が, IgG クラス抗 DNA 抗体の産生を含む免疫病態の発症に関係していることを示している。これらの事実から, (NZB $\times$ NZW)

F1 マウスにおいては, 両親由来の異なる haplotype の MHC クラス II 遺伝子由来の α 鎖と β 鎖の対合によってできる F1 ユニークな MHC クラス II 分子の形成と, これを認識して働く補助 T 細胞上の T 細胞抗原受容体の特異性が, 病態発症の遺伝的素因となっていることが示唆されている¹⁰⁾。

しかし現在のところ, これら NZB や NZW マウスにおける MHC クラス II 分子の多形性に関する情報がないために, H-2 ヘテロ接合性の重要性を分子論的に説明していく方向性が得られていなかった。今回われわれは, NZB および NZW マウスより得られた genomic DNA, または cDNA clone の塩基配列を決定することにより, これらマウスの MHC クラス II 遺伝子の多形性について解析を行った。

方 法

Southern blot 解析: NZB・NZW および Balb/c マウスの腎臓より各々高分子 DNA を抽出し, 制限酵素 Bam HI・EcoR I・Hind III および Pst I で切断し, 0.8% アガロース電気泳動を行い, Southern blot による解析を行った。A β および E β cDNA clone を ³²P-dCTP を用いて random primed labelling し, 65°C で hybridization を行った¹³⁾(図-1)。

cDNA と genomic DNA clone の単離: NZB マウス脾臓細胞および NZW マウスにみられた自然発症 B リンパ腫より RNA を抽出し, oligo dT セファロースカラムを用いて poly (A)⁺m RNA を精製し¹⁴⁾, これより cDNA を合成した。合成した cDNA は phage vector λ gt 11 に cloning し, cDNA library を作成した¹⁵⁾。また NZW マウス腎臓より高分子 DNA を抽出し, phage vector EMBL 3 を用いて genomic library を作成した¹⁶⁾。NZW マウスおよび NZB マウスの E β 遺伝子については, cDNA library より HLA-DR β cDNA (pDR β 134) を probe として cDNA clone を単離した。

NZW マウスの A β 遺伝子については, EMBL 3

図-1 NZB, NZW, Bal b/c マウスの Southern blot 解析

各々のマウス腎臓より抽出した高分子 DNA を制限酵素 Bam HI で切断し, A β および E β 遺伝子 probe として, hybridization を行った.

NZB マウスと Balb/c マウスでは, A β , E β 領域に同じ多形性を示しているが, NZW マウスでは, 全く異なる多形性がみられる. (EcoRI, Hind III および Pst I についても同様に NZB と Balb/c マウスで差異は認められなかったが, NZW マウスは異なったパターンを示した.)

による genomic library をスクリーニングし, 得られた A β 遺伝子 clone を Bam HI および Sal I で切断し, 得られた 3.9Kb の断片を plasmid pSKM13 (+) に subcloning した. また NZB マウスの A β 遺伝子については, β 1 domain を code する遺伝子断片を Polymerase Chain Reaction (PCR) を用いた手法¹⁷⁾により cloning を行った. それぞれのマウスの E α 遺伝子, および A α 遺伝子に関しては各々の α 1 domain を code する遺伝子断片を, PCR を用いて増幅し pSKM13 (+) に cloning した.

塩基配列の決定: 塩基配列は, T7 DNA polymerase を用いて Sanger ら¹⁸⁾の方法で行った.

結 果

1. NZB・NZW・Balb/c マウスの MHC クラ

ス II 遺伝子に関する RELP (Restriction Fragment Length Polymorphism) の解析

図-1 には, NZB・NZW・Balb/c マウス由来の DNA について, MHC クラス II A β 遺伝子および E β 遺伝子の probe を用いた Southern blotting の解析の結果を示してある. 図からも明らかに, Balb/c マウスと NZB マウスとは同じ RFLP の多形性を示し, 違いは認められなかった. しかし, NZW マウスはこれら2つのマウスとは明らかに異なるクラス II 遺伝子の多形性を示した. 図には制限酵素 Bam HI を用いて行った結果を示しているが, EcoRI・Hind III および Pst I 消化 DNA についても同様, Balb/c マウスと NZB マウスでは相違が認められなかったが, NZW マウスは異なる RFLP を示した.

