

らい菌 PGL の糖鎖を用いた抗原抗体反応の機構の研究

藤 原 剛

研究主題「らい菌 PGL の糖鎖を用いた抗原抗体反応の機構の研究」のもとに1990年4月1日～1992年3月31日の二年間にわたって特別研究費合計40万円の交付を受け研究を行なったので、その概要を報告する。

研究成果の概要

これまでの研究でらい菌 PGL の高い特異性は PGL を構成する三糖 [*O*-(3, 6-di-*O*-methyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2, 3-di-*O*-methyl- α -L-rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-3-*O*-methyl- α -L-rhamnopyranose]、そのなかでも主として非還元末端の3, 6-di-*O*-methylglucoseによって決定されていることが明らかになった。しかし抗体がこの抗原を認識する機構は明らかでない。そこでこの三糖をモデル化合物としてこれに対する単クローン抗体との反応を調べ、三糖の構造と抗体に対する反応性との相関関係について検討した。

実験材料と実験方法

合成抗原. 合成抗原はすべてBSA複合体として用いた。表1に抗原のリストと略号を示す。この内ID-P-BSAは本研究の過程で合成を行なった。いずれの抗原も1モルのBSA当たり25～35モルの糖を含んでいた。

単クローン抗体. この実験では表2に示したPGLに特異的な11種の単クローン抗体について解析を行なった。これらの単クローン抗体は本研究で調製したものと、由来の欄に示した各所から分与されたものを含んでいる。ご好意に深謝する。

E L I S A. WHOの標準法によった。塗布する抗原の濃度は 3.14×10^{-1} nMから 3.14×10^{-2} nMとした。

E L I S A 阻害試験. 3.14×10^{-1} nMの抗原を塗布したプレートを1%BSAでブロックした後、100倍濃度の阻害用抗原液を含む抗体を加え1時間保温した。これについて通常のE L I S Aによって残存する活性を測定した。

合成抗原の構造		略号
[G1c]-	(β1→)-β-BSA	GM-P-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-	(β1→)-β-BSA	NM-P-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-	(α1→)-β-BSA	αM-P-BSA
	[3-OMe-Rha]-(α1→)-β-BSA	IM-P-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-(β1→)-[2,3-OMe ₂ -Rha]-	(α1→)-β-BSA	ND-P-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-(β1→)-[3-OMe-Rha]-	(α1→)-β-BSA	20H-DT-P-BSA
	[2,3-OMe ₂ -Rha]-(α1→)-[3-OMe-Rha]-(α1→)-β-BSA	ID-P-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-(β1→)-[2,3-OMe ₂ -Rha]-(α1→)-[3-OMe-Rha]-(α1→)-β-BSA		NT-P-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-(β1→)-[2,3-OMe ₂ -Rha]-(α1→)-[3-OMe-Rha]-(α1→)-β-BSA		NT-O-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-(α1→)-[2,3-OMe ₂ -Rha]-(α1→)-[3-OMe-Rha]-(α1→)-β-BSA		ααT-P-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-(β1→)-[2,3-OMe ₂ -Rha]-(β1→)-[3-OMe-Rha]-(α1→)-β-BSA		ββT-P-BSA
[3,6-OMe ₂ -G1c]-(β1→)-[2,3-OMe ₂ -Rha]-(α1→)-[3-OMe-Rha]-(β1→)-β-BSA		βαT-P-BSA
[G1c]-(β1→)-[2,3-OMe ₂ -Rha]-(α1→)-[3-OMe-Rha]-(α1→)-β-BSA		GT-P-BSA

β-O-C₆H₄CH₂CH₂CONH-, α-O-(CH₂)₇CONH-

表1 合成抗原一覧表

	抗体 クラス	免疫源	由来	希釈 倍数
mAb(1-21)	IgG	PGL	Nishimura-Ikeda	2,000
mAb(1-24)	IgG	PGL	Nishimura-Ikeda	2,000
mAb(1-25)	IgM	PGL	Nishimura-Ikeda	2,000
m1 6A12	IgG	PGL	P. Brennan	2,000
m1 8A2	IgG	PGL	P. Brennan	1,000
m1 8B2	IgG	PGL	P. Brennan	2,000
PG2B8F	IgM	PGL	WHO Bank	500
F47-21-3	IgG	PGL	WHO Bank	500
SP-1	IgG	PGL	Sakamoto-Fujiwara	1,000
A-9	IgG	NT-P-KLH ^{*1}	Sakamoto-Minagawa	2,000
DZ1	IgG	NT-P-MBSA ^{*2}	J. Douglas	80,000

