
Lyb-2およびB細胞刺激因子(BSF-1)を介する
B細胞活性化機構の解析

(課題番号：62570211)

昭和63年度科学研究費補助金
〔一般研究(C)〕研究成果報告書

平成元年3月

研究代表者 矢 倉 英 隆
(旭川医科大学医学部 助教授)

は し が き

1981年に、マウスB細胞表面分子 Lyb-2 がB細胞活性化・分化過程を制御していることを、我々が初めて報告した。その後の機能解析により、Lyb-2 は造血系細胞の増殖・分化を制御しているB細胞刺激因子（BSF-1）によるB細胞シグナリングを調節している分子である可能性が示唆された。

本研究では、Lyb-2 の機能をさらに詳細に解析すると同時に、BSF-1 レセプターとの関連性を検討する目的で、Lyb-2 の構造解析を行った。また、未だ不明な BSF-1 レセプターを介するシグナリングに関与する second messenger の同定を試みた。その結果、興味あるいくつかの知見を得ることができた。これらの研究成果について、御批判を頂ければ幸甚である。

研究組織

研究代表者： 矢 倉 英 隆 （旭川医科大学医学部 助教授）

研究経費

昭和62年度	1、600千円
昭和63年度	900千円
計	2、500千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Yakura, H., G. Tate, H. Sakata, I. Kawabata, T. Ashida, M. Katagiri: Role of Ly-5 and Lyb-2 in LPS-induced B cell activation. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 110:247, 1987.
2. 矢倉英隆: B細胞刺激因子-1 (BSF-1) レセプター解析. 造血系細胞の増殖・分化解明の手掛り. *医学のあゆみ* 141:979, 1987.
3. 矢倉英隆: マウスB細胞表面抗原. *Ann. Rev. 免疫* 1988 (中外医学社) p.59, 1988.
4. 河端薫雄、蘆田知史、矢倉英隆: B細胞刺激因子-1による胸腺細胞増殖の誘導. *北海道医学雑誌* 63:293, 1988.
5. Yakura, H., G. Tate, H. Sakata, I. Kawabata, T. Ashida, M. Katagiri: Regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced B cell differentiation by Ly-5 and Lyb-2 molecules. In "Lymphocyte Activation and Differentiation. Fundamental and Clinical Aspects" (editors: J.C. Mani, J. Dornand) (Walter de Gruyter, Berlin) p.595, 1988.
6. 蘆田知史、矢倉英隆、河端薫雄、片桐一: 抗原レセプター及び BSF-1 レセプターを介するB細胞シグナリングの解析. *北海道医学雑誌* 63:660, 1988.
7. Yakura, H., I. Kawabata, T. Ashida, M. Katagiri: Differential regulation by Ly-5 and Lyb-2 of IgG production induced by lipopolysaccharide and B cell stimulatory factor-1 (IL-4). *J. Immunol.* 141:875, 1988.

8. Ashida, T. H. Yakura, I. Kawabata, M. Murakami, M. Katagiri:
Structural features of the Lyb-2 molecule. Immunogenetics 26:
286, 1988.
9. 蘆田知史、河端薫雄、矢倉英隆：マウスリンパ球表面抗原 Lyb-2 分子の
機能および構造の解析。北海道医学雑誌 64:10, 1989.

(2) 口頭発表

1. 河端薫雄、矢倉英隆、蘆田知史、片桐一：B細胞刺激因子-1 (BSF-1)
による胸腺細胞増殖の誘導。第76回日本病理学会総会 1987年
3月31日 [日本病理学会会誌 76:105, 1987]
2. Yakura, H., G. Tate, H. Sakata, I. Kawabata, T. Ashida, M.
Katagiri: Regulation of LPS-induced B cell differentiation by
Ly-5 and Lyb-2 molecules. 第18回 International Leucocyte
Culture Conference. 1987年6月23日 [Immunobiol. Suppl.
3:126, 1987]
3. 矢倉英隆、河端薫雄、蘆田知史、片桐一：LPS 及び BSF-1 により
誘導される抗体産生の Ly-5 と Lyb-2 による制御。第17回日本
免疫学会 1987年11月20日 [日本免疫学会総会・学術集会
記録 17:151, 1987]
4. 矢倉英隆：B細胞膜蛋白 Lyb-2 および Ly-5 を介するB細胞増殖・
分化の制御。第33回日本病理学会秋期特別総会。A演説。
1987年11月26日 [日本病理学会会誌 76(補)2:21, 1987]
5. 河端薫雄、蘆田知史、柴田敏也、久保孝市、矢倉英隆、片桐一：マウス
B細胞活性化に参与している Lyb-2 分子の構造上の特徴。第18回
日本免疫学会 [日本免疫学会総会・学術集会記録 18:561, 1988]

本研究の基礎になった論文

1. Yakura, H., F.W. Shen, E.A. Boyse, L. Tang: The Lyb-2 phenotype of hemolytic PFC. *Immunogenetics* 10:603, 1980.
2. Yakura, H., F.W. Shen, M. Kaemmer, E.A. Boyse: Lyb-2 system of mouse B cells. Evidence for a role in the generation of antibody-forming cells. *J. Exp. Med.* 153:129, 1981.
3. Yakura, H., F.W. Shen, E. Bourcet, E.A. Boyse: Evidence that Lyb-2 is critical to specific activation of B cells before they become responsive to T cell and other signals. *J. Exp. Med.* 155:1309, 1982.
4. Yakura, H., F.W. Shen, E. Bourcet, E.A. Boyse: On the function of Ly-5 in the regulation of antigen-driven B cell differentiation. Comparison and contrast with Lyb-2. *J. Exp. Med.* 157:1077, 1983.
5. Yakura, H., I. Kawabata, F.W. Shen, M. Katagiri: Selective inhibition of lipopolysaccharide-induced polyclonal IgG response by monoclonal Ly-5 antibody. *J. Immunol.* 136:2729, 1986.
6. Yakura, H., I. Kawabata, T. Ashida, F.W. Shen, M. Katagiri: A role for Lyb-2 in B cell activation mediated by a B cell stimulatory factor. *J. Immunol.* 137:1475, 1986.