2. NZW マウスの MHC クラス II 遺伝子の解析

図-2に MHC クラス II 遺伝子の概略を示し,

図-2 NZW マウスの MHC クラス II 遺伝子 $A\alpha$, $A\beta$, $E\alpha$ および $E\beta$ 遺伝子の概要と解析の方法

$A\beta$ genomic clone は, NZW マウス腎臓 genomic library より単離し, 得られた clone DNA を制限酵素 BamHI および SalI で切断した後 pSKM13 (+) に subcloning した. $E\beta$ cDNA clone は NZW マウスに自然発症した Bリンパ腫 cDNA library をスクリーニングして単離し, pSKM13 (+) EcoRI 部位に挿入した. $A\alpha$ および $E\alpha$ 遺伝子 $\alpha 1$ domain exon の遺伝子は PCR を用いて増幅し, T4 DNA Polymerase 処理を行った後 pSKM13 (+) EcoRV 部位に subcloning した. 図中, 黒丸および白丸は, PCR に用いた oligonucleotide primer の位置を示す (●: 5'-AGGAACACACCATCATCCAGGC, ●●: 5'-TTGGCATCTGGAGTGTGTTGG, ○: 5'-TATCAGTCTCCTGGAGACATTG, ○○: 5'-GGTAGCTGGGGTGGAA TTTGAC). 矢印は, 各々の clone で行った sequencing の方向と長さを示す.

Nucleotide sequence of I-E_B cDNA

Leader

```

Met Val Trp Leu Pro Arg Val Pro Cys Val Ala Ala Val Ile Leu Leu Leu Thr Val Leu
d ATG GTG TGG CTC CCC AGA GTT CCC TGT GGG GCA GCT GTG ATC CTG TTG CTG ACA GTG CTG
u
z
-----
Thr Val Leu Ser Pro Pro Val Ala Leu Val Arg Asp Thr Arg
d ACA GTG CTG AGC CCT CCA GTG GCT TTG GTC AGA GAC ACC AGA
u
z
-----

```

$\beta 1$ domain

```

Pro Arg Phe Leu Glu Tyr Val Thr Ser Glu Cys His Phe Tyr Asn Gly Thr Gln His Val
d CCA CGG TTT TTG GAA TAC GTT ACA TCT GAG TGT CAT TTC TAC AAC GGG ACG CAG CAC GTG
u
z
-----
Arg Phe Leu Glu Arg Phe Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Asn Leu Arg Phe Asp Ser Asp Val
d CGG TTT CTG GAG AGA TTC ATC TAC AAC CGG GAG GAG AAC CTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG
u
z
-----
Gly Gly Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Asn Trp Asn Ser Gln
d GGC GAG TAC CGC GCG GTG ACA GAC CTG GGG CGG CCA GAG GCC GAG AAC TGG AAC AGC CAG
u
z
-----
Pro Glu Ile Leu Glu Asp Ala Arg Ala Ser Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr Glu
d CCG GAG ATC CTG GAG GAT GCG CGG GCC TCG GTG GAC ACG TAC TGC AGA CAC AAC TAT GAG
u
z
-----
Ile Ser Asp Lys Phe Leu Val Arg Arg Arg
d ATC TCG GAT AAA TTC CTT GTG CGG CGG AGA
u
z
-----

```

図-3 H-2^d, H-2^u および H-2^k haplotype の E β 鎖の signal peptide を規定する exon (leader sequence) 及び $\beta 1$ domain exon の塩基配列

報告されている H-2^u haplotype の配列は, leader sequence の塩基配列が不完全である. H-2^k haplotype の signal peptide は, H-2^d と完全に一致した. H-2^u haplotype と H-2^k haplotype では $\beta 1$ domain に 1 塩基の置換があるが, アミノ酸の置換はともなわない.

NZW マウスより得た各 clone の領域および塩基配列の決定を行った方向と長さを示してある。E β 鎖 cDNA clone (WEB D-3) は, NZW マウス由来のBリンパ腫より単離した。その塩基配列を報告されているE β^u およびE β^d の塩基配列と比較して図-3に示してある。 β 1 domain・ β 2 domain・膜貫通部(TM)・細胞質部(CY), および3' 非翻訳領域までの塩基配列は, H-2^u haplotype のもの¹⁹⁾と比較して β 1 domain に一塩基の置換がみられる以外同一であった。この β 1 domain に見られた塩基の置換はアミノ酸の置換を生じないものであった。