*¹キ-ネリンバクトヘシアン *²マリアアミン

表2 単クローン抗体一覧表

結果と考察

単クローン抗体が認識する抗原上の範囲を決定するために種々の濃度の抗原に対する活性をELISAによって測定した。DZ1以外の単クローン抗体はいずれもNT-P-BSA に対して強い活性を示したが、末端の3,6-di-O-methylglucoseを欠くID-P-, IM-P-, G-P-BSAにはいずれの抗体も全く活性を示さなかった。この事はPGLの活性の発現には3,6-di-O-methylglucoseがきわめて重要な機能をはたしていることを示している。各単クローン抗体について行なった解析の結果を以下に示す。

mAb(1-24)、mAb(1-21). mAb(1-24)は3,6-di-O-methylglucoseを欠くIM-P-, ID-P-BSAに対してまったく活性を示さなかった。mAb(1-24)はNT-P-, NT-O-, ND-P-, 20H-D-P-, βαβT-P-BSAに対してほとんど同じ活性を示した。βαβT-P-, NM-P-, αM-P-BSAに対しては0.17nM以下でNT-P-BSAに比べて活性が低下したがその程度は小さかった。これらの結果はmAb(1-24)は末端

の3,6-di-*O*-methylglucoseのみを認識する事を示す。mAb(1-24)がアノメリック配向を認識するかどうかを調べるために配向を変えた合成抗原に対する反応性をテストしたところ、どの抗原に対してもNT-P-BSAとほぼ同一の活性を示し、どのアノメリック配向をも認識しないことは明らかであった。mAb(1-21)はmAb(1-24)とまったく同一の活性を示した。

mAb(1-25)、mAb(1-25)はmAb(1-24)とよく似た活性のパターンを示した。mAb(1-25)はIM-P-、ID-P-BSAに対して活性を示さず、ND-P-、NT-O-BSAに対してはNT-P-BSAと同程度の活性を示した。NM-P-BSAに対してはmAb(1-24)と違って低抗原濃度で活性が低かったが、高抗原濃度ではNT-P-BSAと同程度の活性を示した。このことはmAb(1-25)は他の部分の影響を多少は受けるものの本質的には3,6-di-*O*-methylglucoseを認識することをしめす。mAb(1-25)は α M-P-BSAにはNM-P-BSAと同程度の活性を示した。また $\alpha\alpha$ T-P-BSAに対しては、活性の低下がみられたが、その程度は比較的小さくNM-P-BSAと同レベルであった。従ってmAb(1-25)は3,6-di-*O*-methylglucoseのアノメリック配向を認識しないものと考えられる。

m1 6A2、m1 8A2、m1 8B2。 m1 6A12、m1 8A2およびm18B2はNT-O-BSA、ND-P-BSAに対してNT-P-BSAとほとんど同じ活性を示した。またNM-P-BSAには全く活性を示さなかった。これらの結果からm1 6A12、m1 8A2およびm1 8B2は外側の二糖を認識するものと考えられる。これらの抗体は $\beta\alpha$ T-P-BSAに対して高抗原濃度ではかなり高い活性を示し、3-*O*-methylrhannoseのアノメリック配向を認識しない事を示したが、低抗原濃度での活性の低下が認められた。この理由は明らかでないが、これらの抗体が還元末端の3-*O*-methylrhannoseを認識しない事は分かっているので、BSAの表面における立体障害が可能性のひとつであると思われる。m1 6A12は $\beta\beta$ T-P-BSAには $\beta\alpha$ T-P-BSAに対する活性とほぼ同程度の活性を示したが、 $\alpha\alpha$ T-P-BSAには活性を示さなかった。m1 8A2 とm1 8B2は $\beta\beta$ T-P-BSAにも $\alpha\alpha$ T-P-BSAにも活性を示さなかった。この事はm1 6A12は二糖の中のアノメリック配向のみを、またm1 8A2とm1 8B2は外側の二糖の中と外の両方のアノメリック配向を認識することを示す。

m1 6A12は20H-D-P-BSA に対して活性を示したが、m1 8A2とm1 8B2は活性を示さなかった。この事はm1 6A12は2,3-di-*O*-methylrhannoseの2位のメチル基を認識し、m1 8A2とm1 8B2はこれを認識しないことを示す。

PG2B8F。 PG2B8FはND-P-、NT-O-BSAにNT-P-BSAと同程度の活性を示したが、NM-P-、 α M-P-、IM-P-、ID-P-BSAには全く活性を示さず、PG2B8Fが外側の二糖を認識することは明らかであった。またPG2B8Fは $\beta\alpha$ T-P-BSAには活性を示したが、 $\alpha\alpha$ T-P-、 $\beta\beta$ T-P-BSAには全く活性を示さなかった。このことはPG2B8Fが外側の二糖の中と外の両方のアノメリック配向を認識することを示す。