研究成果

BSF-1 は造血系細胞に広く作用し、その増殖・分化を調節している因子であり、B細胞においても多彩な活性を示すことが明らかにされている。この作用機構の理解には、レセプターを同定し、その構造を解明することが重要である。我々は、その候補としてB細胞分化を制御している Lyb-2 を考えた。

本研究では、この可能性を考慮に入れ、BSF-1 の活性発現、特に抗体のクラス調節における Lyb-2 の関与を検討し、まだ明らかになっていない BSF-1 を介するB細胞シグナリングの機構についても解析を試みた。さらに、既に報告されている BSF-1 レセプターの特徴との異同を検討する目的で、Lyb-2 の構造解析を行い、以下の結果を得た（これらの背景については、別添1を参照のこと）。

1. BSF-1 による抗体クラスの調節過程における Lyb-2 の関与

BSF-1 は LPS とともにB細胞に作用して IgG1 と IgE の産生を誘導する。Lyb-2 は LPS による活性化過程にはまったく関与していないが、BSF-1 による IgG1 産生を調節していることが明らかになった。すなわち、Lyb-2 はB細胞における BSF-1 のほとんどすべての活性発現を制御している分子であると考えられる。IgG1 産生に対する Lyb-2 の関与を限界希釈実験で検討した結果、IgG1 産生細胞の前駆細胞が出現する過程で機能しており、IgG1 産生にコミットした細胞の増殖・分化の過程には関与していないことが示された（別添2）。さらに、Lyb-2 による制御は、IgG1 遺伝子活性化の転写過程で行われている可能性が示唆された（準備中）。また、IgE 産生に対する効果については現在検討中である。もし IgG1 に対する効果と同様の結果が得られれば、BSF-1 により IgG1/IgE レベルが上昇している nematode 感染マウスを用いて、Lyb-2 抗体が *in vivo* においてもこれらのクラスの抗体産生を調節できるのかという問題を検討する予定である。

2. Lyb-2 の分子構成

脾B細胞、及び二種類のBリンパ腫 (I-29、L1210) を ^{125}I で標識後、可溶化した膜分画を Lyb-2 抗体で免疫沈降し、還元下に SDS-PAGE を行い Lyb-2 の性状について検討した。その結果、従来報告されている 45 kD の分子の他に 105 kD の分子が検出された。この二種類の分子の関係を調べるために、還元・非還元の二次元 SDS-PAGE を行ったところ、Lyb-2 は S-S 結合で結ばれた 45 kD と 105 kD の構成鎖からなる heterodimer と、45 kD の homotrimer あるいは 45 kD と ^{125}I で標識されにくい構成鎖からなる heterodimer という二つのサブユニットから構成される分子であることが示唆された (別添3)。

3. Lyb-2 cDNA クローニング

Lyb-2 の分子構成が上記のように複雑であること、さらに Lyb-2 抗体が膜に転写された蛋白と反応しないことから、発現型の cDNA ライブラリーを抗体でスクリーニングすることは困難であると考えられた。そこで、Lyb-2 蛋白のアミノ酸配列を決定することから始めた。Bリンパ腫 I-29 細胞を NP-40 で可溶化後、二次元 SDS-PAGE を行い、Lyb-2 に相当するスポットをゲルから polyvinylidene difluoride 膜に転写し、そのままシーケンサーにかけるという方法をとった。しかし、I-29 細胞 100 g からの精製では、アミノ酸配列決定に十分な Lyb-2 を回収できなかった。現在、さらに大量の細胞を用いる方法と、Lyb-2 高発現細胞株を樹立する方法とにより、再検討する段階にある。

4. BSF-1 レセプターを介するシグナリングの second messenger 同定の試み

BSF-1 と抗 IgM 抗体 ($\alpha\text{-}\mu$) の Ia 抗原誘導活性を指標として、各種の細胞内代謝抑制剤を用いて解析した。はじめは、Ia 誘導活性をもつと報告されていた Lyb-2 抗体との比較を行う予定であったが、我々のところではこの結果を再現できず計画を変更した。その結果、 $\alpha\text{-}\mu$ の活性は、PKC の抑制剤

(palmitoylcarnitine)、カルモジュリン拮抗剤(W-13)、細胞内カルシウム拮抗剤(TMB-8)、Na/H antiport inhibitor (Amiloride)で抑制され、抗原レセプターを介するシグナリングには、PKCの活性化、細胞内カルシウムイオンの動態、さらに細胞内pH調節系が重要な役割を担っていることが示唆された。一方、BSF-1によるIa発現誘導は、検索した抑制剤のうちでTMB-8によってのみ抑制された。このことは、細胞内カルシウムイオン濃度を増加させないとされるBSF-1も、極微量のカルシウムイオンの動態の関与がその活性発現に必要な可能性を示唆している(準備中)。

- 別添 1 矢倉英隆： B細胞刺激因子-1 (BSF-1) レセプター解析。
造血系細胞の増殖・分化解明の手掛り。 医学のあゆみ 141:
979, 1987
- 別添 2 Yakura, H. et al.: Differential regulation by Ly-5 and Lyb-2
of IgG production induced by lipopolysaccharide and B
cell stimulatory factor-1 (IL-4). J. Immunol. 141:875,
1988.
- 別添 3 Ashida, T. et al.: Structural features of the Lyb-2 molecule.
Immunogenetics 26:286, 1988.