E β^u の signal peptide を code する領域 (leader sequence) については, 現在まで完全な塩基配列は報告はされていなかったが, 今回の検索で NZW マウスより得られたE β^z cDNA クローン の leader sequence は, E β^d haplotype のもの²⁰⁾と同一であることが明らかになった。報告されているE β^u の5' 末端の一部の leader sequence はE β^d およびE β^z とも異なっているが, artefact による可能性も考えられるので, 報告されている H-2^u haplotype の leader sequence の配列に

については再検討が必要と考えられている。

E α 鎖に関しては, N末端可変部(α 1 domain) を code する genomic DNA を合成 primer を用いた遺伝子増幅法を用いて単離し, 塩基配列の決定を行った (primer の位置および配列については脚注参照)。その結果, 塩基配列は B10. PL マウスについて報告されているE α^u α 1 domain と同一であることが示された。

A β 鎖に関しては, NZW マウス由来の genomic library よりA β^z 遺伝子 clone を単離し, さらに signal peptide および β 1 domain を code する領域を含んだ 3.9kb の断片について塩基配列を決定した。 β 1 domain を code する領域の塩基配列は, B10. PL マウスについて報告されたA $\beta^{u21)}$ のものと同じであった。

A α 鎖に関しては, E α 鎖と同様に遺伝子増幅の手法を用いて α 1 domain を code する領域の塩基配列を決定した。その結果, B10. PL マウスのA α^u と同一の塩基配列が認められた²²⁾。

3. NZB マウスの MHC クラス II 遺伝子の解析

A β 鎖 β 1 domain を code する exon を図-3 脚注に示した primer を使い, 遺伝子増幅法に

図-4 NZB マウスのA β およびE β 遺伝子の概要と解析の方法

A β 鎖の β 1 domain の両端の intron 部分の primer を用いて遺伝子増幅 (PCR) を行った。

増幅した断片は 387bp (base pair) であり, 図-1と同様の方法を用いて subcloning した。星印は PCR に用いた oligonucleotide primer を示す。(*: 5'-GGTCTGCGTGCTCCCGC, **: 5'-GCGGGAAGTCTGCTCCGC) 2個の独立したE β cDNA clone (BEB43, BEB46) は, HLA-DR β cDNA clone (pDR β 134) を用いて NZB マウス脾臓 cDNA library より単離し, pSKM13 (+) EcoRI 部位に subcloning した。矢印は, 各々の clone で行った sequencing の方向と長さを示す。

より単離し、塩基配列の決定を行った。その結果、塩基配列は Balb/c マウスで報告されたもの²³⁾と同一であった。

次に、E β cDNA clone を NZB マウス脾臓細胞由来の cDNA library より単離し、図-4 に示す配列決定の方法にしたがって塩基配列を決定した。その結果 clone BEB46 は、leader sequence を除いてほぼ完全な E β cDNA clone であった。この clone の β 1 domain $\cdot$ β 2 domain $\cdot$ 膜貫通部 (TM) $\cdot$ 細胞質部 (CY), および 3' 非翻訳領域を code する exon の塩基配列は、Balb/c マウスについて報告され H-2^d haplotype のもの²⁰⁾と完全に一致した。しかし、clone BEB 46 は Balb/c マウスで報告されている leader sequence を含まず、未知の配列に置換されていた。この領域を確認するため leader sequence を完全に含んでいる clone BEB 43 についてこの部位の塩基配列を決定した結果、Balb/c マウスについて報告された E β ^d のものと一致した。

考 察

本研究では、(NZB $\times$ NZW) F1 マウスの SL E 発症における免疫応答遺伝子の役割を分子論的に理解することを目的として、NZB と NZW マウスの MHC クラス II 遺伝子の塩基配列を決定し、その多形性について解析を行った。

NZW マウスは、New Zealand の Otago 大学にて、W. H. Hall により初めて樹立された系統である²⁴⁾。この系統の H-2 haplotype は、血清学的には H-2^s と記載されており、他の haplotype との関連性は低いとされている²⁵⁾。

H-2 K および H-2 I 亜領域について、この H-2^s haplotype が H-2^u haplotype と類似しているという報告がなされているが、H-2 S および H-2 D 亜領域に関しては、H-2^s haplotype は他の既知のどの haplotype とも明確な相同性を示さないとされている²⁶⁾。