F47-21-3。 F47-21-3はNT-O-BSAに対してNT-P-BSAと同程度の活性を示した。ND-P-BSAに対してはNT-P-BSAに対する活性の約1/2の活性しか示さず、NM-P-、 α M-P-、IM-P-、ID-P-BSAには全く不活性であった。またPG2B8Fは $\beta\alpha$ T-P-BSAに対して活性を示すが $\alpha\alpha$ T-P-、 $\beta\beta$ T-P-BSAには活性を示さなかった。このことはF47-21-3がPG2B8Fと同様外側の二糖の中と外の両方のアノメリック配向を認識することを示す。

SF-1. SF-1 は特徴的で、NT-O-BSAに対してNT-P-BSAより少し低い活性を示す以外他の抗原に対して全く活性を示さなかった。この事はSF-1が非常に厳しい特異性を持ちPGLの三糖の完全な構造のみを認識すること、またこの際にフェニール基の一部をも認識している可能性がある事を示す。

A-9. A-9 はSF-1 よりも更に厳格な特異性を持ちNT-O-BSAにも反応せず、NT-P-BSAがA-9の反応する唯一の単クローン抗体であった。このことはA-9 が三糖全体と更にフェニール基をも含めて認識するを示す。

DZ1. DZ1は他の抗体とはその性質を全く異にし、IM-P-、ID-P-BSAに対してNT-P-BSAと同程度の活性を持っていた。NM-P-、 α M-P-、ND-P-、20H-D-P-BSA には活性を示さなかった。このことはDZ1が内側の3-O-methylrhamnoseを認識している事を示す。DZ1は $\alpha\alpha\alpha$ T-P-BSAに対してNT-P-BSAと同程度の活性を示した。 $\beta\alpha\beta$ T-P-BSAに対しては、低抗原濃度では活性が下がり、この活性低下は $\beta\beta\alpha$ T-P-BSAではさらに著しかった。従ってDZ1の活性には還元末端の3-O-methylrhamnoseの非還元末端側のアノメリック配向を認識し、還元末端側の配向についても限定的な関与があるものと考えられる。



表3 単クローン抗体の認識範囲

これらの単クローン抗体が認識するPGLの糖鎖の範囲をまとめて表3に示す。この表から抗体が抗原を認識する単位、すなわちエピトープは一糖残基であることが明らかである。しかし部分的に糖残基のメチル基を除去した合成抗原(20H-D-P-BSA)やメチル基の位置を変えた抗原(TB-IM-P-BSA、CM-P-BSA)などに対する反応性などの結果から、糖残基の部分構造を認識する、すなわち最小のエピトープは一糖残基よりも小さい場合もあることが分かった。

この実験では、三糖で免疫して得られたクローンの中には還元末端側からの二糖(ID-P-BSAに相当)を認る抗体が得られなかった。ただし、ID-P-KLHは非常に強い免疫原性を持ちこれで免疫した場合、多種類のクローンが得られるがこれらは全てID-P-BSAかIM-P-BSAを認識する抗体でNT-P-BSAを認識する抗体は得られなかった。この理由は三糖の状態では中央の糖残基は

両側に糖残基があり、立体障害が大きいため抗体がこの部分に接近しにくいためであり、ID-P-KLHで免疫すると多数のNT-P-BSAを認識できない単クローン抗体が得られるのは、末端に糖残基がないことによって生じる4位のOH基の強い抗原性によるものと考えられた。これはID-P-BSAの4-OH基にグルコースを付けた合成三糖抗原GT-P-BSAに対して、これらの単クローン抗体は活性を持たないことから裏付けられた。NT-P-MBSAで免疫したときにIM-P-BSAを認識する単クローン抗体(DZ1)がえられたが、これは還元末端の糖残基が中央の糖残基よりも立体障害がすくないためと考えられ、上記の結果とよく一致する。

この一連の研究でらい菌のPGLの糖残基に対する単クローン抗体のフルセットが得られた訳で、これが抗原抗体反応の機構の解析におおいに役立った。またこの単クローン抗体はPGLの定量やPGLを利用した組織染色など細胞病理学の分野などでの利用も行なわれ始めており、この研究の意義は大きいものと思われる。

(付記)

本研究は国立多摩研究所の皆川文重、坂本芳幹両博士、University of HawaiiのJames T. Douglas博士との共同研究の一環として行なわれたものである。

研究成果の発表

本研究の成果はInfection and Immunityに投稿する予定である。