われわれは今回、この NZW マウスの MHC クラス II A α 領域 $\cdot$ A β 領域 $\cdot$ E α 鎖および E β

鎖遺伝子について、genomic DNA あるいは cDNA clone の解析を行った。その結果、E β 鎖 β 1 domain に 1 塩基の相違がみられたが、アミノ酸レベルでは、A α 鎖 $\cdot$ A β 鎖 $\cdot$ E α 鎖および E β 鎖の α 1 domain あるいは β 1 domain に関しては、H-2^u haplotype と同一の配列が示された。従って、H-2^s および H-2^u haplotype は、I 領域に関しては同一である可能性が高いと考えられた。

NZB マウスは、1959 年 Otago において Bielschowsky ら²⁴⁾によって純系化された系統である。その正確な由来については不明な点が多く、Imperial Cancer Research Fund より New Zealand の Otago 大学に持ち込まれた outbred 由来であること以外の記載はなされていない。このマウスの H-2 haplotype は H-2^d とタイプされているが²⁷⁾、やはり H-2^d haplotype である Balb/c マウスと同じ allele を持つかどうかは不明であった。今回われわれは A β および E β 遺伝子の RFLP 解析と、A β 鎖 β 1 domain および E β 鎖 cDNA clone の塩基配列の解析を行ったが、そのいずれにおいても両マウス系に違いは認められなかった。いまだ A α 鎖および E α 鎖遺伝子の解析は行っていないが、E β 遺伝子中の I-A $\cdot$ I-E 亜領域を規定する recombination hot spot の両側にある E β $\cdot$ β 1 domain exon と、 β 2 domain exon およびその下流の 3' 非翻訳領域まで Balb/c マウスと一致していることより、これら 2 つのマウスは H-2 I 領域に関しては、同じ起源を持つ H-2^d haplotype のマウスと考えられた。また両マウスの H-2 haplotype は血清学的な差異が認められていないことにより、同じ allele を持つ可能性が高いと考えられる。

(NZB $\times$ NZW) F1 マウスの自己免疫疾患の発症に、H-2^d / H-2^s のヘテロ接合性が必要不可欠であるが¹¹⁾、この遺伝子効果が hybrid MHC クラス II 分子の形成によっているか否かは重要な問題である。今回、H-2^s と H-2^u とが少なくとも H-2 I 領域については、同一であることが明らかになったが、これによって H-2^d と H-2^s 間

hybrid クラスⅡ分子が形成されるか否かについてはいくつかの示唆が与えられた。

MHC クラスⅡ分子は α 鎖と β 鎖とからなる heterodimer であり, I-A分子およびI-E分子の2つの isoform を有する. 各々のN末端側の多形性に富む抗原結合部位 (α 鎖については $\alpha 1$ domain, β 鎖については $\beta 1$ domain) が対合し, 特定の抗原ペプチドに対する結合能が規定される²⁸⁾. 特定のヘテロ接合性においては, 異なる haplotype に由来する α 鎖と β 鎖の対合により, そのヘテロ接合性にユニークな組合せが生じ, 従って発現される MHC クラスⅡ分子の種類が増加すると考えられる. しかし, 最近, gene transfection による I-A分子の発現実験により必ずしも常に異なる haplotype 由来の組合せが可能であるという訳でなく, 一般に同じ haplotype 由来の α 鎖と β 鎖の対合が優先し, haplotype の異なる組合せにおいては, その対合の効率が低いことが示されている²⁹⁾. これは α 鎖 β 鎖が互いに強い連鎖不平衡の中で, selective pressure をうけ多様性を獲得したためと解釈されている. 図-5は McDevitt ら³⁰⁾による各 haplotype 間での, A β 鎖 $\beta 1$ domain の塩基およびアミノ酸残基の相違を示したものである. これによると, I-A分子に関しては, d haplotype と u haplotype は互いに最も離れた haplotype であり, A $\beta^{z(u)}$ A α^d またはA β^d A $\alpha^{z(u)}$ といった対合が実際に可能であるか否かは, 今のところ不明である. 現在, われわれはこの点について gene transfection による形質発現実験を行い, 検討中である. ところで Germain ら³¹⁾は, クラスⅡ分子の発現の高くなる条件下では, 異なる haplotype のA α とA β 分子に対合が起こり易くなることを示した. 一般に自己免疫疾患モデルマウスにおいては, MHC クラスⅡ分子の発現量が高いということが見いだされているので³²⁾, 異なる haplotype の α 鎖と β 鎖との対合によって (NZB $\times$ NZW) F1マウスにもF1ユニークな分子が形成される可能性が考えられる.

I-E分子に関しては, 一般的に多くのマウス系でE α 鎖が同じであり, 従って, 特定のヘテロ

	q	b	k	s	f	u	d
d	17	14	30	31	33	37	
u	37	32	15	19	22		21
f	25	28	23	7		13	16
s	24	28	23		4	13	17
k	33	30		13	11	10	16
b	15		16	14	16	18	9
q			11	16	13	13	22
q							10

図-5 q, b, k, u, s, f, d 及び NOD haplotype 間でのA β 鎖 $\beta 1$ domain における塩基およびアミノ酸残基の相違

縦, 横で haplotype を比較し, 異なる数を示している³⁰⁾. 参考文献³⁰⁾による

接合体においてもユニークな対合は生じないのが通常である. しかしながら, H-2^u haplotype はこれまで知られている中で唯一, E α 鎖が多形性を示す例として知られている. 従って, H-2^d/H-2^{z(u)}のヘテロ接合体においては, F1にユニークなクラスⅡ分子が生じ得る.

実際に, E α^u と他のE α 鎖においての, $\alpha 1$ domain におけるアミノ酸残基の相違はわずかに二個にすぎなく, しかもこれらの残基の置換は α 鎖 β 鎖の結合に重要な部分には起こっていない. 従って, E $\alpha^{z(u)}$ 鎖とE α^d とは, 比較的容易に互いに β 鎖を交換してE α^d E $\beta^{z(u)}$ あるいはE $\alpha^{z(u)}$ E β^d を形成できる. 因にA α^d とA α^u のアミノ酸残基の相違は15個である. E α^u 鎖が他の haplotype 由来のE β 鎖と対合して, 機能的なクラスⅡ分子を形成できることを示した例としては, 最近 Kovac ら³³⁾が [B10. A (4A) $\times$ B10. PL] F1マウスにおいてはE α^u E β^k が形成され, しかもこれが胸腺におけるT細胞のH-2拘束性の獲得に際して機能していることを報告している.

次に, そのようなヘテロ接合体にユニークな hybrid I-E分子が発現できるとした場合, E α 鎖 $\alpha 1$ domain の二個のアミノ酸残基の置換が, β 鎖との対合において本来の対応の場合とは異なる機能的変化を与えることができる位置にあるか否かが問題となる. 図-6には Brown²⁸⁾らが提唱して

図-6 I-E分子の抗原ペプチド結合部位の構造モデルと $E\alpha^1\alpha^1$ domain における置換の位置

H-2^u haplotype では α^1 domain に $E\alpha$ 鎖に通常みられない2つのアミノ酸残基の置換が存在する。矢印は、22番目の Phe→Tyr, 75番目の Glu→Lys への置換部位を示す。陰影をつけた帯は α^1 domain の polypeptide, 白ぬきの帯は β^1 domain のものを示す。丸、四角で示したものは抗原結合部位に配向したアミノ酸残基を示し、丸は底部の β sheet 構造のもの、四角は α helix のものを示す。黒くぬった残基は各 haplotype で変化のないもの、斜線をつけた残基は多形性を示すものである。22番目の置換（図ではかくれている）は抗原ペプチドの結合に関与する可能性がある。点線は Arg, Asp の静電結合 (salt bridge) の位置を示す。75番目の置換はこの静電結合に影響することが考えられる。参考文献28)

いる MHC クラス II 分子モデルの上に、われわれが $E\alpha^2$ にみられる置換の位置をしたものである。これは抗原ペプチドの結合部位を上からみた図であり、 α^1 domain および β^1 domain の二つの α helix 構造の間の溝と、底部の β -sheet 構造の間で抗原ペプチドの結合部位が構成されている。陰影をつけた部分が α^1 domain であり白抜きの部分が対合する β^1 domain である。図にみられる α^1 domain 22番目の Tyr→Phe の置換は、抗原ペプチドが結合すると予想される cleft の底部で残基を上向きに出している位置であり、抗原提示機能に影響を与えると予想されている位置である。従って、この置換は異なる β 鎖との対合において、ユニークな結合部位を生じることになる。前述のように、この置換は α 鎖 β 鎖の結合に重要な β -sheet 構造には関わっていない。

次に75番目の Glu→Lys の置換はきわめて興味深い位置にある。これは陰性荷電をもつ残基

から陽性荷電をもつ残基への置換であるが、これは76番目の Arg 残基に隣接している。この Arg 残基の陽性荷電と対合する β^1 domain の Asp の陰性荷電は、静電的結合(いわゆる salt bridge)を形成していると考えられる。(図中点線で示してある) HLA DQ 分子における対応する静電結合の有無は、インスリン依存性糖尿病 (IDDM) の感受性に関わることが最近報告されている²⁾。その機序は不明であるが、76番目の Arg 残基の隣接する残基の荷電の変化は、このような機能的変化をもたらす静電的結合に影響を及ぼすものと予想される。

以上のように、(NZB×NZW) F1 マウスのヘテロ接合性に特異的な hybrid MHC クラス II 分子は、I-A 分子におけるよりもより I-E 分子に形成される可能性が考えられ、また NZW マウスの $E\alpha$ 鎖におけるアミノ酸置換の位置は、NZB マウス由来の $E\beta$ 鎖との対合においてユニークな

機能的構造変化をもたらす可能性が大きい。

現在, このような観点から (NZB×NZW) F1 にみられる自己免疫疾患と MHC クラス II 分子の特異性との関連を, transfection による培養細胞における MHC-クラス II 分子の発現実験や transgenic mouse の生産を通じた実験により解明すべく研究を進めている。

文 献

- 1) Todd, J. A., Acha-Orbea, H., Bell, J. I., *et al.*: A molecular basis for MHC class II associated autoimmunity. *Science*, **240** : 1003~1009, 1988
- 2) Todd, J. A., Bell, J. I. and McDevitt, H. O.: HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature*, **329** : 599~604, 1987
- 3) Harley, J. B.: Gene interaction at HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjögren syndrome. *Science*, **232** : 1145~1147, 1986
- 4) Hirose, S., Ogawa, S., Nishimura, H., *et al.*: Association of HLA-DR 2 / DR 4 heterozygosity with systemic lupus erythematosus in Japanese patients. *J. Rheumatol.*, **15** : 1489~1492, 1988
- 5) Bielschowsky, M., Helyer, B. J. & Howie, J. B.: Spontaneous haemolytic anemia in mice of the NZB/B1 strain. *Proc. Univ. Otago Med. School* **37** : 9~11, 1959
- 6) Howie, J. B., & Helyer, B. J.: The immunology and pathology of NZB mice. *Adv Immunol* **9** : 215~266, 1968
- 7) Shirai, T., Hirose, S., Okada, T., *et al.*: Immunology and immunopathology of the autoimmune disease of NZB and related mouse strains. *Genetically Based Immunological Disorders in Inbred Mice.* (Eds. Rihova, E. B. & Vetvicka, V.) CRC Press, Inc., N. W. Boca Raton, Fla., in press.
- 8) Papoian, R., Pillarisetty, R. & Talal, N.: Immunological regulation of spontaneous antibodies to DNA and RNA. II. Sequential switch from IgM to IgG in NZB/NZW F1 mice. *Immunology* **32** : 75~79, 1977
- 9) Kohno, A., Yoshida, H., Sekita, K., *et al.*: Genetic regulation of the class conversion of ds DNA-specific antibodies in (NZB×NZW) F1 hybrid. *Immunogenetics* **18** : 513~524, 1983
- 10) Shirai, T., Hirose, S., Sekigawa, I., *et al.*: Genetic and cellular basis of anti-DNA antibody synthesis in systemic lupus erythematosus of New Zealand mice. *J. Rheumatol* (suppl. 13), **14** : 11~20, 1987
- 11) Hirose, S., Ueda, G., Noguchi, K., *et al.*: Requirement of H-2 heterozygosity for autoimmunity in (NZB×NZW) F1 hybrid mice. *Eur. J. Immunol* **16** : 1613~1633, 1986
- 12) Yanagi, Y., Hirose, S., Nagasawa, R., *et al.*: Does the deletion within T cell receptor beta chain gene of NZW mice contribute to autoimmunity in (NZB×NZW) F1 mice ? *Eur. J. Immunol.* **16** : 1179~1182, 1986
- 13) Southern, E. M.: Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** : 503~517, 1975
- 14) Favaloro, J., Treisman, R. & Kamen, R.: Transcription maps of polyoma virus-specific RNA : Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. *Methods Enzymol.* **65** : 718~749, 1980
- 15) Gubler, U. and Hoffman, B. J.: A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, **25** : 263~269, 1983
- 16) Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A., *et al.*: Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170** : 828~847, 1983
- 17) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.*: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230** : 1350~1354, 1985

- 18) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80** : 5520~5524, 1983
- 19) Ayane, M., Mengle-gaw, L., McDevitt, H. O., *et al.*: $E\alpha^u$ and $E\beta^u$ chain association: where lies the anomaly? *J. Immunol.* **137** : 948~951, 1986
- 20) Saito, H., Maki, R. A., Clayton, L. K., *et al.*: Complete primary structures of the $E\beta^d$ chain and gene of the mouse major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 5520~5524, 1983
- 21) Estess, P., Begovich, A. B., Koo, M., *et al.*: Sequence analysis and structure-function correlations of murine q, k, u, s, and f haplotype I-A β cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 3594~3598, 1986
- 22) Benoist, C. O., Mathis, D. J., Kanter, M. R., *et al.*: Regions of allelic hypervariability in the murine a-alpha immune response gene. *Cell*, **34** : 169~177, 1983
- 23) Malissen, M., Hunkapiller, T. and Hood, L.: Nucleotide sequence of a light chain gene of the mouse I-A subregion: A^d. *Science*, **18** : 750~754, 1983
- 24) Bielschowsky, M. & Goodall, C. M.: Origin of inbred NZ mouse strains. *Cancer Res.*, **37** : 9~11, 1959
- 25) Figueroa, F., Tewarson, S. and Klein, J.: H-2 haplotypes of strains DBR 7, B10. NZW, NSF, BQ 2, STU, TO 1 and TO 2. *Immunogenetics*, **15** : 431~436, 1982
- 26) Klein, J., Flaherty, L., VandeBerg, J. L., *et al.*: H-2 haplotypes, genes, regions, and antigens: First listing. *Immunogenetics*, **6** : 489~512, 1978
- 27) Klein, J., Martinkova, J. and Herzenberg, L. A.: Analysis of the histocompatibility-2 (H-2) locus of NZB mice. *Transplantation*, **5** : 1335~1337, 1967
- 28) Brown, J. H., Jardetzky, T., Saper, M. A., *et al.*: A hypothetical model of foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* **332** : 845~850, 1988
- 29) Braunstein, N. S. & Germain, R. N.: Allele-specific control of Ia molecule surface expression and conformation: Implications for a general model of Ia structure-function relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 2921~2925, 1987
- 30) Acha-Orbea, H. & McDevitt, H. O.: The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 2435~2439, 1987
- 31) Germain, R. N., Bentley, D. M. & Quill, H.: Influence of allelic polymorphism on the assembly and surface expression of class II MHC (Ia) molecules. *Cell*, **43** : 233~242, 1985
- 32) Talal, N., Dauphinee, M. & Fischbach, M.: Increased frequency of Ia expression, T-lymphocyte subset abnormalities and autoimmunity as common features in murine strains bearing the lpr gene. *Immunogenetics: its application to clinical medicine.* (Eds. Sasazuki, T. & Tada, T.) Academic Press Japan, Inc, pp. 53~62, 1984
- 33) Kovac, A. & Schwartz, R. H.: The nature of the immune response (Ir) gene defect for pigeon cytochrome c in [B10. A (4R) × B10. PL] F1 mice. *Inter Immunol* **1** : 1~10, 1989

Original Paper

Summary**Nucleotide sequence analysis of MHC class II
genes in autoimmune-prone (NZB×NZW) F1 mice**

We previously found that the heterozygosity of the major histocompatibility complex (MHC), H-2^d/H-2^z is one of the major genetic factors responsible for the development of severe autoimmune disorders characteristic of (NZB×NZW) F1 mice. To examine the possible role of the F1 unique MHC class II molecule, we studied the polymorphism of MHC class II genes by analyzing the nucleotide sequence of genomic DNA and cDNA clones obtained from NZW and NZB strains. The data obtained revealed that polymorphic amino-terminal region sequences of A α , A β , E α , and E β genes of NZW and A β and E β genes of NZB mice were identical to those of B10. PL mice (H-2^u) and Balb/c (H-2^d), respectively. These findings suggest that the transassociation of α and β chains of the MHC class II molecules of these different haplotypes causes the formation of the F1 unique MHC class II molecules.

Key words : autoimmunity, MHC class II molecule, NZB mice, NZW mice, SLE

SHIGEKI OGAWA, M. D.*¹⁾ & HIROYUKI NISHIMURA, Ph. D.*²⁾

* 1) *Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine,*

* 2) *Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan*